

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 野田秀平(千葉県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 博甲第2932号 |
| 学位授与年月日 | 平成14年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | 医学研究科 |
| 学位論文題目 | 異物代謝に関わる転写調節因子 AhR 及び Nrf2 複合欠失マウスの表現型解析 |
| 主査 | 筑波大学教授 薬学博士 永田 恭介 |
| 副査 | 筑波大学併任教授 医学博士 遠山 千春 (国立環境研究所) |
| 副査 | 筑波大学助教授 薬学博士 熊谷 嘉人 |
| 副査 | 筑波大学講師 医学博士 小林 公子 |

論文の内容の要旨

(目的)

生体内での異物の代謝には、第1相異物代謝酵素群の誘導的発現に関わる転写調節因子 AhR と第2相異物代謝酵素群の広範な制御に関与する転写調節因子 Nrf2 が協調して働くと考えられてきた。この両者を複合して欠失させた場合には、異物代謝酵素群の誘導的発現の広範囲な欠失及び構成的発現の変化をきたし、その影響により致死あるいはストレスに対する脆弱性を示すことが予測される。本研究では AhR : : Nrf2 複合欠失マウスを作製し、その異物応答性の解析を通して、両転写因子の役割と協調的な作用機構を明らかにすることを目的とする。また、AhR を介する3-メチルコラントレン (3-MC) によるシグナルと Nrf2 を介するブチルヒドロキアニソール (BHA) によるシグナルの異物代謝酵素群の誘導的発現に関するクロストークの可能性についても検討を試みることにした。あわせて、AhR と Nrf2 両因子による制御系の欠失がこの両者とは独立した異物代謝酵素誘導系であると考えられる CAR を介する誘導系に与える影響の有無を確かめることも目的とする。

(対象と方法)

本実験で用いたマウスは遺伝的背景が均一ではないので、データのばらつきを抑えるためクローズドコロニーシステムを採用した。まず、それぞれの単独遺伝子破壊マウスの交配により、雄1頭と雌2頭の AhR : : Nrf2 複合欠失ヘテロマウスを作成し、ついでそれらの複合欠失ヘテロマウス同士の交配から子孫を選別することにより、AhR (-/-) : : Nrf2 (-/-) (複合ノックアウト : D-KO) マウスを得た。またクローズドコロニー中より、AhR (+/+) : : Nrf2 (-/-) (Nrf2 ノックアウト : N-KO) マウス及び AhR (+/+) : : Nrf2 (+/+) (Wild type : WT) マウスを作成して対照とした。しかし、AhR (-/-) : : Nrf2 (+/+) マウス (A-KO マウス) は、このコロニーから得ることが出来ず、やむなく別コロニーから作製した。

薬剤投与実験には、それぞれ AhR, Nrf2, CAR を介する代表的な異物代謝酵素群の誘導剤として知られる 3-MC, BHA, フェノバルビタール (PB) の3種を選択し、薬剤投与後のマウス肝臓における異物代謝酵素 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B10, NQO1, UGT1A6, GST-P) の誘導的発現を転写レベルで解析した。内部標準として、G3PDH の発現レベルを検定した。

(結果)

D-KOマウスは生存及び繁殖可能であったが、乳児期死亡率が非常に高く、1週以内に約半数が死亡した。生き残った大半のD-KOマウスは1年以上生存した。すべてのD-KOマウスは生後1週に一過性の脂肪肝を呈した。定性解析の結果、蓄積した脂肪の主成分はトリアシルグリセロールであることが明らかとなった。

薬剤誘導実験の結果、3-MCによるCYP1A1とCYP1A2の誘導にはNrf2は必須ではないことが示された。一方、野生型雌マウスではNQO1の誘導を認めたが、この誘導はD-KOマウスのみならずN-KOマウスにおいては消失していたことより、3-MCはNQO1の誘導をNrf2を介して行っていることが明らかとなった。

BHA投与によるCYP1A2の誘導的発現はD-KOマウスにおいても観察された。従って、この誘導にはAhR及びNrf2の双方を介さない誘導系が働くことが示唆された。

PB投与によるCYP1A2及びCYP2B10の誘導にはAhR及びNrf2は共に必須ではないことが示された。しかし、PB投与によるCYP2B10の誘導の雌雄差がD-KO及びA-KOマウスで消失していた。

(考察)

D-KOマウスでは死亡が集中する時期と一致して重篤な脂肪肝を呈することから、その死因に脂肪肝が関わる可能性が考えられた。一方、肝肥大が認められないことから、肝予備力の著しい低下が起こっている可能性があり、そのため環境要因などのストレスに対し抵抗性が弱く、個体によっては死に至る場合があると推測された。

今回作製したD-KOマウスでは、AhR及びNrf2の影響を排した状態で異物代謝の解析を行うことが出来た。実際にBHA投与によるAhR及びNrf2非依存的なCYP1A2の誘導系の存在を示すことができた。これにはAhRの遺伝子破壊による構成的発現の減少効果が寄与した。

NQO1はその転写調節領域にXRE配列とARE配列の双方を有し、その両方の配列が共に転写活性化に働くとされていた。3-MCによるNQO1の誘導にはNrf2が必須であり、AhR単独ではこの誘導が起こらなかった。従って、3-MCがAhR依存的にCYP1A1およびCYP1A2の発現を誘導し、これらの酵素により酸化を受けて親電子性を獲得した後、Nrf2依存的にNQO1などの第2相酵素の転写活性化を起こすというモデルが考えられた。

培養細胞系では再現が難しい現象の一つであるPB投与によるCYP2B10誘導の雌雄差のAhR遺伝子破壊による消失が観察できたことから、この誘導におけるCARとAhRの相互作用を示すことができた。

(結論)

1. AhR及びNrf2複合欠失マウスは、生存及び繁殖可能であり、異物代謝の主要な制御を担う2つの転写調節因子の欠失下で薬剤投与実験を行うことが出来た。
2. AhR及びNrf2複合欠失マウスは乳児期に一過性の脂肪肝と高い死亡率を呈した。
3. 3-MCによるNQO1誘導的発現にはAhR-XRE系のみでは充分でなく、Nrf2が誘導に必須であることが個体レベルで示された。
4. CYP1A2の誘導は複数の転写調節因子による複雑な制御を受けており、BHA投与によるAhR及びNrf2を介さないCYP1A2の誘導系の存在が示された。
5. PBによるCYP2B10の誘導的発現にAhRは必須ではないが、雌における誘導の抑制にはAhRが関与していることが示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、異物代謝酵素群の発現に関わる転写因子AhR及びNrf2複合欠失マウスを作成し、異物代謝におけるそれぞれの役割と協調的な作用機構を明らかにするとともに、中毒学・薬理学研究を個体レベルで包括的に解析

できる可能性を示しており、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。