The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	核内受容体PXRに影響する内分泌攪乱物質に関する研究
Author(s)	美甘, 江利子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44138
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　美甘江利子（みかもえりこ）

博士の専攻分野の名称　博　士（薬　学）

学　位　記　番　号　第　17784　号

学位授与年月日　平成15年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

薬学研究科生命情報環境科学専攻

学　位　論　文　名　**核内受容体PXRに影響する内分泌攪乱物質に関する研究**

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　西原　力

（副査）
教　授　田中　慶一　　教　授　東　純一　　教　授　土井　健史

論　文　内　容　の　要　旨

現在、使用されている様々な化学物質の中には、生体内に取り込まれて内分泌系に影響する物質が存在する。これらの物質は、一般に内分泌攪乱物質（Endocrine disruptor, ED）といわれ、『生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質』とされている。ED の作用機構は、ホルモン受容体への結合、ホルモン合成・分解経路への影響などが考えられているが、十分には解明されていない。これまでに、いくつかの生体外物質またはその代謝物が性ホルモン受容体である Androgen receptor（AR）および Estrogen receptor（ER）に直接結合し、その標的遺伝子の発現に影響することが報告されている。しかし、ED の多くは、ホルモンのような低分子の脂溶性物質であるため、性ホルモン受容体以外にも標的となる核内受容体の存在が予想される。本研究では、物質の生合成、分布、代謝および排泄に深く関与し、幅広いリガンド特異性を有する核内受容体 Pregnane X receptor（PXR）に注目し、ED の作用機構との関わりについて検討した。

PXR は、ステロイドや胆汁酸などの生体内物質および種々の生体外物質に応答して、薬物代謝酵素 Cytochrome P450（CYP）やトランスポーターである Multi drug resistance 1（MDR1）、Organic anion transporting polypeptide 2（OATP2）を誘導することが知られている。これまでに、エストロゲン様物質であるフタル酸エステルおよびノニルフェノールについて、PXR に対するアゴニスト活性を示すことが報告されている。しかし、ER に対するアゴニスト活性と比べて弱く、そのほかの ED 作用が疑われる物質については、まったく報告されていない。

本研究では、まず、ED として疑われている物質を中心に、Yeast two-hybrid 試験および CV-1 細胞を用いたルシフェラーゼ遺伝子試験により、PXR に対してアゴニスト活性を有する物質をスクリーニングした。その結果、アラクロール、BHC、ベンゾフェノン、メトキシクロル、ノニルフェノール、トリフルラリンおよびビンクロゾリンの7種類が PXR に対するアゴニスト活性を示した。今回、新たに陽性を示した6種類の物質については、AR および ER に対するアゴニスト活性は認められなかった。

次に、これらの物質について、定量可能な Competitive RT-PCR およびノザンブロット解析により、*in vivo* における PXR 標的遺伝子の発現量に与える影響を検討した。ラットを用いた投与試験の結果、肝臓中の PXR の標的遺伝子である薬物代謝酵素群およびトランスポーターの mRNA が誘導された。また、これまでに標的遺伝子であることが報告されている CYP2B1/2、3A1 に加えて、CYP2C11 が PXR のアゴニストにより誘導されることを明らかにした。

PXR の転写調節機構については、PXR が多く発現している肝臓や小腸について様々な検討がなされており、上記に示したような標的遺伝子も報告されている。しかし、受容体自身の発現調節機構については、ほとんど明らかにされていない。PXR 自身は、肝臓において定常状態でかなり発現しており、投与による誘導は認められなかった。PXR に対するアゴニスト活性を示したこれらの物質は、受容体の発現に影響するよりも、生体で PXR を介した転写調節機構を活性化し、標的遺伝子の発現量を増加させていると考えられる。一方、本研究では、メトキシクロルを反復投与した結果、精巣における PXR の発現量に増加が認められた。PXR は、正常ラットの生殖器では雌雄共にほとんど発現しておらず、PXR の発現が上昇する知見は、今回初めて明らかにしたものである。生殖器における PXR の標的遺伝子は、これまでに調べられていないが、肝臓や小腸とは異なる標的遺伝子が存在する可能性も考えられ、ED による生殖障害の作用機構を解明する手掛かりとなることが期待される。

ED の中には、代謝されて初めて性ホルモン受容体に影響をおよぼす物質が存在する。PXR は、CYP 分子種を標的遺伝子とするため、これらの代謝酵素が ED の作用機構に関わる可能性が考えられる。そこで、ラット肝ホモジネート S-9 mix 処理により、ER に対するアゴニスト活性を示したメトキシクロルについて、その作用の発現機構に関わる CYP 分子種を調べた。その結果、メトキシクロルは PXR の標的遺伝子である CYP2C11 により、ER にアゴニスト活性を持つ代謝物に変換された。この代謝物は、機器分析により同定した結果、メトキシクロルのモノーおよびビスー脱メチル化体であった。メトキシクロルは、PXR を介して CYP2C11 を誘導し、エストロゲン様活性を示す代謝物への変換を自ら促進することが示された。

さらに、PXR の標的遺伝子は、薬物代謝酵素やトランスポーターであることから、コレステロールやステロイドホルモンなど生体内物質の恒常性に影響することも考えられる。本研究では、メトキシクロルが胆汁酸やステロイドホルモンの原料となるコレステロールについて、その分解・排泄経路を促進して血中濃度を低下させることを示した。生体内のステロイドホルモンの代謝には CYP 分子種が関わることから、これらのホルモンの恒常性についても影響すると予想される。

以上より、ED は、性ホルモン受容体に直接反応する以外にも、PXR などの核内受容体を介して、性ホルモン受容体に間接的に影響し、ホルモンバランスを乱す可能性が示された。このことは、今後、性ホルモン受容体だけでなく、様々な核内受容体についても、ED の影響を検討する必要があることを意味するものである。

論文審査の結果の要旨

美甘君は、内分泌撹乱物質（ED）の作用発現機構について、性ホルモン受容体以外の受容体、すなわち PXR を介する機構に着目して研究を進めた。まず、in vitro 試験（酵母 Two-Hybrid 試験、培養細胞レポーター遺伝子試験）により、一般化学物質約 70 種について PXR アゴニスト活性を試験したところ、メトキシクロル（MXC）など 7 物質が検索された。ついで、これらの物質を雄ラットに投与し、肝臓の mRNA レベルを調べたところ、すべての物質で PXR 標的遺伝子である薬物代謝酵素群（CYP）とトランスポーターmRNA が誘導されていた。前者の CYP の分子種では既知の CYP2B1/2 と 3A1 に加えて 2C11 が誘導された。また、PXR 自身の発現は肝臓では影響はなかったが、精巣で発現が上昇した。一方、MXC などいくつかの ED 容疑物質は代謝されて作用を発現することが知られている。その代謝酵素を調べ、CYP2C11 が MXC を ER アゴニスト活性のある脱メチル体に変換していることを明らかにした。さらに MXC 投与によりコレステロール分解・排泄が促進されてその血中濃度が低下することを示した。

以上の成果は、ED 作用発現機構として従来の性ホルモン受容体以外に PXR のような核内受容体を介する間接的な機構も存在する可能性を示したものであり、学術的にも高く評価されるだけではなく、ED による環境問題の解決にも深く関与する知見でもあり、学術的にも社会的にも高く評価され、博士（薬学）学位論文として充分価値あるものと認められる。