

平成22年6月1日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590119
 研究課題名(和文) 環境化学物質が誘発するヘム代謝異常モデル動物における概日リズム障害の評価
 研究課題名(英文) Evaluation of Circadian Rhythm Disturbances in Mice Models with Impaired Heme Biosynthesis Induced by Environmental Chemicals
 研究代表者
 光本 篤史(MITSUMOTO ATSUSHI)
 城西国際大学・薬学部・教授
 研究者番号：00276164

研究成果の概要(和文)： 化学物質誘発ポルフィリン症モデルマウスを作製し、その性状解析を行った。代謝生化学的な変化や臓器障害などを指標に、肝性ポルフィリン症モデルを確立したほか、急性ポルフィリン症と関係の深い精神神経症状について、本モデルを用いて発症を確認できることを明らかにした。また、神経作動性薬物に対する感受性が変化すること、薬物体内動態に変化が起きない状態で、神経系の可塑的变化が生じている可能性を見出した。さらに概日行動リズムおよび体温リズムを測定し、概日リズム位相の前進というリズム異常が現れること、またこれら概日リズム異常は、ポルフィリン症治療薬のヘムの投与により、改善することを明らかにした。結論として、我々はヘム代謝異常を示すポルフィリン症モデルマウスが、行動や体温で示される概日リズムの位相が前進するというリズム異常を呈することを証明した。

研究成果の概要(英文)： We have developed a mouse model of hepatic porphyria induced by ingestion of a chemical substance, griseofulvin (GF), and analyzed the characterization of biochemical and behavioral phenotypes of the porphyria model mice. The porphyria mice exhibited tremendous accumulation of aminolevulinic acid (ALA) and porphyrins as heme precursors, and also had symptoms, such as liver injury and skin inflammation. In addition, they exhibited several neurological and psychological behaviors, such as anxiety and depression, typically observed in acute porphyria. Moreover, we found that these mice had differential sensitivities to psychological drugs, such as diazepam, comparing to the control mice, without any difference in the pharmacokinetics. Furthermore, circadian activity and temperature rhythms of these mice exhibited phase-advances by a few hours. The abnormal circadian rhythms were ameliorated by the treatment of heme. In conclusion, we demonstrated heme-regulated abnormality of circadian rhythms in the mice model of hepatic porphyria induced by GF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H18年度	1,200,000	0	1,200,000
H19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
H20年度	600,000	180,000	780,000
H21年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	690,000	4,190,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・環境系薬学

キーワード： 概日リズム 生物時計 ポルフィリン症 ヘム 環境化学物質

1. 研究開始当初の背景

(1) ヘムは生体に必須な補因子であるが、最近では転写制御因子の調節など、新たな機能があることが示されている。ヘムの新たな機能の一つに、時計遺伝子発現の調節がある。しかし細胞レベルでは遺伝子発現調節が証明されていること、動物個体にヘムを投与して概日リズムへの影響を調べていることなどはあるものの、個体の病態生理的な状況下で生物時計あるいは概日リズムに及ぼすヘムの影響は調べられていなかった。ヘムの新たな機能の側面として、GABA_A受容体に対する内因性アゴニスト作用がある。これについては細胞レベルの実験しか証明されていないが、個体レベルで GABA_A受容体がかかわる神経症状の発現がヘムによって制御されていることを示すことは、ポルフィリン症などの精神神経様症状を示す疾患の原因解明につながることを期待される。

(2) ヘムの生合成は、8段階の酵素反応により成立している。そのうち多くの酵素遺伝子について、変異や欠損が遺伝的に証明され、いずれもヘム前駆体の蓄積を伴うことから、ポルフィリン症として知られている。ポルフィリン症には、光増感能を有するポルフィリン体の蓄積を主とし、光線過敏症などの皮膚症状を呈する皮膚型ポルフィリン症と、ALAやポルフォビリノーゲンなどの前駆体の蓄積を主とし、精神神経症状を呈する急性ポルフィリン症とがある。このうち急性ポルフィリン症においては、その発症メカニズムなどがほとんど解明されておらず、有効な治療薬も海外生産品のヘムの静脈内投与以外に方法がないのが現状であった。

(3) ポルフィリン症は、遺伝子疾患ではあるものの、ホルモンや環境化学物質により発症が誘発されること、また環境因子単独によってもポルフィリン症が発症されることが知られている。これまでに動物モデルとして、抗真菌薬グリセオフルビンやジフェニルエーテル系除草剤によってポルフィリン症モデル動物が作成されていた。しかし、遺伝子変異動物を含め、ポルフィリン症モデル動物において、急性ポルフィリン症に見られる精神神経様症状を的確に確認した例はなく、そのような実験モデル系の構築は、ポルフィリン症の発現基序の解明並びに有効な治療薬の作成に向けて重要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、環境化学物質がもたらすポルフィリン症モデルマウスを再構築し、従来の生化学的变化に加え、精神神経症状についても測定評価する。

