

DEHP の肝発がん作用と種差について

－ヒトへの外挿に関する論点整理－

DEHP による生体影響には多くの点で種差があることが知られている。器具・容器包装専門調査会（第 16 回）における DEHP の食品健康影響評価において、発がん性に関する動物試験データのヒトへの外挿に関して、種差をどのように考えるかが論点として挙げられた。

発がん性については、げっ歯類では、DEHP を投与することによってペルオキシソーム増殖及び肝腫大を伴う肝腫瘍が誘発されることが報告されている (David et al. 1999、2000a、b、Kluwe et al. 1982、Voss et al. 2005) が、ヒトにおいては DEHP による発がんは確認されていない。げっ歯類の肝発がんメカニズムについては、PPAR α 活性化が重要な役割を果たすことが従来より指摘されているが、最近になって新たな知見が報告されている。

そこで、ヒトへの外挿に関する論点の明確化を目的として、現時点で得られている知見を以下のように整理した。

1. 体内動態における種差

(1) 知見の整理

① 吸収率の種差（評価書案より）

<DEHP の経口投与試験>

- ・ 2,000 mg/kg : ラット 55% (単回、反復) > マーモセット 2% (反復)
- ・ 約 500 mg/kg 反復投与 : ラット 66.2%、カニクイザル 3.8~12.7%
- ・ 100 mg/kg 単回投与 : ラット、カニクイザル、マウスとも 28~37% の範囲内 (ATSDR 2002、Rhodes et al. 1986、Astill 1989)
- ・ 200 mg/kg まで : ヒトを含む霊長類でラットと同様で約 50% (EU-RAR 2008)
- ・ ヒトの消化管からの吸収率については、尿及び胆汁への排泄量から、投与量の約 20~25% と推定されている (ATSDR 2002)

② 代謝の種差

- ・ げっ歯類において、経口投与された DEHP は消化管のリパーゼによって加水分解された後、MEHP の形で吸収される (Eriksson and Darnerud 1985、Sjöberg et al. 1985、Nasu 2003) が、代謝に関する酵素の中では、特にリパーゼ活性に種差が大きく、活性はマウス>ラット>>マーモセットであり (Ito et al. 2005)、げっ歯類で非常にリパーゼ活性が高い。
- ・ ヒトの肝組織とマウスの肝臓を用いて、DEHP 代謝酵素の活性の測定を行った。その結果、リパーゼと UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UGT) は、マウスの方がヒトよりも活性が高かった。リパーゼの活性は、肝ミクロソームをプールした場合、

ヒトはマウスに比べて7分の1程度であった。ヒトのアルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性は同程度かむしろ低い傾向にあった。いずれの酵素活性も個人差が大きく、特にリパーゼでは10倍程度の差が見られた。明らかな人種差、性差は見られなかった(伊藤ら, 2012)。

- ラットとマーモセットに同量 DEHP を投与した際、血中 DEHP 量の差は認められないが、MEHP 量はラットの方がマーモセットより高い (Cmax で 3.2 倍、AUC で 7.3 倍) (Kessler et al. 2004)。
- マウスでは AADAC (アリルアセタミドデアセチラーゼ、主に肝臓に発現) が触媒能を有するとの報告もある (Kayano et al. 1997)。
- コレステロールエステルリパーゼ (CEL) の種差については報告がない。
- MEHP は CYP4、ADH、ALDH による酸化反応を受ける。主な代謝物は 5cx-MEPP (34.0~39.0%)、5OH-MEHP (21.7~31.7%)、5oxo-MEHP (16.4~18.1%)、2cx-MMHP (10.9~16.7%) であり、MEHP の尿中排泄量 (4.5~6.9%) よりも多い (Frederiksen et al. 2007)。
- グルクロン酸抱合能にも種差があることが示唆されている。グルクロン酸抱合体として排泄される代謝物の割合は、DEHP 単回経口投与ではハムスターで 15%、モルモット及びマウスでは 65% 程度で、ラットでは認められず、サル又はヒトへの単回静脈投与では約 80% と報告されている (Albro 1982)。一方、妊娠 SD ラットへの経口投与では尿中排泄された MEHP のほとんどがグルクロン酸抱合体との報告もある (Calafat et al. 2006)。
- ラット以外の種ではグルクロン酸抱合体として排泄されるが、グルクロン酸抱合能に差がある訳ではないことが、*in vitro* での肝臓を用いた実験でわかった (Albro et al. 1986)。
- ラットを用いた混餌投与試験 (0、50、200、1,000 mg/kg 体重/日) では、ミクロソーム画分の P450 活性は雄の中用量投与群 (200 mg/kg 体重/日) で 3 日目に、高用量投与群 (1,000 mg/kg 体重/日) で 3 日、7 日目に、雌では全投与群で 7 日目に増大した (Mitchell et al. 1985)

