

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860095

研究課題名(和文) 免疫応答のバランスを調節する核内受容体PXRの新規な生理機能の解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanism for the nuclear receptor PXR-mediated regulation of immune/inflammatory responses

研究代表者

児玉 進 (Kodama, Susumu)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20621460

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)：核内受容体PXRは、様々な化学物質に応答して多様な生理機能の調節に関わる。近年、薬物によるPXRの活性化を介した免疫応答調節作用の知見が集積されつつある。本研究では、コンカナバリリンA自己免疫性肝炎モデルとPxr欠損マウスを用いたin vivo実験系及び培養細胞を用いたin vitro実験系を用いて、PXRによる免疫応答の調節機序を解析した。今後、本研究より得られた知見及び解析系を基に、PXRによる免疫応答の調節機序の解明の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The xenobiotic-sensing nuclear receptor PXR is well-known to play important roles in drug/xenobiotic clearance and hepatic energy metabolism. Recent studies have revealed that PXR also has a role in the regulation of immune/inflammatory responses. However, the precise details are still not fully understood. In this study, we have investigated the molecular mechanism underlying PXR-mediated regulation of immune/inflammatory responses using an in vivo mouse model of immune-mediated liver injury and in vitro cell-based experimental models. Our findings will provide us with useful information to investigate how PXR immune/inflammatory responses.

研究分野：衛生化学

キーワード：核内受容体 異物応答 免疫応答 炎症 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

核内受容体の1種であるPXRは肝臓や腸管に高発現する低分子応答性の転写因子であり、多様な化学物質に反応して異物代謝やエネルギー代謝の調節に関わる。近年、PXR機能の喪失や異常と免疫応答の構成的亢進や炎症性疾患との関連が報告され、薬物によるPXRの活性化を介した免疫応答調節作用の知見が集積されつつある。最近、研究代表者らはコンカナバリンA(Con A)自己免疫性肝炎マウスにおいて、代表的なマウスPXR活性化物質プレグネノロン16 $\alpha$ カルボニトリル(PCN)の投与は、肝臓へのCon A誘導性の好中球浸潤を抑制し、肝障害を軽減することを見出していた。しかし、本モデルにおけるPXRを介する炎症軽減の作用機序の詳細は明らかとなっていなかった。また、近年、潰瘍性大腸炎モデルマウスや培養細胞系を用いた先行研究からPXRを介した免疫応答の調節作用としてNF- $\kappa$ Bシグナルとの相互作用が示唆されていたが、その詳細な作用機序は十分に明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、Con A 自己免疫性肝炎モデルとPxr欠損マウスを用いたin vivo実験系及び培養細胞を用いたin vitro実験系を用いて、PXRの新規な生理機能・免疫応答調節の分子機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

Con A、PCN、リポ多糖(LPS)、フォルボールエステル(PMA)、リファンピシン(RIF)、RU486はSigma-Aldrich (St. Louis, MO)より購入した。クロトリマゾール(Clo)、ヒト組換え体TNF $\alpha$ は和光純薬工業から購入した。抗リン酸化I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体及び抗リン酸化p65抗体はCell Signaling Technology (Beverly, MA)から購入した。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マウスは日本チャールズリバーより購入した。ヒト肝癌由来HepRG細胞はオリエンタル酵母工業から購入した。ヒト肝癌由来HepG2細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより、ヒト単球由来U937細胞は国立医薬品食品衛生研究所斎藤嘉朗博士より、マウスマクロファージ様RAW264細胞は東北大学平澤典保博士より、ヒト大腸癌由来LS180細胞及びヒト胎児腎臓由来HEK293細胞は静岡県立大学吉成浩一博士より、それぞれ供与された。

### (2) 動物への薬物処置

雄性Pxr欠損マウス(8~10週令)を解析に使用した。Con Aは生理食塩水に溶解させ、尾静脈内投与した(15 mg/kg)。PCNはコーン油に懸濁させ、腹腔内投与した(100 mg/kg)。PCN/Con A併用処置の際、コントロール処置群として生理食塩水(尾静脈投与)とコーン

