

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591020

研究課題名（和文） 環境化学物質による核内受容体 SXR を介した骨代謝調節作用の検討

研究課題名（英文） Effects of Environmental Chemicals on Bone Metabolism through Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR)

研究代表者

竹下 章 (TAKESHITA AKIRA)

公益財団法人 冲中記念成人病研究所 研究員

研究者番号：20322646

研究成果の概要（和文）：薬剤添加物は長期間・相当量が生体に暴露されうる化学物質であるが、ビタミンD代謝への影響は不明である。オーファン核内受容体SXRは、肝臓や腸管に発現し、活性型ビタミンD₃の分解酵素のひとつであるCYP3A4の転写調節を行っている。我々が検討した8種類の薬剤添加物のうち4種類でSXRの転写刺激活性が認められた。特にアセチルトリブチルクエン酸(ATBC)に強い転写活性が認められ、ラット腸管でCYP3A4の酵素誘導が生じることが確認された。ATBCは食品ラップ、玩具、食品添加物などにも頻用されている。ATBCによる腸上皮細胞における活性型ビタミンD₃代謝の亢進は、腸粘膜からのカルシウム吸収の低下など、骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）： Steroid and xenobiotic receptor (SXR) is activated by endogenous and exogenous chemicals. SXR is highly expressed in the liver and intestine, where it regulates CYP3A4, which in turn controls xenobiotic and endogenous hormone metabolism including active vitamin D. However, it is unclear whether drug additives exert such activity. We found that four of eight drug additives increased SXR-mediated transcription. In particular, acetyl tributyl citrate (ATBC), an industrial plasticizer widely used in products such as food wrap, vinyl toys, and pharmaceutical excipients, strongly activated SXR. Our *in vitro* and *in vivo* results suggest that ATBC specifically induces CYP3A in the intestine by activating SXR. We suggest that ATBC-containing products be used cautiously because they may alter metabolism of vitamin D.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

活性型ビタミンD₃の分解・代謝は、腎では CYP24A1 が、肝・腸管では CYP3A4 等の薬物代謝酵素が主に関与している。オーファン核内受容体 SXR は、肝臓や腸管に発現し、CYP3A4 の転写調節をおこなっている。CYP3A4 の酵素誘導をおこなす抗結核薬のリファンピシン (RFP) や抗癲癇薬のフェニトイン等は SXR にリガンドとして結合し、CYP3A4 の転写を活性化することで、薬物相互作用の原因となるが、内因性のホルモン代謝にも影響を与える。例えば上記薬剤の長期連用は慢性的な CYP3A4 の誘導により活性型ビタミンD₃代謝が亢進し薬剤性骨軟化症を誘発する事が知られている。我々はこれまでビスフェノール A (樹脂) やフタル酸化合物 (可塑剤) といった環境化学物質が SXR のリガンドとして作用する事を報告したが、薬剤添加物として利用されている可塑剤があり、長期間・相当量が生体に暴露されうる。しかしながらこれら添加物の SXR のリガンド活性、さらにビタミンD代謝や骨代謝への影響は不明である。

2. 研究の目的

薬剤添加物として用いられる可塑剤の SXR のリガンド活性と、ビタミンD代謝酵素である CYP3A4 発現への影響について検討した。また SXR リガンドによるカルシウムチャンネル (TRPV6) 発現への影響についても併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いたトランスフェクションによるレポーターアッセイ：CV1 細胞にヒト SXR 発現プラスミドと CYP3A4 遺伝子プロモーター領域のレポータープラスミドをトランスフェクト後、細胞を種々の薬剤添加物の存在下で培養しルシフェラーゼ活性を測定した。
 (2) リアルタイム PCR：ヒト腸管由来細胞株の LS174T 細胞、ヒト凍結肝細胞、ヒト肝臓癌由来細胞株の HepaRG、FLC5、FLC7 を培養し種々の濃度の RFP、ATBC、あるいは 1, 25-D₃ 存在下に 24hr 培養後、cDNA を調製した。CYP3A4 mRNA または TRPV6 mRNA 発現をリアルタイム PCR にて測定し相対定量を行った。
 (3) siRNA によるノックダウン：SXR またはビタミンD受容体 (VDR) の siRNA を LS174T 細胞に導入し、CYP3A4 mRNA 発現をリアルタイム PCR にて測定し相対定量を行った。
 (4) LS174T 細胞における CYP3A4 の酵素活性の測定：LS174T 細胞を培養し、添加物を加え 48 時間後に P450-Glo (Luciferin-IPA) (Promega) を用いて、CYP3A4 の酵素活性を測