(2) 考慮すべき事項

① 投与量と吸収率の種差

どのくらいの投与量であれば、ヒトとげっ歯類の吸収率に大きな差がないと考えてよいか。発がん作用の NOAEL/LOAEL に相当する投与量ではどうか。(なお、判断材料となるデータがない場合は、どのようなデータが不足しているかについての確認が必要である。以下、すべての項目について同様。)

② 毒性影響を引き起こす活性体

- a. 肝臓や生殖系への毒性影響を引き起こす活性体は MEHP であると考えてよいか。

- 未変化体の DEHP や MEHP 以外の代謝物が発がん作用の原因となっている可能性はないか。MEHP の酸化的代謝物は毒性をもたないのか。
- b. 活性体が MEHP である場合、生体影響は DEHP 投与量ではなく、MEHP 内部暴露量を考慮に入れることが適切であると考えられるが、代謝能の種差に基づく MEHP 内部暴露量の種差をどのように考えるのか。
- 生体内で DEHP を MEHP に分解する酵素はリパーゼ以外に知られていないのか（例えば、カルボキシルエステラーゼなど）。ヒトではリパーゼ活性が低いとしても、他の酵素が作用することによって、げっ歯類と同程度の MEHP 内部暴露量となる可能性はないのか。
 - げっ歯類では DEHP の投与により酵素誘導が起こることから、MEHP の酸化的代謝が速やかに進行し、MEHP の内部暴露量がヒトより低く抑えられているのではないか。（しかし、げっ歯類では肝臓の酵素誘導という点で DEHP の投与に対する感受性が高いが、その一方で肝発がん作用に対する感受性も高い。）
 - げっ歯類とヒトにおける内部暴露量を定量的に比較できるデータはないのか。

2. 肝発がんにおける感受性の種差

(1) 知見の整理

① PPAR α を介した DEHP による肝発がん

- ・ ヒト肝臓における *PPAR α* mRNA の発現量はマウス肝臓の 10 分の 1 であった。(Palmer et al. 1998)
- ・ MEHP を暴露させたヒト肝細胞ではペルオキシソーム増殖と β 酸化が観察されなかった。(Elcombe and Mitchell, 1986)
- ・ Reporter plasmid に rat enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA gene のペルオキシソーム増殖剤応答配列 (PPRE) を組み込み、Luciferase assay での解析を行ったところ、ヒト PPAR α 発現系とともに、DEHP 若しくは MEHP を処置すると、DEHP では 2 mM 処置しても誘導能を示さなかったが、MEHP では 0.1~20 μ M (20 μ M で 4.6 倍) まで濃度依存的な誘導能を示した。(Maloney et al. 1999)
- ・ 野生型マウス及び *Ppara* 欠損マウスに対する DEHP 12,000 ppm の 6 か月間混餌投与によって、野生型ではペルオキシソーム酵素の誘導、肝肥大、細胞質の好酸性小体及びペルオキシソームの増加が起こったが、*Ppara* 欠損マウスでは肝臓への影響が観察されなかった。このことから、DEHP による腫瘍形成は PPAR α を介して起こると考えられた。(Ward et al. 1998)
- ・ (参考) DEHP によるペルオキシソーム増殖作用や発がん作用はげっ歯類のみで報告されている。サルを用いた *in vivo* 試験としては、カニクイザルの若い成熟雄における DEHP (0, 500 mg/kg 体重/日) の 14 日間強制経口投与試験 (Pugh et al. 2000) 及びマーモセットにおける DEHP (0, 100, 500, 2,500 mg/kg 体重/日) の 13 週間