油(腹腔内投与)を投与した。Con A投与から所定時間経過後、尾静脈から血液を採取し、肝臓及び脾臓サンプルを採集した。

### (3) 血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値の測定

マウス尻尾から採血後、遠心分離に供して血漿を調製し、トランスアミナーゼC-11テストワコー(和光純薬工業)を用いて血漿中ALT値を測定した。

### (4) 免疫組織化学的解析

摘出したマウス肝臓の内側右葉をホルマリン固定した。組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色及び抗ミエロペルオキシダーゼ(MPO)抗体による免疫染色は外部委託(モルフォテクノロジー)で行った。標本各々つき無作為に抽出した4視野についてMPO染色陽性細胞数を測定した。

### (5) mRNA発現レベルの定量

マウス肝臓及び脾臓からSepasol-RNA I(ナカライテスク)を用いて調製した総RNAから、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてcDNAを合成した。mRNA発現レベルは、GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI)を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800(タカラバイオ)もしくはApplied Biosystems 7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)で解析した。

### (6) 培養細胞系を用いたPXRによる免疫応答調節機序の解析

各種培養細胞株(U937、LS180、HepG2、HEK293、HepRG、RAW264)をヒト及びマウスPXR活性化物質(RIF、Clo、RU486、PCN)で処理し、LPSまたはTNF $\alpha$ 刺激に反応した炎症関連遺伝子のmRNA発現レベルを測定した。U937細胞はPMA処理してマクロファージ様細胞へ分化させた後、HepRG細胞は薬物誘導試験用プロトコールに従い前培養した後、各種処理に供した。ヒトPXRを安定発現するLS180細胞株を新たに樹立し、各種処理に供した。静岡県立大学吉成浩一博士より炎症刺激物質及びPCNを処理したマウス初代培養肝細胞より抽出した総RNAサンプルの提供を受け、各種遺伝子のmRNA発現レベルを測定した。U937細胞を各種処理に供した後、総蛋白質を調製し、抗リン酸化I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体及び抗リン酸化p65抗体を用いたウェスタンブロット法によりNF- $\kappa$ Bシグナルの活性化レベルを解析した。マウス炎症関連遺伝子(*Nos2*、*Tnfa*及び*Ccl2*)のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、NF- $\kappa$ B応答性レポーターコンストラクト(Signosis, Santa Clara, CA)と共に、ヒトまたはマウスPXR発現プラスミドを共導入したHepG2細胞、LS180細胞及びHEK293細胞を用いて炎症刺激及び薬物処理下、レポ

ターアッセイを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 代表的なマウス PXR 活性化物質 PCN 投与による Con A 誘発性肝障害の軽減

Con A を尾静脈内投与すると肝臓特異的な障害を誘発する。最近、研究代表者は、代表的なマウス PXR 活性化物質 PCN を予め野生型マウスへ腹腔内投与した場合、肝細胞壊死の減少と血漿中 ALT 値の著しい改善が認められ、Con A により誘発される肝障害を軽減することを見出した (図 1)。この時、肝