定した。

(5) ラットへの ATBC 投与：7 週齢のオス Wistar ラットの腹腔内、或いは経口的に ATBC を投与し腸管 (十二指腸、空腸、回腸) と肝臓を摘出、トータル RNA を調整しリアルタイム PCR 法で CYP3A1 発現 (ヒトの CYP3A4 に相当する) を検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤添加物として用いられる 8 種の可塑剤を用いてヒト SXR のリガンド転写活性を検討したところ、4 種の可塑剤で CYP3A4 遺伝子のプロモーター転写活性が増加した (図 1)。なかでもアセチルトリブチルケン酸 (ATBC) に最も強い転写活性を認めた。また齧歯類の SXR でも ATBC によるリガンド転写活性が認められた。米国で販売されている降圧剤のジルチアゼム徐放剤 (Cardizem CD) 中に 200 mg あたり 12.6 mg の ATBC を検出した。最大投与量を内服すると一日あたり約 20 mg の ATBC が毎日暴露されうる。

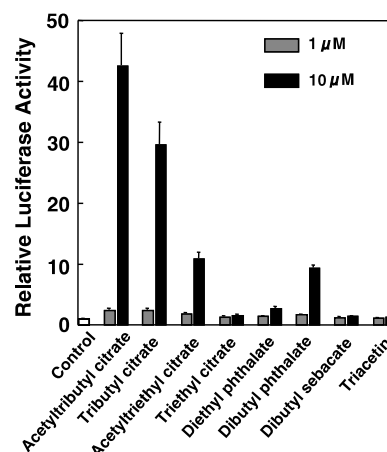


図 1

ヒト腸管由来の LS174T 細胞を培養し ATBC を添加し 24hr 後に細胞を回収しリアルタイム PCR にて CYP3A4 mRNA 発現を検討した。ATBC 添加により濃度依存性に CYP3A4 mRNA 発現が上昇した。さらに ATBC は 1, 25-D₃ と相乗的に CYP3A4 遺伝子発現を増強し VDR との相互作用が考えられた。この ATBC の効果は SXR の siRNA によるノックダウンで、また 1, 25-D₃ の効果は VDR の siRNA によるノックダウンで、それぞれ減弱したことから、それぞれの受容体を介した作用が考えられた (図 2)。また LS174T 細胞で ATBC により 1, 25-D₃ と相加的に CYP3A4 の酵素活性が増加した。

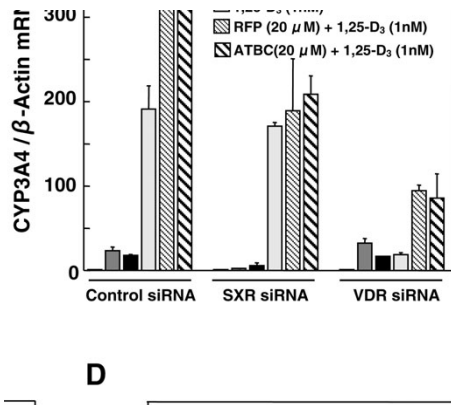


図 2

次に、ヒト凍結肝細胞と3種類ヒト肝臓由来の細胞株 (HepaRG, FLC5, FLC7) を用いて CYP3A4 mRNA 発現を検討した。いずれの細胞でも RFP では濃度依存性に CYP3A4 mRNA が増加したが、ATBC を高濃度添加してもほとんど CYP3A4 mRNA の変化は認められなかった。

続いて *vivo* での解析としてラットに腹腔内、或いは経口的に ATBC またはラット SXR のリガンドであるプレグネノロンカルボニトリル (PCN) を投与後、腸管と肝臓を摘出して CYP3A1 mRNA 発現をリアルタイム PCR で検討した。PCN 刺激により、いずれの臓器でも CYP3A1 mRNA が増加したのに対し、ATBC の投与では回腸で CYP3A1 mRNA が増加したが、肝臓では変化が認められなかった (図 3)。以上の *in vitro* と *vivo* の結果から ATBC は SXR を介して腸管特異的に CYP3A4 の酵素誘導を来すことが考えられた。

