



Essential role of constitutive androstane receptor in Ginkgo biloba extract induced liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis

Maeda, Jun

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-05-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3349号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003349>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

“Essential role of constitutive androstane receptor in *Ginkgo biloba* extract induced liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis”

「イチョウ葉エキスによる肝肥大と肝発がんに果たす constitutive androstane receptor の役割」

(指導教員： 神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻 齋藤 尚亮 教授)

前田 潤

イチョウ葉エキスは脳機能および記憶の改善等を目的に古くから漢方薬の分野で使われており、欧米においても最も使用量の多い健康食品の一つとなっている。使用量が多いことから、米国政府は種々の物質の毒性、遺伝毒性および発がん性を評価する国家毒性プログラム (NTP) にイチョウ葉エキスをノミネートし、2013 年に毒性評価結果を公表、*In vitro* 遺伝毒性試験 (Ames 試験) の結果から遺伝毒性を誘発する可能性ならびにマウスにおける明らかな肝発がん性が報告された。これを受け、国際がん研究機関 (IARC) はヒトに対する発がん性が疑われるとしてグループ 2B に分類し、ヒトへの安全性が懸念される事態となっている。

しかしながら、*In vitro* 遺伝毒性試験は偽陽性の高さが問題であり、またげっ歯類の発がん性試験で発がん性が認められても、発がん機序の違いによりヒトへは外挿されない腫瘍の存在が明らかになりつつある。このことから、ヒトに対する安全性評価を正しく行うためには、生体内での遺伝毒性の有無ならびに発がん機序を明らかにすることが極めて重要である。しかし、NTP の毒性報告書を含め、イチョウ葉エキスの *in vivo* 遺伝毒性の結果や発がん性の機序に関する研究は報告されていない。そこで、我々はイチョウ葉エキスの肝発がん機序を明らかとするため、NTP の実施した *in vitro* 遺伝毒性試験のより上位の試験であるマウスを用いた *in vivo* 小核試験ならびにトランスジェニックマウス (gpt delta) を用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験を実施し、イチョウ葉エキスが哺乳類に対し遺伝毒性を誘発せず、肝臓の発がん性がイチョウ葉エキスの直接的な遺伝毒性によるものでないことを明らかにしてきた。しかし、イチョウ葉エキスの発がん機序の全容は明らかになっておらず、ヒトへの安全評価上まだ十分とは言えない。そこで本研究では、イチョウ葉エキスが肝臓の肥大を誘導、長期投与により肝臓の発がんを誘発するという毒性プロファイルに着目し、肝臓に多く発現し、細胞増殖活性・薬物代謝酵素誘導・肝肥大・げっ歯類特異的な肝臓発がん機序に密接に関わる核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) の関与について検討を行った。発がんに至るまでの①肝肥大までの初期段階、②肝発がんまでの後期段階のそれぞれの段階における CAR の関与を調べるため、2つの実験を実施した。

まず1つ目の実験として、CAR の肝臓肥大への関与の有無を明らかにするため、CAR 遺伝子を欠損したマウス (以下、CARKO マウス) を用い、イチョウ葉エキスの1週間、4週間および13週間の混餌反復投与試験をそれぞれ実施した。同時に、野生型としてC3H系マウス (以下、野生型マウス) を用いた実験を同様の試験設計で実施した。1群あたり5匹の6週齢の雄性マウスを用い、投与濃度は0 (対照群)、100 (低用量)、1,000 (中用量)、10,000 ppm (最高用量)

とし、最高用量群のイチョウ葉エキス摂取量が NTP の実施したマウス発がん性試験の発がん用量である 2,000 mg/kg 体重/day 相当となるように設定した。イチョウ葉エキスは NTP の試験で使われたものと同一のロットを使用した。

投与期間中にイチョウ葉エキス投与に起因した一般状態の異常ならびに死亡は認められなかった。最終体重は最高用量群において、CARKO マウスおよび野生型マウスともに、対照群と比較して低下あるいは低下傾向にあった。相対肝臓重量は、いずれの投与期間においても、野生型マウスではイチョウ葉エキス投与により対照群と比較して有意に増加した一方で、CARKO マウスではその影響は軽微であった。

肝臓の病理組織学的解析においては、いずれの投与期間においても、野生型マウスにおいて中間用量から用量依存的な小葉中心性の肝細胞肥大が認められた一方で、CARKO マウスにおいては最高用量のみの軽微な肥大しか認められなかった。電子顕微鏡を用いて、肝臓のより詳細な病理評価を実施した結果、13 週間イチョウ葉エキスを投与された野生型マウスにおいて、肝細胞の滑面小胞体の増生が認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆された。一方、CARKO マウスでは滑面小胞体の増生は認められなかった。いずれの投与時期においても肝細胞壊死は観察されなかった。

4 週間および 13 週間投与群で実施した血清生化学的検査においては、肝細胞肥大と一致して、肝臓の障害マーカーであるアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) の軽度の増加が野生型マウスで認められた。一方で、CARKO マウスでは毒性学的意義のある変動は認められなかった。

