

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590151
 研究課題名 (和文) 解毒酵素発現機構に関わる転写調節因子に着目した新視点からの糖毒性発現機序の解明
 研究課題名 (英文) Mechanism of carbohydrate toxicity induction and its association with transcription factors involved in expression of xenobiotics-metabolizing enzymes
 研究代表者 三輪 匡男 (MIWA MASAO)
 静岡県立大学・薬学部・名誉教授
 研究者番号:10046287

研究成果の概要：

高脂肪食摂食等による栄養状態や糖尿病等の病態時に薬物代謝能が変化し、薬物（代謝物）による酸化ストレスの原因となり薬物副作用が惹起されることを提唱してきた。高カロリー食摂餌で亢進する血清 TG レベル、肝 TG および総コレステロール含量、門脈血グルコースレベル、転写因子 SREBP1c や *Fatty acid synthase* mRNA レベルが酵素合成イヌリン摂取により抑制され、肝臓に運搬される糖レベルの低下が抗肥満効果に結びついたと推察された。さらに高脂肪・高糖質食摂餌ラット肝臓における核内 CAR、PPAR α の発現亢進が UGT1A1、UGT1A6 の発現を誘導し、薬物動態に影響をおよぼすことを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：解毒酵素、転写調節因子、転写調節、糖毒性、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

食後の血糖値上昇（食後高血糖）が総死亡相対危険度と相関するなど食後の高い血糖値が「糖毒性」と呼ばれる糖代謝の悪循環を引き起こし、血管への酸化作用を引き起こし血管壁障害へと連鎖的病態を進展させる、「食後高血糖」の重要性が報告されている。我が国においても肥満、食生活の欧米化などにより、栄養過多による生活習慣病発症リスクが高まっている。

臨床現場においても、脂肪肝や糖尿病患者の薬物代謝能が変化し、薬物副作用や薬物

(代謝物) による酸化ストレス発現原因となっていることが指摘されてい

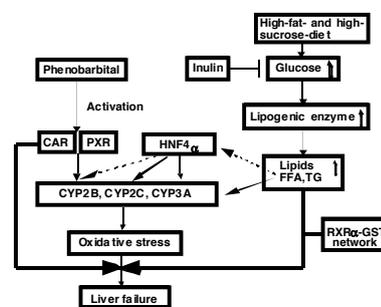


図1 食後高血糖時における肝臓異物代謝酵素誘導

る。これらの知見は、糖尿病を代表とするメ

タボリックシンドロームでは健常時とは異なる体内環境変化に連動して核内受容体の発現、機能が変化し薬物代謝に影響を及ぼしていることが推定される。課題担当者は高栄養状態で長期に飼育した実験動物を用い、またメタボリックシンドローム患者の体内環境類似条件下で培養したヒト肝臓、大腸、膵臓細胞を用いた薬物代謝能制御機構を解明する実験系を確立しており、詳細が不明であったメタボリックシンドロームで頻発する薬物肝障害の病態を分子レベルで解析し、新規な視点からの糖毒性について研究を展開した。

2. 研究の目的

これまで糖毒性の解析に糖化蛋白質の増大、血管壁細胞の脆弱性亢進、PPAR γ 、SREBP1c等の転写因子と結びついた脂質代謝異常の観点から研究が進められてきたが、異物代謝異常に基づく糖毒性機序の研究は未解明な分野である。またストレプトゾトシンで惹起した糖尿病モデルを用いるなど、肝機能の解析モデルとして特殊な条件下での実験系で解析されてきたが、課題担当者は高栄養状態で長期に飼育した実験動物を用い、またメタボリックシンドローム患者の体内環境類似条件下で培養したヒト肝臓、大腸、膵臓細胞を用いた薬物代謝能制御機構を解明する実験系を確立しており、詳細が不明であったメタボリックシンドロームで頻発する薬物肝障害の病態を分子レベルで解析し、解毒酵素発現機構に関わる転写調節因子に着目した新視点からの糖毒性機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 肥満、糖尿病病態モデル動物を用いた異物代謝に関わる酵素誘導等の生体順応機構の解析：我々は高カロリー食の長期摂取による肥満ラットを作製している。薬物肝障害発症防止評価法の確立に向け、これら病態モデル動物を用いて、*in vivo*における肥満関連遺伝子、異物代謝酵素誘導の遺伝子転写制御機構を明らかにする。

