

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870562

研究課題名(和文) ヒト化UGT1マウスを用いたビリルビンが持つ生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Role of UDP-glucuronosyltransferase in bilirubin and thyroxine metabolism

## 研究代表者

藤原 亮一 (Fujiwara, Ryoichi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：40631643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの新生児は生理的に高ビリルビン血症を発症するが、その意義は不明であった。ビリルビンは生体内で、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によって代謝される。新生児期の脳の発達に重要な甲状腺ホルモンであるチロキシンもUGTで代謝される。チロキシンの減少は脳発達を抑制する。本研究で、新生児期に高値となるビリルビンはUGTによるチロキシン代謝を阻害し、血中チロキシン濃度を高くすることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Human neonates develop mild hyperbilirubinemia. Bilirubin is solely metabolized by UDP-glucuronosyltransferase (UGT). As UGT also metabolizes thyroxine, which is an important bioactive hormone in brain development, it was hypothesized that bilirubin can inhibit the thyroxine metabolism and promote brain development. In humanized UGT1 mice, UGT1A1 was highly expressed in the brain. We observed that the thyroxine level was actually higher in hUGT1 mice compared to wild-type mice. It was further demonstrated that reduced thyroxine levels were tightly associated with the neurodevelopmental disorder.

研究分野：薬物代謝酵素

キーワード：ビリルビン 新生児黄疸 薬物代謝酵素 UGT1A1 グルクロン酸抱合 甲状腺ホルモン 脳発達 T4

## 1. 研究開始当初の背景

第II相薬物代謝酵素であるUDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-Glucuronosyltransferase; UGT) は多くの薬物を代謝する一方で、ビリルビンやエストラジールなど様々な内因性化合物の代謝も担っている。

鉄ポルフィン錯体であるヘムは全ての有核細胞で生成され、ヘモグロビン、カタラーゼ、シトクロムなどのヘムタンパク質の活性中心として細胞内で重要な機能を果たしている。ヘムオキシゲナーゼはヘムを分解し、水溶性であり無毒性のビリベルジンを生産する。鳥類や爬虫類、両生類においてビリベルジンはヘム生分解経路の最終生産物であり、胆汁中排泄により速やかに体外へ排泄される。一方哺乳類においては、ビリベルジンはビリベルジン還元酵素によりビリルビンに還元される。ビリルビンは脂溶性であるため生体外へ排泄され難く、哺乳類の中でも特にヒトにおいて血中ビリルビン濃度は高値を示す (新生児期; 5~20 mg/dL, 小児~大人; 0.5~1.5 mg/dL)。神経毒性を有するビリルビンは血液脳関門を越え脳に浸入し、重篤な脳障害 (核黄疸) を発症させる可能性を有する。代表的なUGT分子種であるUGT1A1はビリルビンの唯一の代謝酵素であり、哺乳類特異的なヘム生分解産物であるビリルビンの解毒排泄における中心的な役割を担っている。

ヘムの生分解産物であるビリベルジンは無毒性であり、且つ水溶性であるため生体外へ排泄され易い。しかし、哺乳類は進化の過程でBVRを獲得した結果、神経毒性を有するビリルビンを生体内で生成するようになった。同じ哺乳類であるマウスやラットも生体内でビリルビンを生成するが、その血中濃度は極めて低く (0~0.1 mg/dL)、常に中~高度の血中ビリルビン濃度を保つのはヒトのみである。しかし、哺乳類が生体にとって不利益と思えるビリルビンを生合成する意義、さらにヒトにおいては核黄疸を発症する危険を伴ってまで新生児期に高ビリルビン血症を発症する生理学的意義は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

細胞内にはフリーラジカルや過酸化物質といった様々な活性酸素種が存在し、細胞損傷を引き起こしている。現在までの *in vitro* 研究により、ビリルビンは強い抗酸化作用を有す

ることが明らかにされたことから、生体にとって不利益と思われるビリルビンは、生体内において様々な酸化ストレスに対する生体防御因子として働いている可能性が考えられる。しかしながら、マウスやラットなどのげっ歯類における血中ビリルビン濃度は極めて低く、高ビリルビンや生理的黄疸を発症するのはヒトのみである。従って、ビリルビンの生理学的意義の解明に有用な *in vivo* 研究モデルは無く、現在までに哺乳類におけるビリルビンの生理学的意義は明らかにされていない。

申請者はヒト化UGT1A1マウスの作製に成功しており、そのマウスはヒトと同様に新生児期に生理黄疸を発症することを明らかにした。ヒト化UGT1A1マウスは世界で唯一の新生児黄疸モデルマウスであり、成体期においても中程度の血中ビリルビン値を有することから、本マウスを用いることでビリルビンの生理学的意義が解明されると考えられる。そこで本申請研究では「ヒト化UGT1A1マウスを用いた哺乳類におけるビリルビンの生理学的意義の解明」を目的とする。