(2) GABA_A受容体がかかわる薬理作用に関して、ポルフィリン症モデルマウスの症状について解析する。

(3) ポルフィリン症モデルマウスの概日リズムを調べ、ヘム代謝が低下する個体において、概日リズムの変化が現れるか検討する。

3. 研究の方法

(1) グリセオフルビン(GF)誘発ポルフィリン症モデルマウスの作製

雄性ICRマウス5週齢に、それぞれ0、0.5、2%GFを含む粉末飼料を摂取させ、ポルフィリン症マウスとする。GF摂取マウスをGF0.5およびGF2.0と称し、対照マウスはHC(High Carbohydrate)と表す。

(2) ヘムおよびヘム生合成前駆体の定量

ヘムは、肝ミクロソーム画分におけるP450量を定量することにより、蛋白質あたりのP450量として表した。肝の摘出並びにミクロソーム画分は、定法に従い調製した。

ヘム生合成前駆体のうち、ALAは尿中から、コプロポルフィリンとプロトポルフィリンは糞中から定量した。それぞれの試料は定法に従い処理し、ALAは吸光度法、ポルフィリン体はHPLC-FD法を用いて、定量測定した。

(3) 肝障害、皮膚障害、精神神経症状の評価

肝障害は、血中肝障害マーカー(AST、ALT、ALP)および肝臓の組織染色にて、評価した。

皮膚障害は、耳介の炎症を厚み測定により評価した。

精神神経症状については、不安症状を明暗箱試験、うつ症状を強制水泳試験により評価した。

(4) 薬理作用の評価

ジアゼパム作用の評価については、次のような作用と測定方法の組み合わせにより実施した。鎮静作用：オープンフィールド試験の活動量、筋弛緩作用：懸垂試験および傾斜板試験、抗けいれん作用：ストリキニーネ誘

発けいれん潜時、抗不安作用：明暗箱試験、アルコール睡眠の延長作用：エタノールによる正向反射消失時間。

(5)概日リズムの評価

輪回し行動装置により、活動休止リズムを測定した。体温リズムの測定は、送信機を腹腔内に保持したマウスを用いて、トランシーバーシステムにより体温リズムの測定を行った。体温リズムの測定時には、同時に赤外線による行動測定を行った。これらのリズムデータをもとに、コサイナー法を用いて、リズム指標、特に頂点位相のデータ解析を行った。

4. 研究成果

(1)GF 誘発肝性ポルフィリン症モデルマウスの作製と精神神経症状を含む性状解析

GF 摂取マウスについて、尿中糞中代謝物の分析、血液生化学的解析、臓器レベルの生化学的・病理的解析などを行い、肝性ポルフィリン症マウスとして条件を確立した。そのうえで急性ポルフィリン症と関係の深い、不安症状やうつ症状などの精神神経症状について、本モデルを用いて行動レベルで定量化できることを確認し、業績 4 に発表した。

(2)GF 誘発肝性ポルフィリン症モデルマウスのジアゼパムに対する感受性変化

GF 誘発ポルフィリン症マウスモデルを用いて、GABA_A 受容体アゴニストであるジアゼパムに対する感受性を検討した結果、GF 摂取 4 日目には見られない変化が、GF 摂取 8 日目で起こること、この変化の多くはジアゼパムに対し感受性が高まる変化を示すものの、アルコールによる催眠作用の延長作用に関してだけは、薬物感受性が低下することを明らかにした。これらの作用は、ヘムの投与により減弱することから、内因性ヘムの低下が引き起こしていることが示唆された。さらに、薬物動態学的変化は、GF 摂取 4 日目ですでに活性代謝物が対照動物に比べ 3-4 倍増大することが確認されたが、4 日目と 8 日目の動物間では差が見られなかった。以上の結果を総合し、GABA_A 受容体を介する神経作用に関して、神経系の可塑的变化が生じている可能性を見出した。

(3)GF 誘発肝性ポルフィリン症モデルマウスの概日リズム

GF 誘発肝性ポルフィリン症モデルマウスを用いて、その概日リズム性を検討した。その結果、概日行動リズムおよび体温リズムにおいて、リズム位相の前進というリズム異常が現れること、またこれら概日リズム異常は、

ポルフィリン症治療薬へのヘムの投与により、改善することを明らかにした。ヘム代謝異常を示すポルフィリン症モデルマウスが、行動や体温で示される概日リズムの位相が前進するというリズム異常を呈することを証明した。

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 6 件)

① Yamazaki T, Hirose A, Sakamoto T, Okazaki M, Mitsumoto A, Kudo N, Kawashima Y, Peroxisome proliferators attenuate free arachidonic acid pool in the kidney through inducing lysophospholipid acyltransferases. *J Pharmacol Sci*, 査読有、111(2)、2009、201-10.