(2) 生体リスク軽減に繋がる機能タンパク分子の産生制御に焦点を当てた酵素合成イヌリンの新規な機能の解明 食品添加物として知られている合成イヌリンは天然イヌリンと比較して重合度 (DP) が均一に制御

されており、その生理機能面の有用性 (血中脂質低減および血糖上昇抑制など) を我々はこれまでに明らかにしてきた。本研究では、合成イヌリンの分子サイズの均一性を利用して、抗肥満作用、肝機能障害改善作用における短、中、長の鎖長を持つイヌリンの効果を検討するとともに、新たな視点から生活習慣病患者の肝等組織の機能障害防止効果を明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

(1) 肥満、糖尿病病態モデル動物を用いた異物代謝に関わる酵素誘導等の生体順応機構の解析

① 栄養状態による雄性ラット肝グルクロン酸抱合酵素 UGT の発現変動

標準食で飼育したラットと比べ、高脂肪・高糖質食 (HF1) で2、4、8週間飼育したラットおよび高脂肪食 (HF2) で8週間飼育したラットでは肝臓重量、肝体重重量比、肝臓トリアシルグリセロール、肝臓総コレステロール、肝臓遊離脂肪酸レベルの顕著な増大が認められ、高脂肪・高糖質食 (HF1) で飼育したラットは高脂肪食 (HF2) で8週間飼育したラットよりもそれら変動はより顕著であった。高脂肪・高糖質食で2、4、8週間飼育したラットにおいてCYP1As蛋白質発現レベルの減少、UGT1A1蛋白質発現レベルの増大およびUGT1A6蛋白質発現レベルの増大傾向は、高脂肪・高糖質食摂餌2週間から認められた。非アルコール性肝障害発症時に強く発現し、過酸化脂質の生成に関わるCYP2E1、CYP4A発現レベルは高脂肪・高糖質食で飼育しても増大は認められなかったが、高脂肪食で8週間飼育するとCYP2E1、CYP4A発現レベルの顕著な増大が認められた (Fig. 1)。

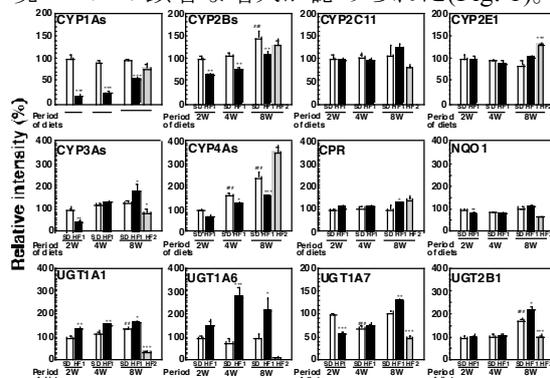
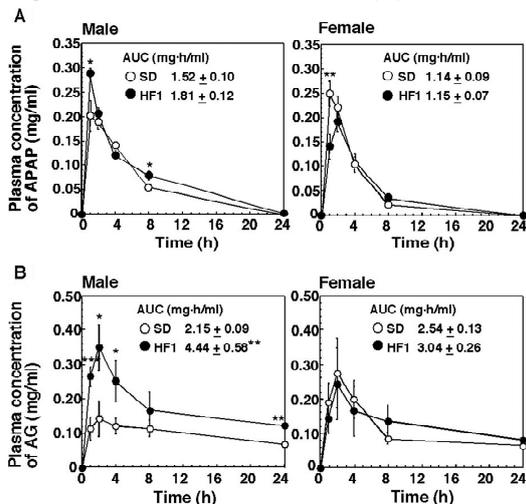


Fig. 1. Effects of HF1 diet and HF2 diet on expression of hepatic drug-metabolizing enzyme proteins in male rats.