強制経口投与試験 (Kurata et al. 1998) が行われたが、ペルオキシソーム増殖や肝腫瘍は起こらないと報告された。最近の研究では、雌雄のカニクイザルへの DEHP (1,000 mg/kg 体重/日) 28 日間経口投与により、雌で肝ペルオキシソーム増殖が観察されているが、げっ歯類と比較すると非常に弱い反応であったと報告されている。(Satake et al. 2010)

- なお、DEHP 以外の PPAR α アゴニストによる肝発がんメカニズムに関して、3. 参考：背景情報 (p.8~) に示した。

② PPAR α 欠損マウスを用いた DEHP 投与試験

- Ward ら (1998) の研究では、*Ppara* 欠損マウスに対する DEHP の混餌投与ではペルオキシソーム増殖と肝腫瘍が観察されなかった。ただし、この試験の投与期間は 6 か月であり、慢性試験は実施されていなかった。そこで、野生型マウスと *Ppara* 欠損マウスに対する DEHP (0.01%、0.05%) の 22 か月間の混餌投与が行われ、0.05%の DEHP による肝腫瘍 (肝細胞がん、肝細胞腺腫、胆管細胞がんを含む) の発生頻度は、*Ppara* 欠損マウス (25.8%) の方が野生型マウス (10.0%) よりも高く、マウスにおいては DEHP によって PPAR α を介した経路に依存しない腫瘍形成が起こることが報告された (Ito et al. 2007)。なお、この報告がきっかけの一つとなり、IARC は DEHP による発がん性の再評価を行っている。
- さらに、0.05%の DEHP を 22 か月混餌投与された野生型マウスと *Ppara* 欠損マウスの肝細胞腺腫では、マイクロアレイ解析における遺伝子発現プロファイルが全く異なっており、野生型マウスと *Ppara* 欠損マウスでは肝腫瘍発生機序が異なることが示唆された。なお、野生型のみで DEHP 投与による PPAR α と Cyp4a10 (対照群の 6.7 倍) の発現上昇がみられた。(Takashima et al. 2008)

③ PPAR α -humanized マウスを用いた DEHP 投与試験

- Ito ら (2012, in press) により、PPAR α -humanized (hPPAR α) マウスに対する DEHP の影響が調べられている。DEHP による PPAR α の転写活性化は最も鋭敏な Cyp4a14 の発現でみると、5mmol/kg 投与の場合、野生型マウスでは 62 倍の誘導、しかし hPPAR α マウス (ヒト PPAR α 過発現マウス) で 1.45 倍、誘導の比は $62/1.45=42.7$ 倍となる。一方、これらのマウスにおける構成的アンドロスタン受容体 (CAR) の誘導は Cyp2b10 の誘導でみると、野生型 5.3 倍、hPPAR α マウス 16.6 倍で、hPPAR α マウスの方が CAR 標的遺伝子発現が 3.3 倍大きいという結果が得られた。
- Hayashi ら (2011) は、hPPAR α マウスでも野生型と同様に DEHP によって胚吸収増加と生存新生児数減少が起こることを報告している (交配 4 週間前から妊娠 18 日または分娩後 2 日まで混餌投与)。hPPAR α マウスの肝臓では野生型の 100 倍量にあたる PPAR α の mRNA が発現しているが、DEHP による Cyp4a10 の発現誘導は野生型より弱い。野生型では DEHP の投与によって母動物で血漿中トリグリセリド (TG) の低下、肝臓のミクロソーム TG 輸送タンパク質 (MTP) の mRNA 発現の低下が起

