

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

ヘム代謝を指標とする定量的毒性試験法の確立

研 究 報 告 書

主任研究者 藤 田 博 美

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

ヘム代謝を指標とする定量的毒性試験法の確立

代表研究者 藤田 博美 北海道大学医学部

研究要旨 ポルフィリン誘導体、トブラマイシン、さらにはNO供与体がヒト培養細胞におけるヘム分解系の律速酵素の誘導現象を介して毒性の評価が可能であることが示唆された。さらに、これまで未知であった筋細胞系および胎児一胎盤系における毒性評価を行うための基礎的な研究を行い、合成系酵素の発現機構の一端を明らかにした。

代表研究者 藤田 博美
北海道大学医学部
教授

A. 研究目的

NO供与体、ポルフィリン誘導体、トブラマイシンといった各種の薬剤を用いて、ヘム代謝系が毒性の指標として利用可能であるか否かを解析する。

B. 研究方法

ヒト培養細胞系を中心とする実験を行い、NO供与体ポルフィリン誘導体、トブラマイシンといった各種の薬剤がヘム分解系の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1の発現に及ぼす影響を解析する。

さらにこれまで殆どヘム代謝に関する研究が行われていなかった筋細胞系及び胎児一胎盤系を対象として基礎的な解析を行い明年度以後の実験の基礎的データを得る。

C. 研究結果

NO供与体、ポルフィリン誘導体、トブラマイシンの結果は分担研究者の報告にあるように、今後の成果が期待される。

一方、筋細胞系についての解析で、基本的に肝細胞系に近いこと、さらには合成系の転写調節に関与する領域が明らかにされ始めている。また、胎児一胎盤系の解析では胎盤系でのヘム代謝調節が正常な胎児の発育に重要であることが示され、今後、次世代毒性を解析して行く上での重要な知見が得られた。

D. 考察

ヘムオキシゲナーゼ-1の誘導現象をヒト細胞系での薬物作用の指標として利用出来る可能性が示唆された。

さらに、これまでよく研究されてきた肝臓あるいは赤血球系での上記の成果に加えて、筋細胞系でヘム代謝系が利用できるか否かを明らかにするための基礎的成果が得られた。

一方、次世代毒性を検討する上で、胎児一胎盤系のヘム代謝調節を指標とすることが重要であることが示唆された。

E. 結論

ヘム代謝系の遺伝子発現を、薬剤のヒト肝細胞及び造血細胞への毒性の解析に用いる可能性が示された。さらに、筋細胞系、胎児一胎盤系についての今後の解析を行う上での基礎が明らかになった。

F. 研究発表

1. H. Harigae, N. Suwabe, P.H. Weinstock, M. Nagai, H. Fujita, M. Yamamoto, and S. Sassa: Deficient heme and globin synthesis in ES cells lacking the erythroid-specific δ -aminolevulinate synthase gene. *Blood*, 91: 798-805, 1998.
2. T. Nagai, K. Igarashi, J. Akasaka, K. Furuyama, H. Fujita, N. Hayashi, M. Yamamoto & S. Sassa: Regulation of NF-E2 Activity in Erythroleukemia Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.*, 278: 5358-5365, 1998.
3. N. Ihara, R. Akagi, K. Ejiri, T. Kudo, K. Furuyama & H. Fujita: Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS letter*, 439: 163-167, 1998.

E. 知的所有権の取得状況

本年度はなし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

ヘム代謝を指標とする定量的毒性試験法の確立

分担研究者 柴原 茂樹 東北大学医学部

研究要旨 今後、様々な応用が期待されているNO供与体を用いて、ヒト培養細胞におけるヘム分解系を指標とした試験を行い、分解系の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1の誘導現象が利用可能であることを示した。

分担研究者 柴原 茂樹
東北大学医学部
教授

利用出来る可能性が示唆された。

ことに、NO供与体であるニトロプルシドに直接影響される可能性のある誘導型NO合成酵素の発現に変化が認められない条件下で、NO代謝とは直接に関わらないヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子の誘導が認められたことは、本研究の目的からして有望な成果と考えられる。