②アセトアミノフェンは解熱、鎮痛剤として広く臨床に供されている薬物である。アセトアミノフェンの常用量を服用した場合、大半がグルクロン酸抱合転移酵素によって代謝される。高脂肪・高糖質食摂餌群で認められたグルクロン酸抱合酵素 UGT1A1、UGT1A6 発現レベルの亢進が、グルクロン酸抱合により代謝されるアセトアミノフェン (APAP) の体内動態に影響を及ぼすか明らかにするため、アセトアミノフェン、アセトアミノフェングルクロン酸抱合体の血中濃度を解析した。

Fig. 2. Plasma levels of APAP (A) and its AG



(B) in male and female rats fed SD or HF1 diet for 4 weeks and then administered APAP (500 mg/kg).

7 週齢の雌雄ラットに高脂肪・高糖質食を 4 週間摂餌させ、アセトアミノフェンを 500 mg/kg 腹腔内投与した後、尾静脈から経時的に採血し、血漿試料を用いてアセトアミノフェン体内動態について液体クロマトグラフィーで解析した結果を Fig. 2 に示した。雄性ラット高脂肪・高糖質食摂餌群で、雄性ラット普通食摂餌群に対し投与 1 時間後のアセトアミノフェン血中濃度の有意な増大が認められたが、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) の有意な増大は認められなかった。同様に、雌性ラットでも高脂肪・高糖質食の摂餌による AUC の有意な変動は認められなかった。一方、アセトアミノフェングルクロン酸抱合体の AUC は UGT1A1、UGT1A6 の蛋白質発現レベルの増大と相関して、雄性ラット高脂肪・高糖質食摂餌群で、雄性ラット普通食摂餌群に対し 2.1 倍に増大していたが、雌性ラットでは高脂肪・高糖質食摂餌によるグルクロン酸抱合体の AUC に有意な変動は認めら

れず、雄性ラット高脂肪・高糖質食摂餌群で認められた UGT1A1、UGT1A6 発現レベルの増大がグルクロン酸抱合転移酵素によって代謝されるアセトアミノフェンの薬物動態に影響したと考えられた。

③高脂肪・高糖質食で長期間 (4 週間) 飼育した雌雄ラットの肝臓における核内転写調節因子の発現レベルの変動 高脂肪・高糖質食で長期に飼育したラットの肝臓における核内転写因子の発現レベルの変動を解析した結果、普通食で飼育した雌雄ラットの CAR、PXR、RXR、AhR、ARNT、HNF1 α 、HNF4 α 、PGC1 α の核内転写調節因子の蛋白質発現レベルに有意な差は認められなかった。CAR 核内蛋白質発現レベルは雄性ラット高脂肪・高糖質食摂餌群で雄性ラット普通食摂餌群に対し有意な増大が認められた。また雄性ラット高脂肪・高糖質食摂餌群の PPAR α 核内蛋白質発現レベルが雄性ラット普通食摂餌群に比し 1.6 倍に増大したが、PXR、RXR、Nrf2、PPAR γ 、AhR、ARNT、HNF1 α 、HNF4 α 、PGC1 α の核内蛋白質発現レベルの有意な変動は認められなかった。

クロフィブレードの投与によりコントロールに対し、肝臓での CYP1A2 蛋白質発現レベルが 20% にまで低下した。さらに、クロフィブレードの投与により肝臓での UGT1A1、UGT1A6 蛋白質発現レベルがそれぞれ 1.8 倍、1.9 倍に増大し、その誘導率は Zhou らが報告した PPAR α を介した CYP4A の誘導と同程度であったことから、高脂肪・高糖質食群で認められた CYP1A1 の蛋白質発現レベルの低下、および UGT1A1、UGT1A6 蛋白質発現レベルの顕著な増大は CAR および PPAR α を介した誘導であることが示唆された。