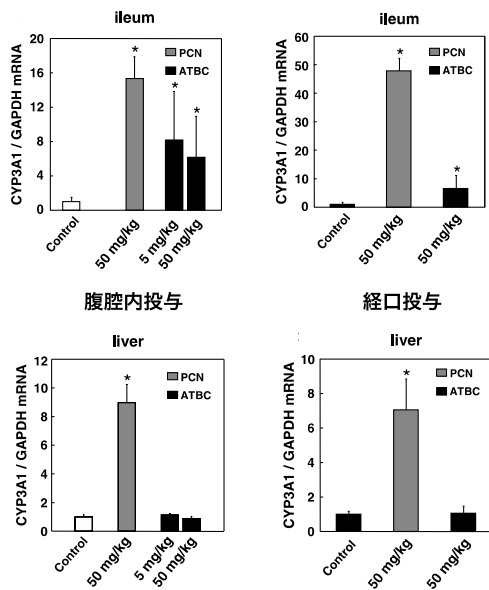


図 3

(2) 1,25-D₃ は腸粘膜で VDR を介して TRPV6 発現を増加しカルシウム吸収を促進する作用がある。LS174T 細胞を用いて RFP と 1,25-D₃ による TRPV6 発現の相互作用を検討した。RFP は basal の TRPV6 発現には影響しないが、1,25-D₃ 刺激で増加した TRPV6 発現を抑制する作用が認められた (図 4)。なお ATBC では明らかな TRPV6 発現の抑制作用は認められなかった。同様に肝臓における RFP と 1,25-D₃ の相互作用をヒト肝臓癌由来の HepaRG 細胞を用いてリアルタイム PCR で検討した。HepaRG 細胞の TRPV6 mRNA 発現量は腸管に比べると非常に低く LS174T 細胞に比べると RFP と 1,25-D₃ の相互作用は明らかでなかった。腸管における SXR と VDR のクロストークによるビタミン D 代謝酵素やカルシウム輸送体の発現調節が薬剤性骨軟化症の成因に関与する事が考えられた。

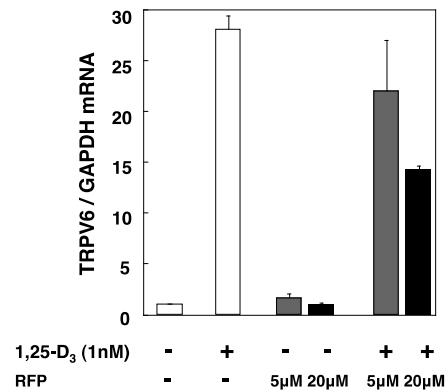


図 4

考察・今回、薬剤添加物として使用されている ATBC に SXR の強いリガンド活性を認めた。ATBC は、薬剤添加物のほか食品ラップ、玩具、食品添加物などにもフタル酸化合物の代用として最も汎用される可塑剤である。ATBC の作用は腸管特異的で、肝臓では CYP3A4 発現の誘導を認めなかった。これまで CYP3A4 による代謝系は主に肝臓において議論されてきたが、最近、肝臓や腸管の部位特異的な CYP3A1 (ヒトの CYP3A4 に相当する) のノックアウトマウスによる検討で、肝臓のみならず腸管における CYP3A4 も薬物の吸収・代謝に重要な役割を持つ事が明らかとなっている。ATBC が腸管特異的に作用する理由是不明であるが、例えば SXR のコアクティベーターやコリプレッサーの発現様式が肝臓と腸管粘膜において異なる可能性や、SXR にはリガンド作用が異なるスプライシングバリエントが知られており、SXR バリエントの発現様式が組織において異なる可能性などが原因として考えられる。

1, 25-D₃により腸管細胞において CYP3A4 発現が誘導されるという現象は、能動的なカルシウム吸収を担っている腸管細胞におけるビタミンD作用に関して負の調節機構が腸管局所に存在することを示唆するものである。しかしながら、このようなビタミンD作用とは独立してATBCがSXRを介してCYP3A4を誘導することは、局所におけるビタミンD作用の程度や生体のカルシウム充足度とは関係なく、ATBCが1, 25-D₃の不活性化を促進する可能性を示すものであり、ヒトのカルシウム代謝に対して何らかの影響をもたらすことが懸念される。

