

氏名(本籍)	坂本洋平(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第435号
学位授与年月日	平成29年12月18日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	マウスにおけるCyp2B誘導化合物による肝肥大及び肝発がんへのconstitutive androstane receptor (CAR)の関与に関する研究
論文審査委員	(主査)代田欣二 (副査)浅井史敏 白井明志

論文内容の要旨

現代人は、環境や食事・水を介して様々な化学物質に暴露されている。これらの化学物質については、人体に与える影響のポテンシャルや暴露量との関係についてリスク評価が行われている。その一つの手法として、主にげっ歯類を用いた毒性試験が取り入れられており、ヒトへの有害性の推測に有用な情報をもたらしている。一方、生理機能や代謝反応には動物種差があることから、毒性試験の結果については実験動物における反応や影響の発現メカニズムを考慮した上でヒトへの外挿性を検討する必要がある。特に実験動物で発がん性が認められた化学物質の場合、ヒトへの外挿性の判断は有害性評価の最も重要なポイントとなる。

げっ歯類とヒトでの発がん性について種差が明らかとなっている化学物質の一例としてフェノバルビタール(PB)が挙げられる。PBは実験的にげっ歯類で肝肥大、肝発がんを起こすことが知られている。一方、ヒトにおいては疫学的研究結果から肝発がんに関与しないことが知られている。この種差については近年の研究の進展により徐々に明らかにされてきた。すなわち、げっ歯類においてPBは、cytochrome P450 2b (Cyp2b)等の代謝酵素誘導や肝細胞増殖を起こし、肝肥大・肝発がんを誘発するが、異物の解毒/代謝に関わる核内受容体であるconstitutive androstane receptor (CAR)をノックアウトしたマウス(CARKOマウス)では肝肥大/肝発がんが誘発されない。一方、ヒト由来のCARを発現させたマウスへの暴露では肝肥大は起こるものの、肝細胞増殖が起こらない。これらの知見の蓄積により、Cyp2b誘導化合物によるげっ歯類での肝発がんについて、CARの関与やその他PBの代謝といくつかの共通するkey eventを有する場合は、「ヒトへの外挿性なし」とするmode of action (MOA)の考え方が提唱され、広く受け入れられつつある。しかし、化学物質によるCAR活性化機序やその下流の薬物代謝酵素の誘導パスウェイ、あるいは細胞増殖に至る過程は完全には解明

されておらず、様々な Cyp2b 誘導化合物がある中で、画一的な基準で肝発がん性のリスク評価を行ってしまうことには大きな懸念が残る。

そこで本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導して肝肥大・肝発がんを起こすピペロニルブトキシド (PBO) 及びデカブロモジフェニルエーテル (DBDE) について、肝肥大及び肝発がん と CAR との関連性について調べ、これら Cyp2b 誘導化合物の肝発がん性のヒトへの外挿性を検討することを第一の目的とした。実験では、野生型及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を混餌投与し、肝重量測定、病理組織学的検査、肝細胞増殖活性、及び肝薬物代謝酵素の発現量変化について検討するとともに、PB 型の肝発がんに関わる変化 (肝肥大、肝細胞増殖活性の亢進等) の比較を行い、外挿性について考察した。また、発がん性における CAR 以外の核内受容体の関与についても調べることで、Cyp2b 誘導化合物の MOA 分析の妥当性を検討することを第二の目的とした。

第 1 章では、雄性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 1 週間、4 週間、あるいは肝発がんイニシエーターであるジエチルニトロソアミン (DEN) 単回投与後に 27 週間混餌投与し、肝肥大及び肝発がんにおける CAR の関与を調べた。その結果、PBO の 5,000 ppm 混餌投与では、野生型マウスで強く Cyp2b を誘導し CAR の活性化が示されたが、肝肥大は野生型マウスと CARKO マウスの両方で認められた。PBO の投与では遺伝子型に関わらず Cyp3a の誘導もみられ、本剤による肝肥大には CAR 以外に pregnane X receptor (PXR) も関与している可能性が示された。肝細胞増殖活性は、野生型マウスでは PBO と PB で、CARKO マウスでは PBO のみで亢進していた。肝発がん性については、PBO は PB と同様に、野生型マウスで好酸性の増殖性病変を誘発し、CARKO マウスではこれが大幅に抑制されたことから、PBO による肝発がんは主に CAR に依存していることが明らかとなった。ただし、PBO は CARKO マウスにおいても陰性対照群よりも増殖性病変の発生頻度及び発生数が僅かながら高く、CAR 以外にも酸化ストレスや PXR を介した肝臓での代謝変化も腫瘍発生に寄与している可能性も考えられた。DBDE の 50,000 ppm 混餌投与では、野生型マウスのみで Cyp2b の誘導及び肝肥大が認められ、DBDE の肝肥大は CAR に依存していることが明らかとなった。一方、DBDE による肝発がん性については、野生型及び CARKO マウスの両方で好塩基性の増殖性病変を増加させ、Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1 の mRNA 発現レベルを上昇させたことから、肝発がん促進作用には aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与している可能性が考えられた。