4 週間投与における肝臓中の薬物代謝酵素の mRNA 発現量を評価した結果、野生型マウスでは低用量から Cyp2b10 の顕著な誘導が認められた。一方で、CARKO マウスでは最高用量のみの軽微な誘導であった。また P450 レダクターゼについても同様の傾向が認められた。Cyp2b10 および P450 レダクターゼは CAR を介した転写制御を主に受けることから、イチョウ葉エキスは、CAR を介して薬物代謝酵素を誘導し、滑面小胞体の増生に伴った肝細胞肥大を引き起こしていると考えられた。また野生型マウスおよび CARKO マウスの両方において、Cyp3a11 の用量依存的な誘導が認められたことから、Cyp3a11 の主要な転写制御因子である核内受容体 pregnane X receptor (PXR) もまたイチョウ葉エキスによる肝肥大に関与していることが示唆された。

次に、細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色を実施し、肝臓中の細胞増殖活性を評価した。1 週間投与では野生型マウスにおいて、最高用量群で細胞増殖の亢進が認められた。一方で、4 週間投与では対照群レベルに回復しており、その作用は一過的であった。CARKO マウスではいずれの投与期間においても細胞増殖の亢進は認められなかった。

以上の結果から、イチョウ葉エキスはマウスにおいて、主に CAR を介し、その下流の薬物代謝酵素 (Cyp2b, P450 レダクターゼ) を誘導し、滑面小胞体の増生を伴った肝細胞肥大を引き起こすとともに、投与初期の細胞増殖を亢進させていると考えられた。ALT 増加は野生型マウスのみを観察され、増加も軽度で病理組織学的な肝細胞壊死も確認できなかったことから、投与による肝肥大に関連して軽度の肝機能障害が生じていると考えられた。

次に 2 つ目の実験として、CAR の肝臓発がんへの関与の有無を明らかにするため、CARKO マウスおよび野生型マウスを用い、肝臓 2 段階発がんモデルを用いたイチョウ葉エキスの 27 週間の混餌反復投与試験を実施した。肝臓 2 段階発がんモデルは、イチョウ葉エキス投与開始の 1 週間前にジエチルニトロソアミン (DEN, 90mg/kg 体重) を 1 回腹腔内投与することで作製した。1 群あたり 22 匹から 26 匹の 5 週齢の雄性マウスを用い、投与用量は 1 つ目の実験と同じ設定で実施した。

27 週間の混餌投与後、対照群 (DEN のみを投与された群) を含むすべての群で肝臓の結節が肉眼的に観察された。イチョウ葉エキスが投与された野生型マウスでは肝臓の腫大とともに肝臓の結節の増加が肉眼的に認められた。一方、イチョウ葉エキスが投与された CARKO マウスでは、肝臓の結節はほとんど認められなかった。

続いて、肝臓の病理評価を実施し、ヘマトキシリン&エオジン染色に対する細胞質の染色性 (色調) を基に、変異巣および腺腫を 3 つのカテゴリー (好酸性、好塩基性、その他) に分類して評価した。その結果、野生型マウスではイチョウ葉エキス投与群において好酸性変異巣および腺腫の発生率が対照群と比較して明らかに増加した。好塩基性変異巣および腺腫の発生率の増加は認められなかった。CARKO マウスでは何れのタイプの変異巣および腺腫の発生率に増加は認められなかった。個体あたりの変異巣および腺腫の数 (multiplicity) で評価した場合においても、野生型マウスでは用量相関性を伴った好酸性変異巣および腺腫の明らかな増加が認められた。一方で CARKO マウスでは何れのタイプの変異巣および腺腫の増加は認められなかった。

このことから、イチョウ葉エキスはマウスにおいて CAR を介して、好酸性の増殖性病変を増加させ、最終的に発がんを誘発すると考えられた。

以上の結果から、イチョウ葉エキスはマウスにおいて、①主に CAR を介して、下流の薬物代謝酵素の発現を誘導し、肝肥大を誘発する、②CAR を介して、細胞増殖を亢進させ、その結果時間の経過とともに好酸性の増殖性病変を増加させ、発がんを誘発することが明らかとなった。これら事象は、抗てんかん薬であるフェノバルビタールを代表とする CAR を介した肝肥大ならびに肝発がん

の機序の特徴（CAR を介した薬物代謝酵素（CYP2B）の誘導、一過的な細胞増殖の亢進、好酸性の増殖性病変の増加、肝発がん）と完全に一致する。フェノバルビタールを長年投薬されたヒトにおいて、肝臓に発がん性が認められていないこと等から、CAR を介した肝発がん機序はげっ歯類特異的であり、ヒトに外挿されないと一般的に考えられている。このことから、今回使用したイチョウ葉エキスによってマウスに誘発された肝発がんは、ヒトにおいては起こりえないと考えられた。本報告は、今後のイチョウ葉エキスのヒトに対する安全性評価において有益なデータとなると期待される。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|-----|------|
| 受付番号 | 乙 第2165号 | 氏 名 | 前田 潤 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Essential role of constitutive androstane receptor in <i>Ginkgo biloba</i> extract induced liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis (イチョウ葉エキスによる肝肥大と肝発がんに果たす constitutive androstane receptor の役割) | | |
| 審査委員 Examiner | 主 査 伊藤 俊樹 Chief Examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner | | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