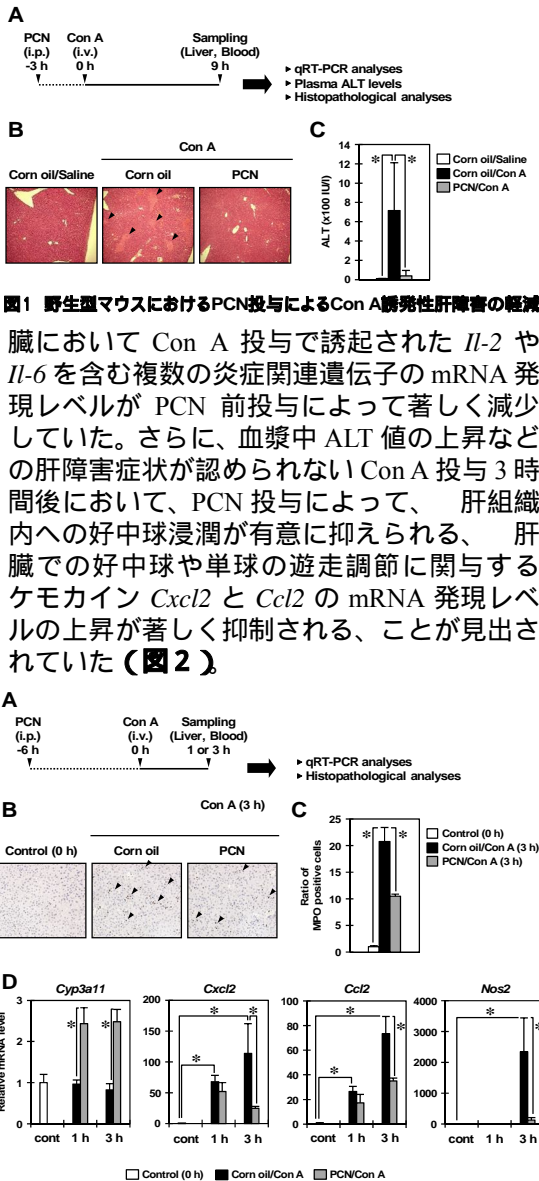


図1 野生型マウスにおけるCon A誘発性肝障害の初期段階へのPCN投与の影響

##### (2) PCNのCon A 誘発性肝障害に対する軽減作用における PXR 機能依存性の検討

Pxr 欠損マウスを用いて、PCN による Con A に誘発される肝障害の軽減作用が PXR 機能に依存するかどうかを検討した。その結果、予想に反して Pxr 欠損マウスにおいても、Con A 単独処置群と比べ、PCN 前投与群では Con A 処置により誘発された肝細胞壊死の減少と

血漿中 ALT 値の著しい改善が認められ、肝障害が有意に軽減されることが明らかとなった (図 3)。この時、PCN 前投与群では、野

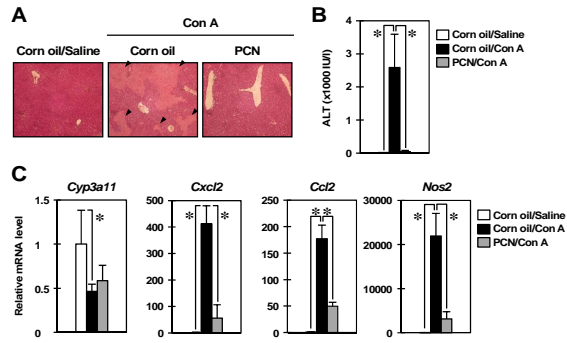


図3 PCN投与によるPxr欠損マウスにおけるCon A誘発性肝障害への影響

生型マウスと同様に、Con A 処置により誘導された炎症関連遺伝子群の肝 mRNA レベルの上昇が著しく抑制されていた。

次いで、Con A 投与 3 時間後における PCN 前投与の肝障害軽減作用を検討した結果、野生型マウスと同様に、PCN 前投与群において、肝組織内への MPO 染色陽性好中球の浸潤が有意に抑えられ、Cxcl2 と Ccl2 の mRNA 発現レベルの上昇が著しく抑制されていた (図 4)。とりわけ、これまでの知見から CXCL2

