

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790142

研究課題名(和文)核内受容体 PXR の新規生理機能：免疫メンテナンスの解明

研究課題名(英文)Regulation of the immune response by nuclear receptor PXR

研究代表者

児玉 進 (KODAMA, SUSUMU)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20621460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：核内受容体 pregnane X receptor (PXR) は、肝臓と腸管の主要生理機能の調節を担う低分子応答性転写因子である。本研究では、コンカナバリン A (Con A) 誘発性肝障害マウスモデルを用いて PXR による免疫応答の調節機序を解析した。PXR 機能の欠損は Con A 誘発性肝障害への感受性を高めること、マウス PXR 活性化薬の前投与は Con A 投与によって惹起されたケモカイン遺伝子の発現を抑えて肝臓組織内への好中球の浸潤を抑制することが新たに明らかとなった。従って、PXR は肝臓の免疫応答を抑制し、Con A 誘発性肝障害を軽減する可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the anti-inflammatory activity of PXR in a mouse model of immune-mediated liver injury induced by concanavalin A (Con A). In this model, PXR knockout mice displayed augmented liver damage compared with wild-type mice. Pretreatment of wild-type mice with PCN, a potent mouse PXR activator, prior to Con A challenge led to an amelioration of liver injury, which was accompanied by reduction of Con A-induced chemokine mRNA expression and neutrophil infiltration. These data suggest that PXR protects liver from Con A-induced injury by repressing the hepatic immune response.

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：核内受容体 異物応答 免疫系 細胞シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

核内受容体 pregnane X receptor (PXR) は、多様な遺伝子の発現調節を介して肝臓と腸管の異物代謝やエネルギー代謝などを含む主要な生理機能の調節を担う低分子応答性転写因子である。近年、PXR の機能喪失や異常と免疫応答の構成的な亢進や炎症性疾患との関連が報告され、新規な PXR の生理機能として免疫系の恒常性のメンテナンスへの関与が注目されている。例えば、古くからヒト PXR 活性化物質・リファンピシンの肝臓に対する免疫抑制作用が知られているが、近年、PXR 遺伝子の変異と炎症性腸疾患の関連性が報告された。一方、PXR 欠損マウスの解析から、PXR 機能の喪失に起因して肝臓と腸管の免疫応答が構成的に亢進すること、リガンドによる PXR の活性化はそれに対して抑制作用を示すことが報告された。また、免疫応答の異常亢進時に薬物処理などによって強く PXR を活性化させると抑制作用を示すことから、PXR は免疫関連疾患の治療標的としての可能性があると考えられる。これまでに NF- $\kappa$ B シグナルとの相互作用が示唆されているが、PXR が免疫メンテナンス因子として作用する免疫関連細胞や組織、その作用機序の詳細は依然不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症マウスモデルを用いて、核内受容体 PXR による免疫応答調節の作用機序を細胞シグナルの制御に焦点を当てて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

コンカナバリン A (Con A) およびプレグネノロン 16 $\alpha$ -カルボニトリル (PCN) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。PXR 欠損マウスは、アメリカ・カンザス大学 (Dr. Jeffrey L. Staudinger) より供与された。C57BL/6 マウスは、(株)日本チャールズリバーより購入した。

### (2) 動物への薬物処置

雄性の野生型 (C57BL/6) マウスあるいは PXR 欠損マウス (8~10 週令) を使用した。Con A は生理食塩水に溶解させ、15 mg/kg 体重の用量でマウスに尾静脈内投与した。PCN はコーン油に懸濁させ、100 mg/kg 体重の用量でマウスに腹腔内投与した。Con A 単独投与実験では、コントロール群として生理食塩水を尾静脈内投与した。また、PCN と Con A の併用投与実験において、コントロール群として生理食塩水 (尾静脈内投与) およびコーン油 (腹腔内投与) を投与した。Con A 投与後の所定の時間経過時点において、各処置群のマウスから尾静脈より全血を採取した後、肝臓サンプルを採集した。

### (3) 免疫組織化学的解析

マウス肝臓の内側右葉を摘出後にホルマリン固定し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色およびミエロペルオキシダーゼ (MPO) 染色に供した。1 標本につき無作為に 4 視野を選び、MPO 陽性細胞数を計測した。