② Choi WS, Mitsumoto A, Kochevar IE, Involvement of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced tropoelastin expression by human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 査読有、85(6)、2009、1425-33.

③ Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A, Efficacy of urine bile acid as a non-invasive indicator of liver damage in rats. *J Toxicol Sci*, 査読有、34(1)、2009、27-38.

④ Satoh Y, Iwadate R, Watanabe Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A, Manifestation of psychiatric behaviors in a mouse model of griseofulvin-induced hepatic porphyria. *J Toxicol Sci*, 査読有、33(5)、2008、599-608.

⑤ Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A, Temperature rhythm reentrains faster than locomotor rhythm after a light phase shift. *Physiol Behav*, 査読有、88(4-5)、2006、404-10.

⑥ Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A, Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 査読有、290(5)、2006、R1276-83.

[学会発表] (計 10 件)

① 渡邊ゆきの、佐藤陽子、石橋拓也、河合洋、光本篤史、ポルフィリン症モデルマウスにおける薬物感受性の差異と GABA_A 受容体の関連について、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月、岡山)

②光本篤史、ヘム代謝異常と概日リズム障害、日本薬学会関東支部大会（2009年10月、坂戸）

③渡邊ゆきの、佐藤陽子、石橋拓也、河合洋、光本篤史、肝性ポルフィリン症マウスにおけるGABA_A受容体モジュレーターによる催眠作用の低下、第6回アジア睡眠学会・日本睡眠学会第34回定期学術集会・第16回日本時間生物学会学術大会（2009年10月、大阪）

④岩館怜子、佐藤陽子、石橋拓也、河合洋、増野匡彦、光本篤史、ヘム代謝異常マウスにおける概日リズム障害、第6回アジア睡眠学会・日本睡眠学会第34回定期学術集会・第16回日本時間生物学会（2009年10月、大阪）

⑤渡邊ゆきの、河合洋、光本篤史、肝性ポルフィリン症マウスにおけるジアゼパムに対する感受性の差異、第82回日本薬理学会年会（2009年3月、横浜）

⑥Atsushi MITSUMOTO, Yukino WATANABE, and Hiroshi KAWAI, Differential Response of Hepatic Porphyrin Mice to Administration of Diazepam. 第8回国際ポルフィリン・ヘムシンポジウム（2008年10月、松江）

⑦佐藤陽子、河合洋、光本篤史、ポルフィリン症モデルマウスにおける行動異常、フォーラム2007・衛生薬学・環境トキシコロジー（2007年11月、大阪）

⑧Yoko Satoh, Hiroshi Kawai, Atsushi Mitsumoto, Pathophysiologic characterization in Griseofulvin-induced porphyria mice. 8th ISSX（2007年10月、仙台）

⑨佐藤陽子、河合洋、光本篤史、ポルフィリン症モデルマウスにおける肝機能変化と運動機能障害、日本薬学会第127年会（2007年3月、富山）

⑩佐藤陽子、河合洋、光本篤史、グリセオフルビン誘発ポルフィリアモデルマウスにおける運動機能障害、フォーラム2006・衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム（2006年10月、東京）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jiu.ac.jp/pharmacy/faculty/index.html#name17>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光本篤史 (MITSUMOTO ATSUSHI)

城西国際大学・薬学部・教授

研究者番号：00276164

(2) 研究分担者

佐藤陽子 (SATO YOKO)

城西国際大学・薬学部・助手

研究者番号：90348178

2006-2007

(3) 連携研究者

河合洋 (KAWAI HIROSHI)

城西国際大学・薬学部・講師

研究者番号：20321854

2006-2009

石橋拓也 (ISHIBASHI TAKUYA)

城西国際大学・薬学部・助手

研究者番号：20555825

2009-

(4) 研究協力者

渡邊ゆきの (WATANABE YUKINO)

城西大学大学院・薬学研究科・大学院生

2008-2009

岩館怜子 (IWADATE REIKO)

慶應義塾大学大学院・薬学研究科・大学院生

2009-