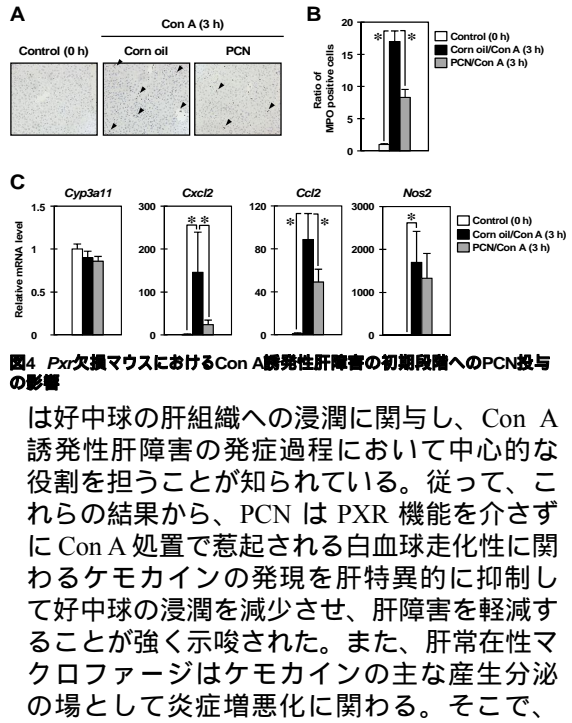


図4 Pxr欠損マウスにおけるCon A誘発性肝障害の初期段階へのPCN投与の影響

は好中球の肝組織への浸潤に関与し、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。従って、これらの結果から、PCN は PXR 機能を介さずに Con A 処置で惹起される白血球走化性に関わるケモカインの発現を肝特異的に抑制して好中球の浸潤を減少させ、肝障害を軽減することが強く示唆された。また、肝常在性マクロファージはケモカインの主な産生分泌の場として炎症増悪化に関わる。そこで、RAW264 細胞を用い、ケモカインの発現変動を指標にして PCN の免疫応答調節作用の検討を試みたが、有意な変動は認められなかった。このことから、肝構成細胞間の相互作用を考慮した解析の必要性が考えられた。一方、Con A 処置によって誘導される炎症初期に野生型マウスの肝臓でのみ、一部の炎症関連遺伝子の mRNA 発現レベルの上昇が PCN 投与によって抑えられた (図 2、4)。従って、PCN は PXR 機能に依存した免疫応答調節作用を有するが、本肝炎症モデルにおいては、PXR 機能に依存しない免疫応答調節作用が

肝障害の軽減に十分に寄与したと推測された。

### (3) 培養細胞系を用いた PXR による免疫応答調節機序の解析

近年、潰瘍性大腸炎モデルマウスや培養細胞系を用いた研究から、活性化物質に应答した PXR は NF- $\kappa$ B シグナルと相互作用することが示唆されている。PMA 処理 U937 細胞、LS180 細胞及び RAW264 細胞を用いて、各種ヒト及びマウス PXR 活性化物質 (RIF、Clo、RU486、PCN) 処理下、LPS または TNF $\alpha$  刺激に应答した炎症関連遺伝子の発現変動を解析した。U937 細胞では、各々のヒト PXR 活性化物質の処理によって LPS 刺激に应答した炎症関連遺伝子 (*COX-2*、*IL-1b*) の発現亢進が抑制されること、この場合、処理した活性化物質の間で NF- $\kappa$ B シグナルの I $\kappa$ B $\alpha$  及び p65 のリン酸化に対する作用 (減弱、増強) が異なることが明らかになった。LS180 細胞及び RAW264 細胞では、処置した活性化物質間及びそれらの処理のタイミングによって抑制作用の有無が生じるなどの著しい差異が認められた。これらの結果から、PXR は個々の活性化物質に依存して異なる作用機序を持つ、活性化物質によっては PXR 非依存的に作用する、ことが示唆された。また、これら細胞株における PXR の発現量が不十分であった可能性が考えられた。そこで、ヒト PXR 安定発現 LS180 細胞株及びヒト初代培養肝細胞に近い特徴を有する HepaRG 細胞を用いて同様の解析を実施したが、ヒト PXR 活性化物質処理による抑制作用は認められなかった。そこで次に、複数の炎症関連遺伝子プロモーター領域のレポーター解析を実施したが、何れもレポーター活性の変動は認められなかった。さらに、既報論文に基づきマウス初代培養肝細胞を用いて PCN 処理下における LPS 及び TNF $\alpha$  刺激に应答した炎症関連遺伝子の発現変動を検討した。しかし、予想に反して PCN 処理による有意な変動は認められなかった。以上の培養細胞系を用いた解析では先行研究の報告の再現性は乏しく、今後、より適当な細胞株の選択及び単一の細胞タイプよりも複数の細胞タイプ間の相互作用を考慮した解析系の確立が必要であると強く考えられた。

## 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 1 件)

1. S. Kodama, T. Shimura, H. Kuribayashi, T. Abe, and K. Yoshinari. Pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile ameliorates concanavalin A-induced liver injury in mice independent if the nuclear receptor PXR activation. *Toxicology Letters*, 271: 58-65 (2017). DOI:10.1016/j.toxlet.2017.02.018 (査読

有り)

[学会発表](計 2 件)

1. 児玉 進、志村匠斗、栗林秀明、吉成浩一、Pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile は核内受容体 PXR の活性化を介さずにコンカナバリン A 誘導肝障害を軽減する、日本薬物動態学会第 30 回年会、2015 年 11 月 13 日、東京
2. 倉富 雅、阿部太紀、児玉 進、吉成浩一、核内受容体 PXR 活性化による四塩化炭素誘導性肝障害の軽減作用、第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月 29 日、石川

[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