### (4) 血中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値の測定

尾採血後に遠心分離に供して血漿を調製し、トランスアミナーゼ C-II テストワコー (和光純薬工業) を用いて血中 ALT 値を測定した。

### (5) mRNA 発現レベルの定量

マウス肝臓から SepasoI-RNA I (ナカライテスク) を用いて total RNA を抽出した後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technology, Carlsbad, CA) を用いて合成した cDNA をサンプルとして、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technology) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ) で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 野生型マウスと PXR 欠損マウス間での Con A 誘発性肝障害に対する感受性の比較

野生型マウスおよび PXR 欠損マウスに Con A を尾静脈内投与し、投与 24 時間後における肝臓の外観観察および肝臓組織切片の免疫組織化学的な評価を両マウス間で比較した。Con A 投与は T 細胞の活性化を惹起して肝臓特異的な障害を誘発するが、両マウスの肝臓において Con A 投与に起因した炎症の誘発を確認した。PXR 欠損マウスの肝臓では、外観変化として褐変が認められるなど野生型マウスと比較して炎症の深刻化が観察された。免疫組織化学的解析 (H&E および MPO 染色) の結果、PXR 欠損マウスでは野生型マウスと比べて肝細胞壊死の増悪化が認められ、MPO 陽性細胞数が有意に増加していた。次いで、肝障害の指標である血中 ALT 値を測定したところ、PXR 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて血中 ALT 値がその約 4 倍に上昇していた。また、両マウスのコントロール群の間には血中 ALT 値に有意な差は認められなかった。これらの結果は、肝臓の病理所見と正に相関していた。

### (2) PXR 活性化薬投与による Con A 誘発性肝障害の軽減

Con A 単独投与の結果、PXR の機能欠損によって肝障害が重篤化するという結果が示された。そこで、野生型マウスを用いて、げっ歯類 PXR 特異的活性化薬 PCN を投与して PXR を強く活性化させた条件下における Con A 誘発性肝障害に対する感受性を評価した。PCN を腹腔内投与した 3 時間後に Con A を尾静脈投与し、その 9 時間後におけるマウスの

肝臓組織切片の免疫組織化学的な評価と血中 ALT 値の測定を行った。Con A 単独投与 9 時間後におけるマウスの肝臓では、コントロール群と比べて肝細胞壊死の惹起および MPO 陽性細胞数が有意に増加していることを確認した。一方、PCN/Con A 併用投与群のマウスの肝臓では、Con A 単独投与群と比べて著しい肝細胞壊死の軽減および MPO 陽性細胞数の減少が確認された。また、Con A 単独投与群では、肝障害レベルに相関して血中 ALT 値がコントロール群の約 70 倍に上昇していた。一方、PCN/Con A 併用投与群における血中 ALT 値は、コントロール群の約 4 倍までその上昇が著しく抑制されていた。次いで、PCN 投与による PXR の活性化に伴う肝臓における炎症関連遺伝子の mRNA 発現レベルの変動をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。Con A 単独投与群および PCN/Con A 併用投与群のマウス肝臓では、TNF や IL-1 を含む炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性関連遺伝子群の mRNA 発現レベルがコントロール群と比べて著しく上昇していた。さらに、PCN/Con A 併用投与群の肝臓では、それら mRNA 発現レベルが Con A 単独投与群と比べて有意に減少していた。また、マウス肝臓における PCN 投与による PXR の活性化は、典型的な PXR 標的遺伝子 *Cyp3a11* の mRNA 発現レベルの上昇を指標にして確認した。これらの結果から、特異的活性化薬 PCN 投与による PXR の活性化は、Con A 投与によって亢進される種々の炎症関連遺伝子の発現を抑制して肝障害を軽減する可能性が示唆された。