第 2 章では、マウスの肝腫瘍の発生頻度には性差があること、化合物によっては CAR の感受性にも性差があることから、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 4 週間、あるいは DEN 単回投与後に 27 週間混餌投与し、第 1 章に準じた各種検索を実施し雌雄差を検討した。その結果、PBO による肝肥大、肝発がんについて雌雄差は認められなかった。すなわち、雌マウスにおいても肝肥大には CAR 以外に PXR の関与が疑われた一方で、肝発がんについては CAR に依存して好酸性の増殖性病変が誘発された。DBDE については、雄での肝肥大は CAR に依存していたのに対し、雌では CAR 以外の経路が肝肥大に寄与する可能性が示された。また、雄性マウスで DBDE 投与により CAR に依存せず増加した好塩基性の増殖性病変は、雌では野生型マウスで変異肝細胞巢の若干の増

加がみられたのみであり、雌雄で感受性の違いがみられた。DEN によるイニシエーション作用によって誘発される好塩基性の肝腫瘍は性ホルモンによる影響を受けることが知られており、本実験において DBDE により誘発される好塩基性の増殖性病変の感受性の雌雄差と一致するものであった。

第 3 章では、PBO による肝肥大における投与用量と活性化される核内受容体の関連性について調べた。本章では 5,000 ppm（高用量）に加え、中用量（1,000 ppm）、低用量（200 ppm）の PBO 投与群を設定し、1 週間の混餌投与を行い、CAR、PXR、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、及び AhR の各核内受容体の標的である Cyp2b、Cyp3a、Cyp4a、及び Cyp1a の発現を mRNA 及びタンパクレベルで解析した。その結果、高用量と異なり中用量では野生型マウスのみで肝肥大、Cyp2b10 mRNA 発現レベルの増加、及び抗 Cyp2b 抗体に対する小葉中心性の陽性反応増強がみられたことから、中用量での肝肥大には CAR のみが寄与していることが明らかとなった。本章の実験結果から、PBO による酵素誘導及び肝肥大では、投与量により関与する核内受容体が異なることが示された。

以上の研究結果から、DBDE による発がんについては CAR 以外の経路が示唆され、PB とは異なるタイプの肝発がんプロモーション作用を有すると考えられ、MOA 分析によって「ヒトへの外挿性なし」との判断はできないと結論した。しかし、DBDE は好塩基性の腫瘍がもともと少ない雌マウスでは腫瘍を誘発しなかったこと、及び本研究での DBDE は 50,000 ppm と非常に高濃度であり、また DBDE の生体吸収性は非常に低いとされていることから、実際のリスク管理においては、げっ歯類で誘発される腫瘍のタイプに応じた発生メカニズム考察や、ヒトでの暴露量も含めた考察が必要になるであろう。

PBO については、CAR 活性化、好酸性の変異肝細胞巣／腺腫の誘発などの PB タイプの MOA の key events を満たしていた。一方、PBO は CARKO マウスでも僅かながらに増殖性病変を増加させ、肝肥大には PXR といった他の核内受容体の関与も示されたことから、CAR 以外の経路も弱いながら肝発がん促進に寄与する可能性が示唆された。しかしながら、MOA 分析結果のヒトへの外挿性については、key events の確認に加えてヒトと実験動物間での暴露量や代謝機能の違いを考慮に入れる必要があり、第 3 章では中用量の PBO による肝肥大には、CAR のみが関与していることを明らかにした。よって、中用量では増殖性病変の発生も完全に CAR に依存していることが推察され、その場合は「ヒトへの外挿性なし」と判断できる可能性が高いと考えた。