我々の検討ではATBCを含むある薬剤の最大投与量を内服すると約20 mgのATBCが毎日摂取される事を示した。レポーターアッセイではATBCが1 μM以上の濃度で明らかな転写活性の増加が認められたが、経口的に摂取された場合には、腸粘膜局所では高濃度のATBCが作用する可能性もある。即ち、腸上皮細胞における活性型ビタミンD₃代謝の亢進は、腸粘膜におけるカルシウム吸収の低下など骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が懸念される。今後は長期にわたるラットへのATBC投与により、腸粘膜において1, 25-D₃代謝が亢進し、骨代謝マーカーの変化や骨量の減少をきたすかどうかを明らかにする研究を進めていくことが課題である。

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3件)

- ① Akira Takeshita, Junko Igarashi-Migitaka, Noriyuki Koibuchi, Yasuhiro Takeuchi. Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. *Journal of Endocrinology*, 査読有, Vol. 216, 2013, 297-305
DOI: 10.1530/JOE-12-0297
- ② Kazumi Hirooka-Masui, Ronny Lesmana, Toshiharu Iwasaki, Ming X, Kaori Hayasaka, Mizuki Haraguchi, Akira Takeshita, Noriaki Shimokawa, Koujiro Yamamoto, Noriyuki Koibuchi. Interaction of silencing mediator for retinoid and thyroid receptors with steroid and xenobiotic receptor on multidrug resistance 1 promoter. *Life Sciences*, 査読有, Vol. 92, 2013, 911-915
DOI: 10.1016/j.lfs.2013.03.007
- ③ Akira Takeshita, Junko Igarashi-Migitaka, Kazusa Nishiyama, Hideyo Takahashi, Yasuhiro Takeuchi, and Noriyuki Koibuchi. Acetyl tributyl citrate, the most widely used phthalate substitute plasticizer, induces cytochrome p450 3A through steroid and xenobiotic receptor. *Toxicological Sciences*, 査読有, Vol. 123, 2011, 460-470
DOI: 10.1093/toxsci/kfr178

[学会発表] (計6件)

- ① 竹下章、五十嵐潤子、鯉淵典之、竹内靖博. ラットvivoモデルを用いた、骨吸収抑制剤がビタミンD代謝に及ぼす影響の検討. 第86回日本内分泌学会学術総会 2013. 4. 25~4. 27 仙台国際センター
- ② 竹下章、竹内靖博. ラットvivoモデルを用いた、骨吸収抑制剤がビタミンD代謝に及ぼす影響の検討. 厚生労働科学研究費補助金(難治疾患克服研究事業)ホルモン受容機構異常に関する調査研究 平成24年度研究報告会 2013. 1. 25 霞ヶ関コモンゲート西館
- ③ 竹下章、鯉淵典之、竹内靖博. SXRとVDRのクロストークが薬剤性骨軟化症の成因に関与する. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012. 4. 19~4. 21 名古屋国際会議場
- ④ 竹下章、竹内靖博. 薬剤による肝・腸管におけるビタミンD関連遺伝子発現の制御機構: 薬剤性骨軟化症の病態との関連について. 厚生労働科学研究費補助金(難治疾患克服研究事業)ホルモン受容機構異常に関する調査研究 平成23年度研究報告会 2012. 1. 13 霞ヶ関コモンゲート西館
- ⑤ 竹下章、五十嵐潤子、西山和沙、高橋秀依、鯉淵典之、竹内靖博. 薬剤添加物によるステロイドゼノバイオティック受容体SXRを介した腸管特異的なCYP3A4の酵素誘導. 第84回日本内分泌学会学術総会 2011. 4. 21 神戸国際会議場
- ⑥ 竹下章、鈴木尚宜、竹内靖博. 環境化学物質が骨代謝障害を惹起する可能性の検討. 厚生労働科学研究費補助金(難治疾患克服研究事業)ホルモン受容機構異常に関する調査研究 平成22年度研究報告会 2011. 1. 14 霞ヶ関コモンゲート西館

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 章 (TAKESHITA AKIRA)

冲中記念成人病研究所・研究員

研究者番号：20322646

(2) 研究分担者

竹内 靖博 (TAKEUCHI YASUHIRO)

冲中記念成人病研究所・主任研究員

研究者番号：50202164

(3) 連携研究者

鯉淵典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)

群馬大学・医学研究科・教授

研究者番号：80234681