こり、これらが胎児及び新生児への毒性作用に関与しているとみられているが、hPPAR α マウスでは TG 及び MTP に野生型と同様な変化は観察されていない。

- なお、hPPAR α マウスに関する背景情報と、PPAR α アゴニストである Wy-14,643、フェノフィブラートの投与によって得られた新たな知見については、3. 参考：背景情報 (p.8～) に示した。

④ PPAR α 非依存的な DEHP の新たな作用経路に関する知見

- DEHP によって活性化される新たなシグナル伝達経路として CAR が報告された。DEHP (20、200 mg/kg 体重/日) が 21 日間強制経口投与された野生型マウスと PPAR α 欠損マウスの肝臓における遺伝子発現の網羅的解析により、いくつかの典型的な CAR 標的遺伝子が PPAR α 非依存的な転写制御を受けていることが明らかになった。また、*In vitro* において、マウス肝細胞では DEHP による CAR 標的遺伝子 Cyp2b10 の発現誘導が CAR の阻害によって抑制されることが示された。さらに、ヒト初代培養肝細胞では DEHP によって用量依存的に CAR の標的遺伝子である Cyp2b6 の発現が誘導された。(Eveillard et al. 2009a)
- DEHP (30、180、1,100 mg/kg 体重/日) を 14 日間強制経口投与された雄の C57BL/6J マウスにおいて、転写産物及び代謝プロファイルの解析が行われた。肝臓で DEHP 投与によって転写調節を受ける遺伝子の大半は PPAR α 標的遺伝子であったが、シトクロム P450 遺伝子の Cyp4a14、Cyp2b10、Cyp3a11 が誘導されており、PPAR α 以外にも CAR、Pregnan X 受容体 (PXR) を介したシグナル伝達経路が活性化されていた。DEHP はヘム合成に関与する Alas1 と、ヘムガリガンドとなる Rev-erba 経路にも影響を与えた。(なお、supplemental data として精巢のライディッヒ細胞の遺伝子発現プロファイルにも DEHP による影響があったことにも言及している。)(Eveillard et al. 2009b)
- DEHP (200、1,150 mg/kg 体重/日) を強制経口投与された野生型マウス、PPAR α 欠損マウス、及び CAR 欠損マウスの肝臓を用いた遺伝子発現の網羅的解析において、DEHP によって転写調節を受けていた遺伝子は、大半 (~94%) が PPAR α 依存的であった。一方、Cyp2b10、Cyp3a11 及び metallothionein-1 の誘導は CAR 依存的であるが PPAR α 非依存的であり、Cyp8b1、Gstm4 及び Gstm7¹ の誘導は CAR 及び PPAR α の両方に非依存的であった。このことから、DEHP はげっ歯類の肝臓で多様な核内受容体を活性化することが示された。なお、ラットへの Wy-14,643 投与による CAR 及び PXR 関連の遺伝子発現はほぼみられなかったことから、Wy-14,643 は他のペルオキシソーム増殖剤よりも PPAR α 依存的であるとされた。(Ren et al. 2010)
- DEHP 500 mg/kg 体重/日を経口投与された 4 週齢の SD ラットの肝臓では、肝細胞増殖 (PCNA 陽性細胞増加)、ホスホリパーゼ D (PLD) 1/2 タンパク質の発現増加、PPAR α 、CAR、PXR の活性化及び Cyp2b1 タンパク質の発現増加がみられた。DEHP は PLD の発現を有意に増加させることが分かり、この DEHP による PLD の増加と CAR や

¹ 薬物代謝酵素であるグルタチオン S-トランスフェラーゼを発現する遺伝子

PXR といった核内受容体と相互に作用する PPAR α によって誘導される肝毒性との間の関連が示唆された。(Kim et al. 2010)

