OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	CREBH Determines the Severity of Sulpyrine-Induced Fatal Shock
Author(s)	神山, 長慶
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59766
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【58】

氏名	神山長慶（かみやまながのり）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　25884　号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	CREBH Determines the Severity of Sulpyrine-Induced Fatal Shock （CREBHはスルピリンによって誘導される致死的ショックの重症度を決定する）
論文審査委員	（主査） 教授　竹田　潔 （副査） 教授　荒瀬　尚　教授　竹原　徹郎

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

CREBHは肝臓に高発現している小胞体膜貫通型転写因子である。我々はCREBHが肝臓の主な働きの１つである薬物解毒作用にCREBHが関与しているのではないかと予想し、CREBH欠損マウスを用いてその作用を検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

解熱鎮痛薬であるスルピリンはその解熱鎮痛効果の高さから世界中で広く使用されているが、重篤な副作用としてショック症例が報告されている。野生型マウス、CREBH欠損マウスにスルピリンを大量投与したところ、CREBH欠損マウスは野生型マウスに比べて耐性を示した。次に、スルピリンの生体内代謝産物である4-AA,4-FAAの血中濃度をHPLC法により測定した。その結果、CREBH欠損マウスでは4-AA,4-FAA共に野生型マウスに比べて血中濃度が低くなっていた。これより4-AA,4-FAAのどちらかがスルピリンショックの原因になっていることが予想された。4-AA,4-FAAを直接マウスに投与してその投与量と血中濃度の関係をグラフ化し、野生型マウスにとって致死量のスルピリンを投与した際の野生型マウス、CREBH欠損マウスにおける4-AA,4-FAAの血中濃度の値を当てはめ、スルピリン投与時と同じ血中濃度になる4-AA,4-FAAの直接投与量を割り出して野生型マウスに投与した。スルピリン投与時の野生型マウスの血中濃度に対応する4-AAを投与したマウスは全て死亡したのに対し、スルピリン投与時のCREBH欠損マウスの血中濃度に対応する4-AAを投与したマウスは全て生存した。一方で、スルピリン投与時の野生型、CREBH欠損マウスの両血中濃度に対応する4-FAAを投与してもマウスは全て生存した。さらに、4-AA,4-FAAを野生型マウスに投与し、致死量を検討した。野生型マウスへのスルピリン投与時と同じ血中濃度になる4-AAの量は致死量を超えていたのに対し、CREBH欠損マウスへのスルピリン投与時と同じ血中濃度になる4-AAの量は致死量を超えなかった。一方、4-FAAにおいては野生型、CREBH欠損マウス両方の血中濃度に対応する4-AAの量は致死量に比べて非常に低い値であった。以上より、スルピリンショックの原因になるのは4-FAAではなく4-AAであることが明らかになった。

次に、CREBHがスルピリンショックの原因遺伝子であるかを確認するためにCREBH欠損マウスにCREBHをin vivoトランスフェクションし、スルピリンに対する感受性を解析した。CREBHを戻したCREBH欠損マウスのスルピリン耐性が失われたことにより、CREBHがスルピリンショック発現の原因遺伝子であることが明らかになった。

CREBHは肝臓に高発現している転写因子であるため、肝臓のサンプルを用いてCREBHによって発現を制御されている遺伝子をマイクロアレイ法により解析した。その結果、スルピリンの代謝に関与していると報告されているCYP2Bの発現がスルピリン投与時において、CREBH欠損マウスは野生型マウスに比べて低いことが判明した。CYP2BがスルピリンショックのCREBH欠損マウスにCYP2B6をin vivoトランスフェクションし、スルピリンに対する感受性を解析したところ、CYP2B6を発現させたCREBH欠損マウスのスルピリン耐性が失われたことから、CYP2BがスルピリンショックCYP2Bの発現を制御しているかを確認するためにCYP2B10のプロモーターを含むルシフェラーゼレポータープラスミドを作製し、Huh7細胞にCREBH発現ベクターと共にトランスフェクションし、プロモーター活性を測定したところ、CREBHはCYP2B10のプロモーターを活性化していた。

スルピリン投与マウスの肝細胞にてCHOP,スプライス型XBP1の発現上昇がmRNAレベルで確認された。またCREBHを発現させた293T細胞をスルピリン刺激するとCREBHの活性化、及び核移行が観察された。以上より、スルピリンがERストレスを誘導してCREBHを活性化することを確認した。

スルピリンの投与前にRNAiベクターを用いたin vivoトランスフェクションを行い、一時的にCREBHの発現を抑えることで、血中4-AA濃度の上昇がコントロール群に比べて低く抑えられ、スルピリンに耐性になることが明らかになった。

〔総　括(Conclusion)〕

CREBHはスルピリンにより活性化され、CYP2Bの転写における正の制御因子として働くことにより、スルピリンショックの発現に関与することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

申請者らは、CREBHがスルピリンにより活性化され、薬物代謝酵素であるCYP2Bファミリー遺伝子の転写における正の制御因子として働くことにより、スルピリンショックの発現に関与することを明らかにした。申請者らはこれを証明するために、CREBH欠損マウスにCREBH または CYP2B6の in vivo トランスフェクションをおこない、スルピリンに対する感受性が生存率の解析で戻っているのを確認しているが、このデータは in vivo トランスフェクション群とコ

ントロール群で非常にきれいな差を認め、CREBH または CYP2B6が直接的にスルピリンショックの発現に関与することを示すものとなっている。また、CREBH のin vivo ノックダウンマウスがスルピリン投与に耐性を示すというデータは、ヒトにおいてもCREBHを標的としたスルピリンショックの予防的効果を期待させる結果となっている。

これらの発見は小胞体ストレス関連因子と薬害との関連性という新しい概念を提唱したものであり、今後CREBHをはじめその他の小胞体ストレス関連因子と薬物の副作用の関係の研究という分野の先駆けになることが期待される。

以上の理由により、学位の授与に値すると考えられる。