化学物質のげっ歯類での肝発がん性について、ヒトへの外挿性を検討するために用いられる MOA 分析は、化学物質を適切に管理しながら使用していくために非常に有用なツールである。しかし、通常実施されている野生型マウスやラットを用いた毒性試験では、CAR に依存した肝肥大や肝発がんによって他の経路を介した作用がマスクされてしまう可能性があり、潜在的なリスクを見逃す恐れがある。本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導する非遺伝毒性の化学物質である PBO 及び DBDE について、CARKO マウスを効果的に用いることで、肝肥大／肝発がんにおける CAR 及びその他の核内受容体の関与を明らかにし、げっ歯類での発がん性のヒトへの外挿性判断を行った。また、本研究で用いた化合物に限らず、Cyp2b 誘導化合物の発がん性について CARKO マウスを用いた実験手法を MOA 分析と組み合わせることで、より正確で信頼性の高い評価を行うことができると結論した。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の内容

主にげっ歯類を用いた化学物質の毒性試験、特に発がん性試験の結果についてはヒトへの外挿性の判断が最も重要なポイントである。動物実験結果のヒトへの外挿性の評価は、実験動物における反応や影響の発現メカニズム mode of action (MOA) を考慮した上で検討する必要がある。げっ歯類とヒトでの発がん性について種差が明らかとなっている化学物質の一例としてフェノバルビタール (PB) が挙げられる。PB は実験的にげっ歯類で肝肥大、肝発がんを起こすことが知られているが、ヒトでは肝発がんに関与せず種差があることが知られている。すなわち、PB はげっ歯類において、異物の解毒／代謝に関わる核内受容体である constitutive androstane receptor (CAR) の活性化から cytochrome P450 2b (Cyp2b) 等の代謝酵素誘導や肝細胞増殖を起こし、肝肥大・肝発がんを誘発するが、ヒト由来の CAR を発現させたマウスへの暴露では肝細胞増殖が起こらないことが明らかになっている。これらの知見の蓄積により、Cyp2b 誘導化合物によるげっ歯類での肝発がんについて、CAR の活性化や代謝酵素誘導といったいくつかの共通する key event を有する場合は、「ヒトへの外挿性なし」とする MOA 解析の考え方が提唱され、広く受け入れられつつある。しかし、化学物質による CAR 活性化機序やその下流の薬物代謝酵素の誘導パスウェイ、あるいは細胞増殖に至る過程は完全には解明されておらず、様々な Cyp2b 誘導化合物がある中で、画一的な基準で肝発がん性のリスク評価を行ってしまうことには大きな懸念が残る。

そこで申請者は、3 章より構成される本研究において、げっ歯類で PB と同様に Cyp2b を誘導して肝肥大・肝発がんを起こす非遺伝毒性物質ピペロニルブトキシド (PBO) 及びデカブロモジフェニルエーテル (DBDE) を対象として、CAR ノックアウトマウス (CARKO マウス) と野生型マウスの比較解析において、肝肥大及び肝発がん CAR との関連性について解析し、これら Cyp2b 誘導化合物の肝発がん性のヒトへの外挿性を検討した。また、肝発がん性における CAR 以外の核内受容体の関与についても調べ、Cyp2b 誘導化合物の MOA 解析の妥当性に関する新知見を得た。

2. 論文審査

1) テーマのたて方

げっ歯類において CAR の活性化から Cyp2b の誘導、肝細胞増殖を起こし、肝肥大・肝発がんを誘発するものの、その結果が「ヒトへの外挿性なし」とされる PB に着目し、PB 同様にげっ歯類で Cyp2b を誘導して肝肥大・肝発がんを起こす非遺伝毒性物質 PBO 及び DBDE について、肝肥大及び肝発がん CAR との関連性を詳細に検討し、Cyp2b 誘導化合物の毒性評価における MOA 解析の妥当性を検討し、現在、広く受け入れられつつある MOA 解析といった画一的な基準による化学物質発がん性のリスク評価が妥当であるかを検証することを目的とした本研究のテーマは、化学物質の毒性リスク評価の現状について着目し、問題意識を持って立てられたものであり、科学のおよび社会的意義が大きい

いものと評価できる。

2) 研究の背景

化学物質が人体に与える影響のポテンシャルや暴露量との関係について、主にげっ歯類を用いた毒性試験によるリスク評価が行われている。この動物実験の結果はヒトへの有害性の推測に有用な情報をもたらしているが、生理機能や代謝反応には動物種差があることから、試験結果については実験動物における反応や影響の発現メカニズムを考慮した上でヒトへの外挿性を検討する必要がある。特に実験動物で発がん性が認められた化学物質の場合はヒトへの外挿性の判断が有害性評価の最も重要で難しいポイントとなる。現在、この外挿性の判断手法の一つとして MOA 解析の考え方が広く受け入れられつつあるが、このような画一的な基準で発がん性のリスク評価を行ってしまうことに大きな懸念もある。申請者はこのような現状について問題意識を持ち、研究に着手している。