### (3) PXR 活性化 (PXR 特異的活性化薬投与) による Con A 誘発性肝障害に対する軽減作用の機序解析

PCN/Con A 併用投与下、Con A 投与によって惹起される免疫応答に対する PXR 活性化による抑制作用を経時的 (Con A 投与 1 時間、3 時間、および 6 時間) に検討した。まず、Con A 単独投与もしくは PCN/Con A 併用投与した野生型マウスの血中 ALT 値の変動を測定したところ、コントロール群に対する血中 ALT 値の有意な上昇は Con A 単独投与 6 時間後に初めて認められた。さらに、PCN/Con A 併用投与では、Con A 単独投与群と比べてその上昇が有意に抑制されていた。従って、PCN 投与によって活性化された PXR は、Con A 投与 6 時間後より早期の免疫応答に対して抑制的に作用していると考えられた。そこで、Con A 投与後早期における PXR 活性化による免疫応答抑制の作用機序を明らかにするため、PCN 投与 6 時間後に野生型マウスへ Con A を投与し、その 1 時間後および 3 時間後に肝臓を採取して免疫組織化学的な評価と炎症関連遺伝子の mRNA 発現レベルのリアルタイム PCR 解析を実施した。

#### 炎症関連遺伝子の mRNA 発現解析

まず、マウス肝臓における PCN/Con A 併用

投与群の Con A 単独投与群に対する *Cyp3a11* の mRNA 発現レベルの上昇を指標にして、各採取時間における PXR 活性化の状態を確認した。Con A 単独投与 1 時間後および 3 時間後のマウス肝臓では、TNF や IFN などの主要な炎症性サイトカインはコントロール群と比べて著しく高い mRNA 発現レベルを維持していた。また、PCN/Con A 併用投与群では、Con A 単独投与群と比べてこれらサイトカインの mRNA 発現レベルの有意な変動は各経過時点において認められなかった。興味深いことに、Con A 単独投与群では、惹起された複数のケモカイン遺伝子の mRNA 発現レベルが経過時間に依存して上昇していたが、一方、PCN/Con A 併用投与群では、それら mRNA 発現レベルの上昇が Con A 単独投与群と比べて Con A 投与 3 時間後に著しく抑制されていた。

#### 肝臓組織への好中球浸潤の評価

これまでの知見から、複数のケモカインは免疫応答の亢進下における好中球や単球の遊走に関与すること、また、肝臓組織内への好中球浸潤は Con A 誘発性肝障害の発症過程において中心的な役割を担うことが知られている。そこで、MPO 染色を用いて Con A 投与 3 時間後における肝臓組織内への好中球の浸潤を Con A 単独投与群と PCN/Con A 併用投与群間で比較した。Con A 単独投与群では、コントロール群と比較して視野面積当たりの MPO 陽性細胞数が 16 倍に増加した。一方、PCN/Con A 併用投与群では、Con A 単独投与群に対して MPO 陽性細胞数が約 50% に減少していた。

以上の得られた結果から、特異的活性化薬によって活性化された PXR は Con A 刺激によって惹起されたケモカイン遺伝子の発現を抑えて肝臓組織内への好中球の浸潤を抑制し、肝障害を軽減する可能性が新たに示された。

#### 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 2 件)

1. Kodama S and Negishi M. Sulfotransferase genes: regulation by nuclear receptors in response to xeno/endo-biotics. *Drug Metabolism Reviews*, 45, 441-449 (2013). DOI: 10.3109/03602532.2013.835630 (査読有)
2. Kodama S and Negishi M. PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses. *Drug Metabolism Reviews*, 45, 300-310 (2013). DOI: 10.3109/03602532.2013.795585 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. 志村 匠斗、児玉 進、栗林 秀明、宮田 昌明、山添 康、吉成 浩一、核内受容体 PXR による免疫反応調節の機序解明、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台
2. 志村 匠斗、児玉 進、栗林 秀明、宮田 昌明、山添 康、吉成 浩一、核内受容体 PXR による免疫反応調節の機序解明、第 40 回日本毒性学会学術年会、2013 年 6 月 17 日、千葉
3. 児玉 進、志村 匠斗、栗林 秀明、吉成 浩一、山添 康、核内受容体 PXR はコンカナバリン A 投与により誘導される T 細胞依存性肝炎を抑制する、日本薬物動態学会 第 27 回年会 2012 年 11 月 22 日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

児玉 進 (KODAMA SUSUMU)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20621460