E. 結論

ヘム分解系の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1の遺伝子発現を、薬剤のヒト神経細胞に対する影響の解析に用いる可能性が示された。

F. 研究発表

- 1) E. Hara, K. Takahashi, H. Fujita and S. Shibahara: Expression of Heme Oxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA in a Human Glioblastoma Cell Line. in "Oxygen Homeostasis and Its Dynamics." Y. Ishimura, H. Shimada and M. Suematsu, eds., Springer-Verlag Tokyo, pp. 328-332, 1998.
- 2) S. Shibahara: Transcriptional Factors Acting on the Human Heme Oxygenase-1 Gene. Porphyrins, 7: 246-251, 1998.

A. 研究目的

薬物の一例として、今後循環系への応用が期待されているNO供与体を用いて、ヘム分解系の律速酵素がどのように応答するか、指標として利用可能であるか否かを解析する。

B. 研究方法

ヒト神経系培養細胞A172を用いて実験を行い、代表的なNO供与体であるニトロプルシドがヘム分解系の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1の遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにする。

C. 研究結果

代表的なNO供与体であるニトロプルシドはヒト神経系培養細胞A172において濃度依存的にヘムオキシゲナーゼ-1の発現を誘導した。しかしながらニトロプルシド投与により影響を受ける可能性が考えられた誘導型NO合成酵素の遺伝子発現には何ら変化は認められなかった。

D. 考察

ヘムオキシゲナーゼ-1の誘導現象をヒト神経細胞系での薬物作用の指標として

E. 知的所有権の取得状況

本年度はなし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

ヘム代謝を指標とする定量的毒性試験法の確立

分担研究者 小川 和宏 東北大学医学部

研究要旨 ポルフィリン誘導体やトブラマイシンは、転写因子を介する機序などによりヘム代謝酵素の発現変動を起こすことが判明した。ヘム代謝酵素の発現変動は、薬物の毒性を検出、解析する系として有用であることが示された。

分担研究者 小川 和宏
東北大学医学部
日本学術振興会特別研究員

合活性を低下させることで、ALAS-E の発現を抑制することが示唆された。

A. 研究目的

薬物によるヘム代謝酵素の発現変動を調べるとともにヘムが作用するタンパクを探索し、毒性発現の機序を解析する。

B. 研究方法

ポルフィリン誘導体やアミノグリコシド系抗生物質であるトブラマイシン等のヘム代謝に与える影響を、ノザンプロット法やゲルシフト法で調べた。

C. 研究結果

ポルフィリン誘導体やトブラマイシンはヘム分解系の律速酵素、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)の mRNA を誘導する一方、トブラマイシンは赤血球系細胞でのヘム合成の律速酵素、赤血球型 δ -アミノレブリン酸合成酵素(ALAS-E)の mRNA レベルを用量依存的に低下させた。

またトブラマイシンは GATA-1 や NF-E2 等の赤血球系転写因子の DNA 結合活性を低下させた。

D. 考察

HO-1 の誘導は、異なった種類の薬物の毒性をモニターできる可能性がある。

トブラマイシンは赤血球系転写因子の DNA 結

E. 結論

ヘム代謝酵素の発現変動は、薬物の毒性を検出、解析する系として有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤田博美, 島田薫, 小川和宏, 古山和道; ヘム合成障害の分子遺伝学. ポルフィリン, 7, 1-32(1998)
- 2) K. Takahashi, K. Furuyama, K. Ogawa, T. Saito, S. Sassa & H. Fujita; Hemochromatosis Factor Gene in a Patient with Hepatoerythropoietic Porphyria. Porphyrins, 7, 476-481(1998)

2. 学会発表

- 1) 小川和宏, 柴原茂樹, 藤田博美; ポルフィリン化合物による低酸素応答誘導 (日本生化学会)
- 2) 藤田博美, 齊藤健, 高橋恭子, 小川和宏; 環境応答としてのヘム代謝 (日本衛生学会)
- 3) 藤田博美, 小川和宏, 柴原茂樹; ストレス応答におけるヘム代謝 (日本薬学会)

G. 知的所有権の取得状況

本年度はなし