(2) 生体リスク軽減に繋がる機能タンパク分子の産生制御に焦点を当てた酵素合成イヌリンの新規な生体機能の解明

① 高脂肪・高糖質食摂餌動物における酵素合成イヌリン摂取、クロフィブレードやフルバスタチン併用による脂肪蓄積抑制効果

5% 合成イヌリン含有高脂肪高糖質食を 3~12 週間摂餌させたラットでは、高脂肪高糖質食 (HF1) 摂餌による体重、血清、肝 TG レベルの増大が有意に抑制された。糖鎖長の異なる 3 種のイヌリン (DP = 6~8、16~17、30) とデンプン由来難消化性デキストリンの抗肥満効果を比較したところ、HF1 食摂餌群で見られた血清 VLDL TG、肝 TG および総

コレステロール含量上昇の抑制、門脈血グルコースレベル上昇の抑制、血清インスリンレベル上昇の抑制、アディポネクチンレベル低下の抑制、門脈血短鎖脂肪酸（プロピオン酸）レベル低下の抑制などの効果が DP = 16~17 の合成イヌリン摂取時に最も効果的に認められた。合成イヌリンとクロフィブレートとの併用効果は認められなかったが、クロフィブレートと比べより強い脂肪蓄積抑制効果、肝臓 TG 蓄積抑制効果、血清 VLDL リポタンパク質 TG 蓄積抑制効果が示された (Fig. 3)。合成イヌリンとフルバスタチンとの併用により普通食 (SD) ,HF1 摂食群においてより顕著な血清 TG レベルの減少が認められた。合成イヌリン摂取により認められた

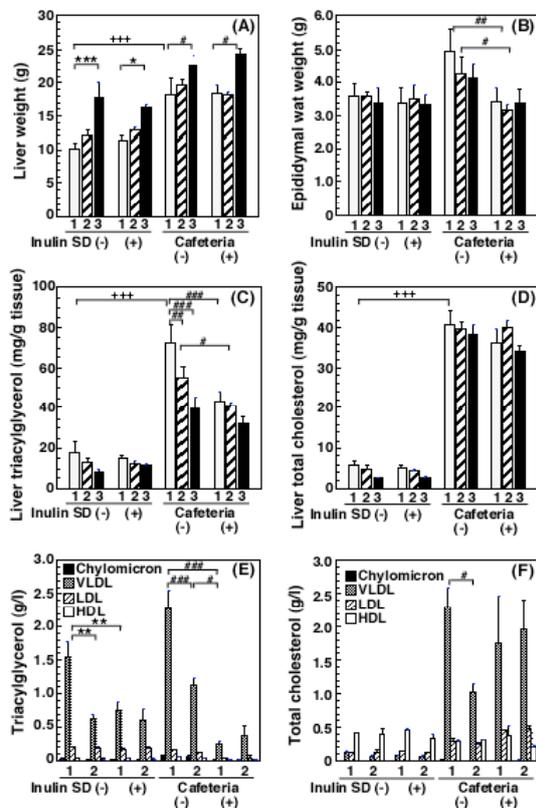


Fig. 3 Comparison of synthetic inulin (average DP=16~17) and clofibrate effects on tissue weights and lipid profiles in the liver and circulating serum lipoproteins in SD and cafeteria rats.

抗肥満作用の生体内分子機構として、高脂肪高糖質食摂取下に発現亢進する脂肪酸合成律速酵素 *acetyl-CoA carboxylase* mRNA ならびに脂肪合成酵素 *Fatty acid synthase* mRNA レベルの抑制と高脂肪高糖質食摂取

下に発現が低下する脂肪酸酸化に關与す酵素 *carnitine palmitoyltransferase 1A* mRNA レベルの回復に起因していることを強く示唆する結果が得られた。また門脈血漿中短鎖脂肪酸を分析したところ、プロピオン酸量、酪酸量がともに HF1 食摂取群で有意に減少していたが、合成イヌリン摂取により酪酸量では顕著な改善は認められなかったが、プロピオン酸量の減少が改善され、肝臓脂質蓄積抑制作用に短鎖脂肪酸の肝臓への流入量低下の改善作用が寄与している可能性が示唆された。