## 3. 研究の方法

脳におけるUGT1A1発現および機能解析  
新生児 (2週齢) および成体 (6ヶ月齢) のヒト化UGT1A1マウスから脳を摘出した。実体顕微鏡を用い、摘出した脳から大脳、中脳、小脳、海馬、嗅球を単離した。各脳部位からRNAを抽出した後、逆転写反応を行いcDNAを合成した。UGT1A1およびUGT1A6特異プライマーを用い、それぞれのmRNA発現量を定量した。また、脳ミクロソームを調製し、UGT1A1特異基質であるエストラジオール、およびUGT1A6特異基質であるセロトニンを用い、UGT酵素活性を測定した。また、ニコチン 3 mg/kg を5日間および7日間投与したマウスから肝臓と脳を摘出し、UGT発現量と活性を測定した。

### UGT1A1およびUGT1A1阻害物質であるビリルビンによるチロキシン代謝への影響

周産期にUGT1A1誘導剤であるフェニトイン、カルバマゼピン、およびPCNを連日経口投与した。生後14日において採血し、血中ビリルビン濃度とチロキシン濃度を測定した。また肝臓および脳を摘出し、RNAの抽出やミクロソームの調製を行った。UGT1A1 mRNAやタンパク発現を定量した。また、特異基質を用いてUGT1A1酵素活性を測定した。脳発達の指標となるシナプス関連遺伝子の発現解析や、生後56日目におけるロータロッド試験による行動学的試験を行った。

#### 4. 研究成果

##### 脳における UGT1A1 発現および機能解析

購入したヒト脳 RNA とヒト化 *UGT1* マウスより抽出した脳 RNA を用い、UGT の mRNA 発現解析を行った。どちらにおいても複数の UGT 分子種の mRNA 発現が認められたが、特に UGT1A1 と UGT1A6 の発現が高く認められた (図 1)。

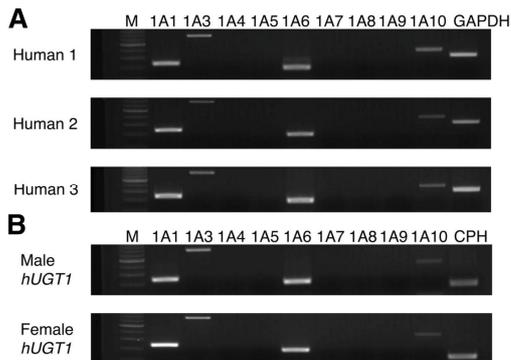


図 1 ヒト脳 (A) およびヒト化 *UGT1* マウス脳 (B) における UGT1 分子種の発現

さらに、脳の各部位における UGT1A1 の発現解析を行ったところ、大脳、中脳、小脳、海馬、および嗅球において UGT1A1 の発現が認められた。興味深いことに、UGT1A1 の中脳における発現は他の部位よりも高いものであった (図 2)。

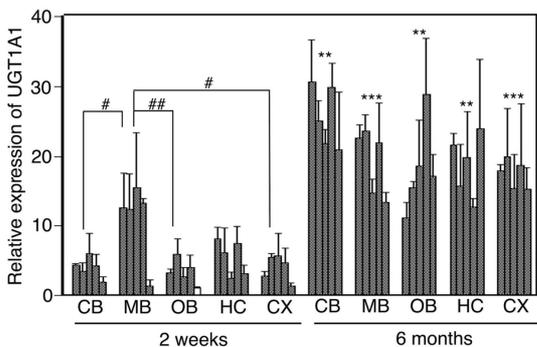


図 2 ヒト化 *UGT1* マウス脳の各部位における UGT1A1 mRNA の発現

このような脳における UGT1A1 や UGT1A6 はミクロソーム中で活性を有していたことから、UGT は脳で機能的に発現していることが明らかとなった。さらに、脳における UGT の発現は、カルバマゼピンや PCN の投与で上昇すること、さらにニコチンの摂取によっても脳 UGT の発現が高まることが明らかとなった。

##### UGT1A1 および UGT1A1 阻害物質であるビリルビンによるチロキシン代謝への影響

周産期の UGT1A1 誘導剤の投与によって、血中チロキシン濃度は顕著に低下した。その一方で、主代謝組織である肝臓に発現する UGT1A1 mRNA および酵素活性は顕著に誘導することが明らかとなった (図 3)。また、

血中ビリルビン血も UGT1A1 誘導剤の暴露によって減少した。

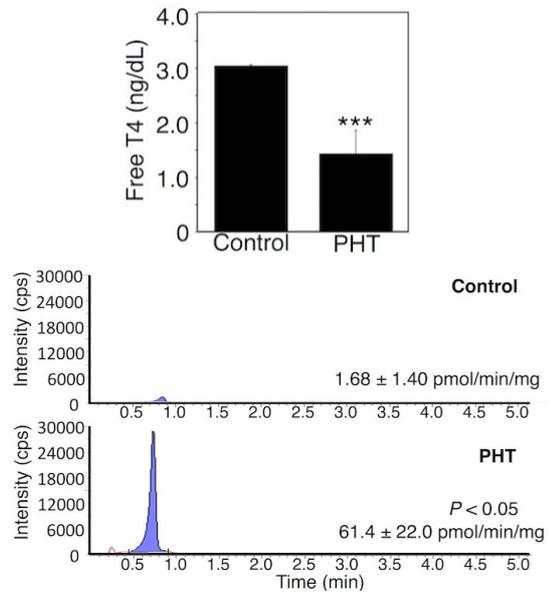


図 3 コントロールとフェニトイン投与群の肝臓における血中チロキシン濃度 (上) と UGT1A1 酵素活性 (下)