イチョウ葉エキス (以下、GBE) は脳機能および記憶の改善等を目的に古くから漢方薬の分野で使われており、欧米においても最も使用量の多い健康食品の一つとなっている。しかし、マウスにおいて肝臓の発がん性が報告され、ヒトへの安全性が懸念される事態となっている。そこで本研究では、GBE が肝臓の肥大を誘導、長期投与により肝臓の発がんを誘発するという毒性プロファイルに着目し、肝臓に多く発現し、細胞増殖活性・薬物代謝酵素誘導・肝肥大・げっ歯類特異的な肝臓発がん機序に密接に関わる核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) の関与について検討を行った。発がんに至るまでの①肝肥大までの初期段階、②肝発がんまでの後期段階のそれぞれの段階における CAR の関与を調べるため、2つの実験を実施した。

まず1つ目の実験として、CAR の肝臓肥大への関与の有無を明らかにするため、CAR 遺伝子を欠損したマウス (以下、CARKO マウス) を用い、GBE の最大 13 週間の混餌反復投与試験を実施した。同時に、野生型として C3H 系マウス (以下、野生型マウス) を用いた実験を同様の試験設計で実施した。1 群あたり 5 匹の 6 週齢の雄性マウスを用い、投与濃度は 0 (対照群)、100 (低用量)、1,000 (中用量)、10,000 ppm (最高用量) とした。

肝臓の病理組織学的解析においては、野生型マウスにおいて中間用量から用量依存的な小葉中心性の肝細胞肥大が認められた一方で、CARKO マウスにおいては最高用量のみの軽微な肥大しか認められなかった。電子顕微鏡を用いた病理評価では、野生型マウスにおいて、肝細胞の滑面小胞体の増生が認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆された。一方、CARKO マウスでは滑面小胞体の増生は認められなかった。

4 週間投与における肝臓中の薬物代謝酵素の mRNA 発現量を評価した結果、野生型マウスでは低用量から Cyp2b10 の顕著な誘導が認められた。一方で、CARKO マウスでは最高用量のみの軽微な誘導であった。また野生型マウスおよび CARKO マウスの両方において、軽度ながら Cyp3a11 の用量依存的な誘導が認められたことから、別の核内受容体 pregnane X receptor (PXR) もまた GBE による肝肥大に関与していることが示唆された。

次に、細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色を実施し、肝臓中の細胞増殖活性を評価した。1 週間投与では野生型マウスにおいて、最高用量群で細胞増殖の亢進が認められた。CARKO マウスでは細胞増殖の亢進は認められなかった。

以上の結果から、GBE はマウスにおいて、主に CAR を介し、その下流の薬物代謝酵素 (Cyp2b) を誘導し、滑面小胞体の増生を伴った肝細胞肥大を引き起こすと同時に、細胞増殖を亢進させていると考えられた。

次に 2 つ目の実験として、CAR の肝臓発がんへの関与の有無を明らかにするため、CARKO マウスおよび野生型マウスを用い、肝臓 2 段階発がんモデルを用いた GBE の 27 週間の混餌反復投与試験を実施した。肝臓 2 段階発がんモデルは、GBE 投与開始の 1 週間前にジェチルニトロソアミンを 1 回腹腔内投与することで作製した。1 群あたり 22 匹から 26 匹の 5 週齢の雄性マウスを用い、投与用量は 1 つ目の実験と同じ設定で実施した。

27 週間の混餌投与後、肝臓の病理評価を実施した結果、野生型マウスでは GBE 投与群において好酸性変異巣および腺腫の発生率が対照群と比較して明らかに増加した。CARKO マウスでは変異巣および腺腫の発生率に増加は認められなかった。このことから、GBE はマウスにおいて CAR を介して、好酸性の増殖性病変を増加させ、最終的に発がんを誘発すると考えられた。

以上の結果から、GBE はマウスにおいて、①主に CAR を介して、下流の薬物代謝酵素の発現を誘導し、肝肥大を誘発する、②CAR を介して、細胞増殖を亢進させ、その結果時間の経過とともに好酸性の増殖性病変を増加させ、発がんを誘発することが明らかとなった。これら事象は、抗てんかん薬であるフェノバルビタールを代表とする CAR を介した肝肥大ならびに肝発がんの機序の特徴と完全に一致する。フェノバルビタールを長年投薬されたヒトにおいて、肝臓に発がん性が認められていないこと等から、CAR を介した肝発がん機序はげっ歯類特異的であり、ヒトに外挿されないと一般的に考えられている。このことから、今回使用した GBE によってマウスに誘発された肝発がんは、ヒトにおいては起こりえないと考えられた。本報告は、今後の GBE のヒトに対する安全性評価において有益なデータとなると期待される。

本研究は、漢方医薬および健康食品として広く普及しているイチョウ葉エキス (GBE) が肝発がんに関与する可能性について、遺伝子改変マウスを用いて研究したものであるが、GBE の CAR 特異的な作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。