

へム代謝を指標とする 定量的毒性試験法の確立

(課題番号：H10-医薬-026)

平成11年度厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)
研究成果報告書

平成12年

研究代表者 藤田博美
北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座環境医学分野

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 代表的な薬物毒性の発現であるハロタン中毒、また遺伝性の解毒機構の欠損であるグルクロン酸抱合不全において病態の発現に細胞内遊離ヘム濃度が関係していることを明らかにした。このことは、本研究の最終目的である定量的毒性試験法の一つとして細胞内遊離ヘム量の直接定量法を開発する意義を示していると考えられる。

代表研究者 藤田 博美
北海道大学大学院医学研究科
教授

定量法が開発が本研究計画の目的達成に重要であることを示している。

A. 研究目的

各種の病態の発現機構への細胞内遊離ヘムの関与を解析し、本研究計画の目指す試験法として細胞内遊離ヘム濃度の直接定量が持つ汎用性を明らかにする。

B. 研究方法

最も良く知られている薬剤性の肝臓障害であるハロタン肝炎の発病機構においてヘム代謝系が果たしている役割を明らかにする。

さらに薬物毒性の解毒を司る第二相反応の障害モデルを用いて、第二相反応の欠失が第一相反応を司るチトクロームP-450に補欠分子族を供給し、また終末代謝産物が第二相反応で解毒されるヘム代謝系にどのような影響を持つかを病態生化学的に解析する。

C. 研究結果

ハロタン肝炎の発病にプロオキシダントとしての遊離ヘム濃度の異常な上昇が関与していることを明らかにした。

また第二相反応の欠失によっても細胞内遊離ヘム濃度が高くなることが示唆され、発症の指標として有用であると考えられた。

D. 考察

細胞内遊離ヘム濃度の異常が薬剤毒性の発現や遺伝疾患の発症機構に関与していることが示された。このことは遊離ヘム濃度の直接

E. 結論

病態モデルを用いた解析で、薬物毒性の発現や解毒機構の障害による発病メカニズムに関連して細胞内遊離ヘム濃度の変動が認められることが明らかとなった。従って、細胞内遊離ヘム濃度の直接定量法を開発する必要がある。

F. 研究発表

1. K. Takahashi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Fujita & S. Shibahara: Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon- γ in human glioblastoma cells. *J. Neurochem.*, 72: 2356-2361, 1999.
2. E. Hara, K. Takahashi, K. Takeda, M. Nakayama, M. Yoshizawa, H. Fujita, K. Shirato & S. Shibahara: Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. *Biochem. Pharmacol.*, 58: 227-236, 1999.
3. Y. Odaka, T. Takahashi, A. Yamasaki, T. Suzuki, T. Fujiwara, T. Yamada, M. Hirakawa, H. Fujita, E. Ohmori & R. Akagi: Prevention of halothane-induced hepatotoxicity by hemin pretreatment: The protective role of heme oxygenase-1 induction. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 871-880, 1999.
4. K. Furuyama, M. Kondo, H. Fujita, N. Hayashi, K.E. Anderson & S. Sassa: Absence of C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene in Japanese patients with sideroblastic anemia. *Amer. J. Hematol.* 61: 276, 1999.
5. K. Furuyama, K. Hirata, M. Kondo, H. Fujita & S. Sassa: Extreme rare association of HFE mutations with porphyria cutanea tarda in Japanese patients. *Hepatology*, 30: 1532-1533, 1999.

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 本研究の最終目的である定量的毒性試験法の一つとして細胞内遊離ヘム量の直接定量法を開発する意義が示されたので、直接定量法の開発に必要な基礎的研究を行っている。研究対象は転写因子Bach1であり、ヘムが同因子と結合し機能をどのように制御しているかについて解析を進めており、既に結合ドメインに関して明らかにした。

分担研究者 小川 和宏
東北大学大学院医学系研究科
日本学術振興会特別研究員

転写調節因子Bach1の機能の解析を行い、ヘムの結合部位、およびヘムあるいは金属ポルフィリンの結合により機能が調節されることを明らかにした。

A. 研究目的

各種の病態の発現機構への広範な関与が示唆された細胞内遊離ヘムの直接定量を開発するための基礎的な解析をおこなう。

B. 研究方法

ヘムが結合する転写因子Bach1のヘム結合部位を同定する。

さらにヘム結合により同転写因子の機能がどのように変化するかの解析を行う。

これらの解析から直接定量に必要なとなる蛋白質ドメインを決定し、直接定量を効率的に行うことの出来るキメラ蛋白質の設計に役立つ。

C. 研究結果

転写因子Bach1にはヘムのみならず一般的な金属ポルフィリンも配位しうること、これらの配位によって機能が変化することを示した。さらに配位に必要なとされる部位の同定を試みシステイン-プロリン配列が必須であることを明らかにした。

現在、ヘムの配位がどのようなメカニズムで転写機能に影響するかを解析している。

D. 考察

細胞内遊離ヘム濃度の定量に用いるために

E. 結論

本研究で明らかとなったヘムの結合部位を含むドメインと、現在解析中のヘムによる機能調節を受けるドメインをゆうするキメラ蛋白質を培養細胞系に導入・発現し、レポーターとして用いることで細胞内遊離ヘム濃度の直接定量が可能になると考えられる。

F. 研究発表

1. 小川和宏、柴原茂樹、藤田博美：環境分子応答におけるヘム、日本薬理学雑誌、114: 255-264, 1999.

(学会発表)

1. 小川和宏、五十嵐和彦、竹谷茂、吉田近思、山本雅之、柴原茂樹、林典夫、藤田博美：ヘムによる転写因子Bach1の活性調節、第72回生化学会、横浜、1999.

2. 藤田博美、小川和宏：遺伝子-環境障害としてのポルフィリン症、第34回日本アルコール・薬物学会、シンポジウム「耐性形成を修飾する遺伝子群」、札幌、1999.

3. 小川和宏、竹谷茂、藤田博美：哺乳類におけるヘムアクセプター、第70回日本衛生学会、大阪、2000.

E. 知的所有権の取得状況

本年度はなし

19990747

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. Crit. Care Med., 28(3): 809-817, 2000	2000	Crit. Care Med.	H. Shimizu, T. Takahashi, T. Suzuki, A. Yamasaki, T. Fujiwara, Y. Odaka, M. Hirakawa, H. Fujita & R. Akagi
Absence of C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene in Japanese patients with sideroblastic anemia. Amer. J. Hematol. 61: 276, 1999.	1999	Amer. J. Hematol.	K. Furuyama, M. Kondo, H. Fujita, N. Hayashi, K.E. Anderson & S. Sassa
Extreme rare association of HFE mutations with porphyria cutanea tarda in Japanese patients. Hepatology, 30: 1532-1533, 1999.	1999	Hepatology	K. Furuyama, K. Hirata, M. Kondo, H. Fujita & S. Sassa
化学物質過敏症、蛋白質・核酸・酵素、44: 2529-2533, 1999.	1999	蛋白質・核酸・酵素 (共立出版)	斎藤健、佐々木浩子、藤田博美
環境分子応答におけるヘム、日本薬理学雑誌、114: 255-264, 1999.	1999	日本薬理学雑誌	小川和宏、柴原茂樹、藤田博美