- ・ ヒトでは CAR のスプライシングバリエーションとしてリガンド結合領域に 4~5 のアミノ酸が挿入された CAR2 と CAR3 が生じる。Reference CAR はリガンドの結合がなくても恒常的な活性を有するのに対し、CAR2 (と CAR3) の活性化にはリガンドが必要である。ヒト肝臓において、CAR2 の mRNA は CAR の全転写物のうち約 6~10% を占める (Jinno et al. 2004)。マウス、ラット及びマーモセットでは CAR2 が生成されないが、ヒトの肝細胞では CAR2 が CAR 転写産物全体の約 30% を占める。DEHP は、COS-1 細胞で CAR2 を選択的に活性化 (nM レベル) し、ヒト初代培養肝細胞で Cyp2b6 と Cyp3a4 の転写を増加させた (DeKeyser et al. 2009)。さらに、DEHP だけでなく DINP も COS-1 細胞で CAR2 と PXR を選択的に活性化し、ヒト初代培養肝細胞で Cyp2b6 と Cyp3a4 を誘導することが示された。なお、MEHP は 10 μ M という高濃度でも CAR2 をわずかにしか活性化しなかった。(DeKeyser et al. 2011)
- ・ なお、現時点では、DEHP による CAR の活性化と発がん作用を直接結びつける知見はえられなかった。
- ・ CAR に関する背景情報は 3. 参考：背景情報 (p.8~) に示した。
- ・ ペルオキシソーム増殖剤は成長調節に関わっており、そのことが肝発がんにつながっている可能性があり、ペルオキシソーム増殖剤が c-fos, c-jun, junB, egr-1 などの IEG (Immediate Early Genes) の肝での発現を上昇させることが知られていた。ラットの primary hepatocyte を用いた実験からも、MEHP がこれらの IEG を誘導することが分かったが、この調節は PPAR α に依存しない経路により誘導されるものであることが分かった。(Pauley et al. 2002)

⑤ DEHP による発がん性の再評価

- ・ IARC は 2000 年の評価においてヒトに対する DEHP の発がん性を総合的に判定するにあたり、(a) DEHP はペルオキシソーム増殖等の非 DNA 反応性のメカニズムにより、ラット及びマウスに肝腫瘍を生じさせる；(b) ラット及びマウスを用いた DEHP の発がん性試験の条件下でペルオキシソーム増殖及び肝細胞増殖は証明されている；及び (c) ヒト培養肝細胞の DEHP 暴露でも、DEHP に暴露されたヒト以外の霊長類の肝臓においても、ペルオキシソーム増殖は報告されていないことに留意した。動物にみられる DEHP による PPAR α の誘導及びペルオキシソーム増殖に起因する肝臓がんはヒトに関連せず、DEHP がラット及びマウスにおいて肝細胞腫瘍の発生頻度を上昇させるメカニズムは、ヒトには当てはまらないと結論付けた。IARC は DEHP のヒトへの発がん性をグループ 3 に分類した (IARC 2000)。
- ・ 2009 年の Guyton らのレビューでは、PPAR α を活性化する化合物には多面的作用があり、遺伝毒性、エピジェネティックな変化、酸化ストレスを含むペルオキシソーム増殖への特徴的な影響に加えて、PPAR α 以外の他の受容体とペルオキシソームなどの細胞内小器官に影響を与える多様な生体応答が存在することが報告されていることか

ら、PPAR α アゴニストはヒトに発がんリスクをもたらさないという結論に再検討が求められるとしている (Guyton et al. 2009)。

- ・ IARC は DEHP の発がん性の再評価を行い、グループ 2B に分類した (Grosse et al. 2011) (モノグラフ未公開)。肝臓がんのほか、精巣がん、膵臓がんに関して、DEHP には複数の発がんメカニズムがあると示唆する知見がいくつかあり、その中には、これらのメカニズムがヒトと関連する可能性を示唆するものもある (IARC/NORA 2009)。

(2) 考慮すべき事項

① 肝発がんの Mode of action

げっ歯類に対する DEHP の肝発がん作用の主要な Mode of action は PPAR α の活性化であり、これについてはヒトではげっ歯類より感受性が低いと考えられる。しかし、PPAR α 以外にも多様な経路を介した Mode of action の存在が示唆されることから、げっ歯類に生じた肝腫瘍のヒトとの関連性を否定することはできないと考えてよいか。

② ヒトへの外挿

1. (2) ①、②及び2. (2) ①の考慮すべき事項を踏まえ、げっ歯類における肝発がん作用の用量反応データから得られる NOAEL/LOAEL をヒトに外挿することは可能か。外挿可能な場合、TDI を設定する際の追加の不確実係数をどのように考えるのか。

3. 参考：背景情報

●PPAR α と DEHP 以外の PPAR α アゴニストによる肝発がんメカニズムについて

- PPAR (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体) は α 、 β/δ 、 γ の 3 つのサブタイプをもつ核内受容体型転写因子である。PPAR α は多くの組織で発現し、エネルギー源として脂肪酸の酸化が必要な組織 (肝臓、心臓、腎臓) では特に発現量が多く、脂質ホメオスタシスの維持において中心的な役割を果たしている。PPAR α はリガンドによって活性化されると、RXR (レチノイド X 受容体) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子上流に位置する PPARE に結合し、標的遺伝子の転写を活性化させる。PPAR α はグルコース、脂質、アミノ酸の代謝に関わる酵素群をコードする遺伝子等、非常に多くの遺伝子発現を誘導する。飢餓状態では、脂肪酸が内在性リガンドとなり、PPAR α が誘導される。高脂血症治療薬であるフィブラートをはじめ、非常に多くの PPAR α アゴニストが知られている。(Peters et al. 2012)
- PPAR α 自体に種差があり、一般的にげっ歯類では PPAR α 活性化は *suppression of apoptosis, induction of proliferation* 等の腫瘍形成につながるが、ヒトを含む霊長類においては、血中コレステロールの低下に働く。例えば、アカゲザルにクロフィブラートを 200 mg/kg 体重/日で 12 か月投与してもペルオキシソーム増殖は認められないのに対し、ラットに 167 mg/kg 体重/日で投与すると腫瘍形成が認められる (Roberts 1999)
- PPAR α は肝腫瘍形成に関与しているが、その一方で、PPAR α は腫瘍の発生又は成長を阻害する作用があり、がんの予防や治療の標的分子となる可能性があると考えられている。(Peters et al. 2012)
- PPAR α アゴニストの長期投与はげっ歯類に肝臓がんを引き起こし、これは PPAR α 依存的な影響であるが、PPAR α 欠損マウスは PPAR α アゴニストによる肝発がん作用に耐性を示した。げっ歯類においては、PPAR α アゴニストによる肝発がん作用という Mode of action が特定されているが (Peters et al. 2005)、ヒトではこのメカニズムの存在が明らかになっていない。(Peters et al. 2012)
- ペルオキシソーム増殖剤をラット及びマウスに慢性的に投与すると肝腫瘍を誘発するが、マウスでの詳細な分子メカニズムは完全にはわかっていない。ペルオキシソーム増殖剤によって、肝細胞のペルオキシソーム数の著しい増加が起こると同時に、脂質輸送や脂肪酸 β 酸化に関与するタンパクをコードする遺伝子の発現が増加し、脂肪酸の異化が亢進する。また、細胞分裂の増加と細胞内酸化ストレスの亢進が誘発される。酸化ストレスはほとんどがアシル - CoA 酸化酵素 (ACOX) の増加によるものであり、脂肪酸の酸化の副産物である ACOX が H_2O_2 を生成し、酸化ストレスを亢進させる。さらに、ペルオキシソーム増殖剤は炎症促進性サイトカインを増加させ、アポトーシスを阻害する。これまで、ペルオキシソーム増殖剤の肝腫瘍形成に関与する直接的な PPAR α 標的遺伝子はわからなかったが、最近、ペルオキシソーム増殖剤によって *let-7c* miRNA が抑制されて、がん原遺伝子 *MYC* mRNA の安定性が増加することが報告さ