チロキシン濃度の減少が脳発達に影響している可能性を考え、コントロールマウスとフェニトイン投与マウスにおける、シナプス関連遺伝子の脳内発現を定量した。シナプシンとシナプトフィジンはシナプスの発達に關与する。本検討において、これらの遺伝子発現はフェニトイン投与群において顕著に低下した (図 4)。このことから、遺伝子レベルではあるが、チロキシンの低下は脳発達を抑制していることが明らかとなった。

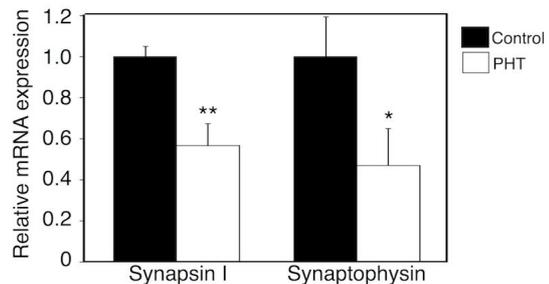


図 4 コントロールとフェニトイン投与群の脳におけるシナプス関連遺伝子の発現

周産期に UGT1A1 誘導剤の暴露を受けたマウスの生後 56 日目におけるロータロッド試験を行った。図 5 に示すように、コントロールマウスは回転棒からの落下があまり認められなかったが、フェニトイン投与マウスにおいては顕著に落下傾向が認められた。

このような結果から、ビリルビン代謝に關与する UGT1A1 は、ビリルビンやチロキシンの代謝を制御することで、脳の発達に關与していることが明らかとなった。

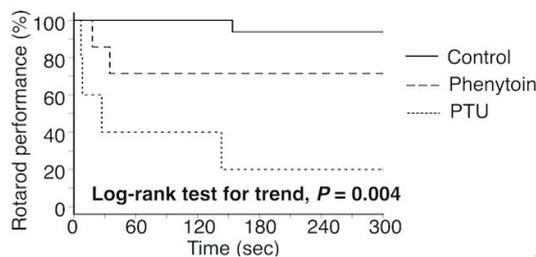


図 5 コントロールとフェニトイン投与群のロータロッド試験

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Naoya Aoshima, Yoshiko Fujie, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. Glucose induces intestinal human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 to prevent neonatal hyperbilirubinemia. *Scientific Reports*. 4:6343 (2014). 査読有
2. Yuki Kutsuno, Rika Hirashima, Masaya Sakamoto, Hiroko Ushikubo, Hirofumi Michimae, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. Expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1) and Glucuronidation Activity toward Endogenous Substances in Humanized UGT1 Mouse Brain. *Drug Metab Dispos*. 43:1071-1076 (2015). 査読有
3. Masaya Sakamoto, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. Nicotine regulates the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in humanized UGT1 mouse brain. *Drug Metab Pharmacokin*. 30:269-275 (2015). 査読有
4. Ryoichi Fujiwara, Yoshihiro Maruo, Shujuan Chen, and Robert H. Tukey. Role of extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1: Advances in understanding breast milk-induced neonatal hyperbilirubinemia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 289:124-32 (2015). 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 坂本 聖弥, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, ニコチンによる脳内 UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) 発現量の調節, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25 日-28 日, 神戸
2. 久津野 友貴, 平島 梨夏, 坂本 聖弥, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, 脳におけるヒ

ト UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の発現と機能解析 ~ヒト化 UGT1 マウスを用いて~, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25 日-28 日, 神戸

3. 久津野 友貴, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の誘導が新生児期甲状腺ホルモン機能に及ぼす影響, 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム, 2015 年 8 月 6 日-7 日, 相模原
4. Ryoichi Fujiwara. Importance of extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 in bilirubin metabolism. Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society 2015 DPhG, 2015 年 9 月 23 日-25 日, Dusseldorf, Germany
5. 久津野 友貴, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, 周産期における UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導が神経発達に及ぼす影響, 第 9 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2015 年 11 月 7 日-8 日, 千葉
6. 藤原 亮一, 久津野 友貴, 伊藤 智夫, UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 の誘導によるチロキシン代謝の亢進および神経発達障害, 日本薬物動態学会第 30 回年会, 2015 年 11 月 12 日-14 日, 東京
7. 久津野 友貴, 藤原 亮一, 伊藤 智夫, UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 の誘導が周産期の神経発達に及ぼす影響, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日-29 日, 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 亮一 (FUJIWARA, Ryoichi)  
北里大学・薬学部・講師  
研究者番号: 40631643

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし