

氏 名	森 岡 (太田) 依 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 4 5 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Inhibitory effect of 5 α -pregnane-3 β ,20 β -diol on transcriptional activity and enzyme activity of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase(UGT1A1) (5 α -pregnane-3 β ,20 β -diol の UGT1A1 の 転写調節および酵素活性に及ぼす影響)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 村 富 夫 副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 寺 田 智 祐

論文内容要旨

※整理番号	650	(ふりがな) 氏名	もりおか よりこ 森岡 依子 (旧姓 太田)
学位論文題目	Inhibitory effect of 5β -pregnane- $3\alpha, 20\beta$ -diol on transcriptional activity and enzyme activity of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) (5β -pregnane- $3\alpha, 20\beta$ -diol の UGT1A1 の転写調節および酵素活性に及ぼす影響)		
<p>研究の目的：母乳性黄疸は新生児期にみられる遷延性黄疸であり、母乳栄養児の約 15%～20%に認められる。母乳性黄疸の血清ビリルビン値は 20mg/dl を超えることもあり、核黄疸を来す危険性もあり、新生児医療においては重要である。母乳性黄疸は、1963 年に Newman と Arias らにより初めて母乳性黄疸についての報告がなされた。母乳中の原因物質としては、過去に 5β-pregnane-$3\alpha, 20\beta$-diol (プレグナンジオール)、β-グルクロニダーゼおよび遊離脂肪酸などが示唆されていたが、いまだその同定には至っていない。2000 年、母乳性黄疸の乳児側の原因については、丸尾らよりビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の遺伝子変異 (G71R) が存在することが証明された (Maruo Y et al, Pediatrics 2000)。今回、私は母乳側、母乳中に含まれる原因物質としてこれまで関与が疑われている、プレグナンジオールが UGT1A1 の転写活性および酵素活性に阻害をおよぼすかについての検討を行った。</p> <p>方法：①プレグナンジオールの転写活性に及ぼす影響の検討 本実験のため 2 つの発現ベクターを作成した。1 つは UGT1A1 の転写調節領域の c-1～c-4076 にわたる全転写領域をピッカジンベクターにライゲーションした発現ベクター (wild type enhancer-promoter)、もう一つは Caucasian や African に多い Gilbert 症候群をきたす変異を転写調節領域にもつものを含む発現ベクター variant type enhancer-promoter (-3279T>G with A(TA)7TAA) を作成、これらを培養細胞 (HepG2 cell) にリポフェクション法を用いて発現させる。この時培地にプレグナンジオールを加え、ルシフェラーゼアッセイにてプレグナンジオールの転写活性に対する阻害効果を検討した。また、転写因子である constitutive androstane receptor (CAR) と pregnane X receptor (PXR) を共発現させ、その存在下でのプレグナンジオールの転写活性への阻害効果を検討した。</p> <p>②プレグナンジオールのビリルビン抱合活性に及ぼす影響の検討 本実験のため 2 つの発現ベクターを作成した。ヒト肝 cDNA ライブラリーより PCR 法を用いて UGT1A1 の cDNA を増幅し、pCR 3.1 ベクターに取り込んだ正常 UGT1A1 ベクターを作成。PKF18 ベクターを用い site directed mutagenesis 法にて c211G>A 変異を導入した変異 UGT1A1 ベクター (G71R) を作成した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

培養細胞 (Cos7 cell) にリポフェクション法を用いて発現ベクターを発現させた。UGT1A1 の活性測定は ^{14}C -UDP-グルクロン酸、ビリルビン、細胞ホモジネート、プレグナンジオール (0-100 μM) を反応させた後、薄層クロマトグラフィーにて展開、酵素活性を測定し、プレグナンジオールのビリルビン抱合反応に対する阻害効果を検討した。酵素活性量は Western blotting で補正を行い、Michaelis-Menten の酵素反応式にて評価を行った。

