

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	化学物質のリスク評価の精緻化に向けた肝発がんの発症機序及びヒト齧歯動物間種差の解明				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	志津 怜太
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	吉成 浩一
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	菅野 裕一郎
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	保坂 卓臣
	発表者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	志津 怜太

講演題目	CAR のヒト型変異導入マウスを用いた CAR による肝発がんプロモーション作用の種差解析
------	---

研究の目的、成果及び今後の展望

【目的】肝に高発現し、多種多様な化学物質の曝露により活性化される核内受容体 CAR は、異物代謝酵素の発現調節を担う一方で、その活性化は齧歯動物において肝細胞増殖とそれに伴う肝がんを惹起する。疫学的な研究から、この CAR 依存的な肝発がんには種差があり、ヒトでは起こらないとされているが、分子レベルでの理解がなされていない。最近、我々は、マウス肝において、CAR は細胞増殖促進因子である YAP と相互作用し、YAP の核移行を促進することで肝細胞増殖を誘導することを明らかにした。さらに、YAP は WW ドメインを介してマウス CAR と相互作用するが、ヒト CAR とは相互作用しないことを見出した。WW ドメインは、PP_xY のアミノ酸配列 (PY モチーフ) と特異的に相互作用することが知られている。CAR タンパク質のアミノ酸配列と立体構造を調べた結果、マウス CAR はタンパク質構造の表面に PY モチーフ (PPAY) をもつものに対し、ヒト CAR ではそれに対応する配列が PPAH となっていた。本研究では、この PY モチーフの種差が CAR を介した肝発がんの種差の原因であるという仮説を立て、マウス CAR の PY モチーフをヒト型に変異 (PPAY→PPAH) させた遺伝子改変マウスを用いて、CAR の PY モチーフのヒト型変異が肝細胞増殖に与える影響を解析した。【方法】CAR 遺伝子にヒト型変異を導入したマウス (CAR-Y150H 変異型マウス) を作製し、CAR-Y150H 変異型および野生型の雄性マウスに CAR 活性化薬であるフェノバルビタール (PB: 100 mg/kg/日) 又は溶媒である生理食塩水を、3 日間連続で腹腔内投与し、最終投与の 24 時間後に屠殺し、肝を摘出した。細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫組織染色により肝細胞増殖の程度を調べた。肝核抽出液を用いたウエスタンブロット法により、核内の YAP レベルを調べた。肝 RNA を用いた定量的逆転写 PCR 法により、CAR 標的遺伝子、YAP 標的遺伝子及び細胞増殖関連遺伝子の mRNA レベルを測定した。【結果・考察】肝 Ki-67 陽性細胞数は、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、CAR-Y150H 変異型マウスでは増加しなかった。核内 YAP タンパク質レベルは、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、CAR-Y150H 変異型マウスでは増加しなかった。CAR 標的遺伝子である *Cyp2b10* の mRNA レベルは、PB 投与により両マウスで増加したが、細胞増殖関連遺伝子である *Ccna2* や YAP 標的遺伝子である *Birc5* の mRNA レベルは、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、変異型マウスでは増加しなかった。以上、CAR-Y150H 変異型は、野生型マウスと異なり CAR 活性化に伴う肝細胞増殖が見られないことから、CAR 依存的な肝細胞増殖のヒトと齧歯動物間の種差は、PY モチーフの一アミノ酸の差異によって決まる可能性が示された。