3) 研究の方法

CARKO マウスと野生型マウスに PB 及び DBDE を投与し、誘発される肝肥大及び肝発がん（イニシエーターであるジエチルニトロサミン投与による二段階化学発がん試験）と CAR との関連性について、形態病理学的、免疫病理学のおよび分子病理学的手法によって詳細に解析しており、研究目的とテーマにふさわしい研究方法を用いている。

4) 研究の結果

第 1 章では、DBDE による Cyp2b 誘導及び肝肥大は PB と同じく CAR に依存していることを明らかにし、PBO による肝肥大は Cyp3a の誘導もみられたことから PXR が関わっている可能性を示した。肝発がんについては、PBO では主に CAR が関与していることを明らかにし、DBDE では、Cyp1a family を誘導することから、発がんには aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関わっている可能性を示唆した。

第 2 章では、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスを用い第 1 章の雄性マウスでの実験結果との比較を行った。その結果、PBO による肝肥大では CAR に依存しない経路が存在するが、肝発がんについては CAR に依存し、雌雄差が無い事を明らかにした。また、DBDE では、雄と異なり CAR に依存しない経路で肝肥大を誘発することを示した。また、好塩基性及びその他のタイプの増殖性病変の発生数に雌雄差がある事を明らかにした。

第 3 章では PBO について投与量による肝臓の反応を検討し、高用量では CAR 以外にも肝肥大に PXR 経路が関わる可能性が示唆されたものの、中用量においては、主に CAR の活性化により肝肥大が誘発され、PXR の関与は小さいことを示した。また、PBO による肝肥大については、投与量によって関与する核内受容体に変化することを明らかにした。

5) 考察と結論

DBDEによる肝発がんについてはCAR以外の経路が示唆され、PBとは異なるタイプの肝発がんプロモーション作用を有することが示唆され、MOA分析によって「ヒトへの外挿性なし」との判断はできないと結論した。しかし、DBDEは好塩基性の腫瘍がもともと少ない雌マウスでは腫瘍を誘発しなかったこと、及び本研究で投与したDBDEは50,000 ppmと非常に高濃度であり、またDBDEの生体吸収性は非常に低いと言われていることから、実際のリスク管理においては、げっ歯類で誘発される腫瘍のタイプに応じた発生メカニズムの考察や、ヒトでの暴露量も含めた考察が必要になるとした。PBOについては、CAR活性化、好酸性の変異肝細胞巣／腺腫の誘発などのPBタイプのMOAのkey eventsを満たしていたが、高用量ではPXRといった他の核内受容体の関与も示され、CAR以外の経路も弱いながら肝発がん促進に寄与する可能性を示唆した。しかし、中用量のPBOによる肝肥大には、CARのみが関与していることを明らかにし、中用量では増殖性病変の発生も完全にCARに依存していることから、この場合は「ヒトへの外挿性なし」と判断できる可能性が高いと考察した。

以上のような実験結果から、申請者はMOA解析によるヒトへの外挿性については、key eventsの確認に加えてヒトと実験動物間での暴露量や代謝機能の違いも考慮に入れる必要があると結論した。また、MOA解析はヒトへの外挿性を検討するために有用なツールであるが、通常実施されている野生型マウスやラットを用いたCyp2b誘導化合物の毒性試験では、CARに依存した肝肥大や肝発がんによって他の経路を介した作用がマスクされてしまう可能性があり、潜在的なリスクを見逃す恐れがある事を今回の研究で明らかにした。

本研究では、げっ歯類でCyp2bを誘導する化学物質の毒性評価について、CARKOマウスを効果的に用いることで、肝肥大／肝発がんにおけるCAR及びその他の核内受容体の関与を明らかにし、げっ歯類での発がん性のヒトへの外挿性の判断が出来ることを示した。さらに、本研究で用いた化合物に限らず、Cyp2b誘導化合物の発がん性についてCARKOマウスを用いた実験手法をMOA解析と組み合わせることで、より正確で信頼性の高い評価を行うことができると結論した。

6) 参考論文

本学位申請論文における参考論文は、本研究の背景、内容、考察の展開において十分かつ適切に引用されている。

3. 審査結果

上記2-1)~6)の評価項目についての審査を行った結果、本論文は博士（獣医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと判定した。

さらに、本論文の審査の過程で、申請者が当該分野に関する十分かつ広範な知識を有する事、また、論文発表会での質疑における回答からも、申請者が本研究の立案、実験実施、論文作成について主体的に行い、研究の背景や当該分野の現状における解決すべき課題について十分な知識を持つと判定した。