特に DP = 16~17 の合成イヌリンは、門脈血漿グルコースレベルおよびインスリン分泌を抑制することにより、高カロリー摂食時の過剰なエネルギー吸収や蓄積を抑え、効果的な肥満予防が期待できる添加物として有用であると期待される。

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 11 件)

1. Makoto Osabe, Junko Sugatani, Akiko Takemura, Masatoshi Kurosawa, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, Masao Miwa: Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress. *FEBS Letters*, 583(5), 885-889 (2009) [IF 3.263]
2. J. Sugatani, M. Osabe, T. Wada, K. Yamakawa, Y. Yamazaki, T. Takahashi, A. Ikari, M. Miwa: Comparison of enzymatically synthesized inulin, resistant maltodextrin and clofibrate effects on biomarkers of metabolic disease in rats fed a high-fat and high sucrose (cafeteria) diet. *Eur. J. Nutr.*, 47(4), 192-200 (2008) [IF 2.356]
3. M. Osabe, J. Sugatani, A. Takemura, Y. Yamazaki, A. Ikari, N. Kitamura, M. Negishi, M. Miwa: Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 is associated with cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369 (4), 1027-1033 (2008) [IF 2.855]
4. A. Ikari, C. Okude, H. Sawada, Y.

- Yamazaki, **J. Sugatani**, **M. Miwa**: TRPM6 expression and cell proliferation are up-regulated by phosphorylation of ERK1/2 in renal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369(4), 1129-1133 (2008) [IF 2.855]
5. T. Takahashi, Y. Moriyama, A. Ikari, **J. Sugatani** T. Suzuki, **M. Miwa**: Surface localization of the nuclear receptor CAR in influenza A virus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368(3), 550-555 (2008) [IF 2.855]
 6. T. Sueyoshi, R. Moore, **J. Sugatani** Y. Matsumura, M. Negishi: PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1b, signals nuclear translocation of the nuclear receptor CAR. *Mol. Pharmacol.*, 73(4), 1113-1121 (2008) [IF 4.469]
 7. M. Osabe, **J. Sugatani**, T. Fukuyama, S. Ikushiro, A. Ikari, **M. Miwa**: Constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α are activated in liver of male rats fed a high-fat and high-sucrose diet and the hepatic expression of UGT1A1 and UGT1A6 is enhanced. *Drug Metab. Dispos.*, 36(2), 294-302 (2008) [IF 3.638]
 8. **J. Sugatani**, K. Mizushima, M. Osabe, K. Yamakawa, S. Kakizaki, H. Takagi, M. Mori, A. Ikari, **M. Miwa**: Transcriptional regulation of human *UGT1A1* gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the *UGT1A1* gene promoter. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377 (4-6), 597-605 (2008) [IF 2.779]
 9. A. Ikari, M. Ito, C. Okude, H. Sawada, H. Harada, M. Degawa, H. Sakai, T. Takahashi, **J. Sugatani**, **M. Miwa**: Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase α independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *J. Cell Physiol.*, 214(1), 221-229 (2008) [IF 3.638]
 10. A. Ikari, C. Okude, H. Sawada, Y. Sasaki, Y. Yamazaki, **J. Sugatani**, M. Degawa, **M. Miwa**: Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1778(1), 283-290 (2008) [IF 3.587]
 11. A. Ikari, C. Okude, H. Sawada, T. Takahashi, **J. Sugatani**, **M. Miwa**: Down-regulation of TRPM6-mediated magnesium influx by cyclosporine A. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377 (4-6), 333-343 (2008) [IF 2.779]
- [学会発表] (計 10 件)
1. 定光慧、今西正樹、長部誠、和田正、山崎泰広、五十里彰、萱谷純子：酵素合成イヌリンと抗高脂血症薬併用による抗肥満作用と薬物代謝酵素発現に及ぼす影響の解析
日本薬学会第 129 年会 (京都)、講演要旨集 3、p.189、2009 年 3 月 28 日
 2. **Junko Sugatani**, Makoto Osabe, Satoshi Sadamitsu, Masaki Imanishi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, **Masao Miwa** : Comparison of enzymatically synthesized inulin, clofibrate and fluvastatin effects on biomarkers of metabolic disease and drug metabolism in rats fed standard and cafeteria diets.
1st International conference on health and longevity sciences, Yaku-shoku Dogen, 'Medicine and food, sharing a common origin, University of Shizuoka, p.41、2008 年 12 月 18-19 日
 3. **萱谷純子**:メタボリックシンドロームと薬物代謝:酵素合成イヌリン摂取による脂肪肝形成時に認められる肝機能障害抑制効果 第13回静岡健康・長寿学術フォーラム「元気の血管で健康な長寿を-老いは血管に始まる」、グランシップ(静岡)、pp. 10-11、2008年11月7日
 4. 山崎泰広、長部 誠、松井久美子、鎌田修二、近江明大、竹村明子、五十里彰、**萱谷純子**、**三輪匡男**：高カロリー食摂取ラットにおける肝コレステロールトランスporter Abcg5/8発現変動の解析
日本薬学会第 128 年会 (横浜)、講演要旨集 3、p. 115、2008 年 3 月 27 日
 5. **萱谷純子**、和田 正、長部 誠、鎌田修二、近江明大、石川智子、山崎泰広、五十里彰、**三輪匡男**：酵素合成法によるイヌリンの抗肥満作用機構の解析