結果：①プレグナンジオールの転写活性に対する阻害効果の検討

variant type enhancer-promoter は wild type enhancer-promoter に比べて転写活性が 42% に低下していた。しかし、プレグナンジオールは variant type または wild type のどちらの転写活性も低下させなかった。転写因子 CAR または PXR のどちらの存在下においても、プレグナンジオールは転写活性を下げることはなかった。

②プレグナンジオールのビリルビン抱合活性に対する阻害効果の検討

wild-type UGT1A1 の酵素活性は 9.34 ± 1.07 pmol/min/mg protein、G71R UGT1A1 は 7.57 ± 0.90 pmol/min/mg protein であった。G71R UGT1A1 の酵素活性は wild-type UGT1A1 の 81.0% であった。プレグナンジオールの存在下においては、プレグナンジオールの濃度上昇 (0 \rightarrow 100 μM) とともに G71R UGT1A1 の酵素活性は低下した。100 μM プレグナンジオール存在下において、wild type UGT1A1 に対する G71R UGT1A1 の相対活性 (G71R/wild type) は 81.0% \rightarrow 51% にと有意に低下した ($p=0.02$) (Fig. 5)。

考察:これまで、human liver homogenate を用いた、母乳性黄疸の原因候補の酵素活性阻害実験は行われてきたが、いまだ同定できていない。また、発現実験系を用いた、UGT1A1 の転写活性および酵素活性へのプレグナンジオールの直接影響を検討した研究もなく、今回我々の行った研究が初めてである。今回の実験では UGT1A1 の転写活性にはプレグナンジオールは影響を及ぼさないことが分かった。UGT1A1 の酵素活性は、新生児早期には成人の 1% 程度であるが、生後 3 カ月には成人レベルに達することがわかっている (Onishi S et al, Biochem J, 1979)。これは生直後からの転写活性上昇に伴う UGT1A1 酵素量の増加によるが、この転写活性上昇にプレグナンジオールは影響を及ぼさないことが推測された。次に、酵素活性については、プレグナンジオールは wild-type UGT1A1 は阻害せず、G71R UGT1A1 のみ阻害することがわかった。丸尾らの研究で、乳児側の原因が G71R 変異であることがわかっていたが、本研究より、母乳中に含まれるプレグナンジオールが、G71R UGT1A1 のビリルビン抱合活性を直接阻害することが明らかになった。つまり、UGT1A1 の G71R 変異をもつ新生児が、プレグナンジオールを含む母乳を飲むことにより、母乳性黄疸を発症するメカニズムを解明したと考えられる。

結論

本研究ではプレグナンジオールが UGT1A1 のビリルビン抱合活性を阻害することを明らかにした。これにより既知の知見と合わせて、母乳性黄疸の発症メカニズムが、肝での UGT1A1 の酵素活性の低い時期に、G71R 変異を持つ新生児がプレグナンジオールを含む母乳を飲むことで発症することを解明できた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	650	氏名	森岡 依子 (旧姓 太田)
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、新生児医療においてしばしば遭遇する母乳性黄疸の母乳中の原因物質を明らかにする目的で行われた。これまでに母乳性黄疸の乳児側の原因として、ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の遺伝子変異 (G71R) が報告されている。本研究では母乳側の原因物質として関与が疑われているプレグナンジオールに着目し、正常および変異型 UGT1A1 の転写活性ならびに酵素活性に与える影響について、比較検討が行われた。</p> <p>その結果、以下の点が明らかにされた。</p> <p>(1) プレグナンジオールは正常および変異型 UGT1A1 の転写活性には影響を及ぼさなかった。</p> <p>(2) プレグナンジオールは正常型 UGT1A1 の酵素活性は阻害せず、変異型 UGT1A1 (G71R UGT1A1) の酵素活性のみを阻害した。</p> <p>母乳中に含まれるプレグナンジオールが、G71R UGT1A1 のビリルビン抱合活性を直接に阻害することが明らかにされ、母乳性黄疸発症の仕組みの一端が解明された。</p> <p>本研究は、母乳性黄疸の原因物質解明に対して新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(総字数 516 字)			
(平成 23 年 9 月 6 日)			