- 日本薬学会第 128 年会 (横浜)、講演要旨集 3、p.59、2008 年 3 月 27 日
6. **長部誠、菅谷純子、福山知哲、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男**：脂肪肝形成モデル動物の薬物動態－アセトアミノフェングルクロン酸抱合反応の亢進
第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2007 年 12 月 15 日
 7. **水嶋康介、菅谷純子、長部誠、福山知哲、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男**：高カロリー食の摂取により脂肪肝を形成したラット肝臓のグルクロン酸抱合酵素 UGT1A1、UGT1A6 の発現亢進は核内受容体 CAR、PPARα の活性化に起因する
BMB2007、第 80 回日本生化学会大会 (横浜)、p. 332、2007 年 12 月 11 日
 8. **菅谷 純子**：高栄養状態で長期に飼育したラットの肝薬物代謝酵素／トランスポーターの発現変動について
第 10 回 P450 研究会、第 2 回 UGT 研究会 合同開催 (富山)、2007 年 7 月 21 日
 9. **長部誠、菅谷純子、福山知哲、山崎泰広、高橋忠伸、五十里彰、三輪匡男**：高脂肪高糖質食で飼育したラット肝薬物代謝酵素／トランスポーターの発現変動について
第 53 回日本薬学会東海支部総会・大会 (名古屋)、講演要旨集、p. 28、2007 年 7 月 7 日
 10. Makoto Osabe, Junko Sugatani, Tadashi Wada, Tadanobu Takahashi, Akira Ikari, Masao Miwa: Dietary inulin alleviates hepatic steatosis and xenobiotics-induced liver injury in rats fed a high-fat and high-sucrose diet: Association with the suppression of hepatic cytochrome P450 and HNF4a expression.
The 5th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, International Receptor Symposium, Shizuoka, Japan, p.109, May 10-11, 2007

[図書] (計 1 件)

1. **菅谷純子、三輪匡男**：加水分解酵素 3.1.4.39～3.1.4.51、4.6.1.14 「酵素ハンドブック (第 3 版)」八木達彦、福井俊郎、一島英治、鏡山博行、虎谷哲夫編集

朝倉書店、pp. 557-559、p.832 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 匡男

(2) 研究分担者

菅谷 純子

(3) 連携研究者

なし