れた（次項の a. hPPAR α ^{TetOff} マウスを参照）。（Gonzalez and Shah 2008）

●hPPAR α マウスの背景情報と DEHP 以外の PPAR α アゴニストの投与による新たな知見について

遺伝的背景は PPAR α -null で、ヒト PPAR α 遺伝子を発現している hPPAR α マウスとして、Gonzalez らの研究グループによって作製された 2 系統（hPPAR α ^{TetOff} マウスと hPPAR α ^{PAC} マウス）が報告されている（Boverhof et al. 2011）。

a. hPPAR α ^{TetOff} マウス

- Cheung ら（2004）によって、Tet-Off システムと肝臓特異的プロモーターを用いた hPPAR α マウスである hPPAR α ^{TetOff} マウスが作成された。hPPAR α ^{TetOff} マウスでは肝臓のみで hPPAR α が発現し、hPPAR α タンパク質の発現レベルは野生型マウスの mPPAR α と同程度であった。（Gonzalez and Shah 2008）
- この hPPAR α マウスを用いた最近の研究データはヒトとげっ歯類の違いを説明している。Morimura ら（2006）と Shah ら（2007）の研究において、PPAR α アゴニスト Wy-14,643 の投与は野生型マウスと hPPAR α マウスの両方において脂質異化を修飾する標的遺伝子（ACOX 等）の発現を増加させる。しかし、野生型マウスのみで肝細胞増殖と肝腫瘍を誘発し、c-myc の発現を増加させ、let-7c マイクロ RNA（miRNA）群の発現を抑制した。さらに、Shah ら（2007）の研究によれば、let-7c miRNA はがん原遺伝子 MYC の mRNA を標的としており、let-7c 非存在下では MYC mRNA の安定性が増加し、これが肝細胞増殖を誘発する細胞増殖シグナル伝達の亢進に寄与していると予想されている。（Gonzalez and Shah 2008、Peters et al. 2012）

b. hPPAR α ^{PAC} マウス

- Yang ら（2008）によって、完全なヒト PPAR α のゲノム配列をもつ PAC（P1 フェージ人工染色体）を用いて、2 番目の PPAR α -humanized 系統となる hPPAR α ^{PAC} マウスが作製された。hPPAR α ^{PAC} マウスの hPPAR α は野生型マウスの mPPAR α と同様に脂肪酸異化のさかんな組織で発現し、絶食による発現誘導がみられた。フィブラート系薬剤であるフェノフィブラートの投与によって、hPPAR α ^{PAC} マウスはペルオキシソーム増殖、血清トリグリセリド低下、脂肪酸代謝酵素をコードする PPAR α 標的遺伝子の誘導について野生型マウスと同様な反応を示した。（hPPAR α ^{TetOff} マウスとは異なり、標的遺伝子の誘導が肝臓、腎臓及び心臓でみられた。）hPPAR α ^{PAC} マウスでは、肝腫大及び肝細胞増殖が起こらず、脂質代謝への影響と肝細胞増殖作用はメカニズムが異なることが示唆された。

●CAR について

- CAR と PXR は生体異物を認識し異物代謝に関与する遺伝子の発現を調節する核内受容体として知られている。CAR と PXR はそれぞれ RXR とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子上流に位置する応答配列に結合して転写を誘導する。CAR のリガンド特異性は低く、種差が存在する。マウスにおいて、CAR は通常は細胞質に存在し、活性化

されると核内に移行することが分かっている (Makinen et al. 2002) が、ヒトに関してはマウスと同様の仕組みが示唆されるものの現時点では明確ではない。CAR はリガンド非存在下でも恒常的な活性化が起こっているが、CAR2 活性化はリガンド依存的である。CAR2 は CAR 応答配列の活性能が限定的である (Auerbach et al. 2003, Arnold et al. 2004, Jinno et al. 2004) が、これは RXR α に対する親和性が CAR2 は低下していることにより DNA 結合能が低いこととも一致する (Auerbach et al. 2003, Arnold et al. 2004)。

- CAR のターゲット遺伝子として、シトクロム P450s、UDP-グルクロン酸転移酵素、ALDH などが知られている (Maglich et al. 2002, Ueda et al. 2002)。CAR、PXR それぞれの活性化因子であるフェノバルビタールや PCN は、マウスやラットの肝臓で薬物代謝酵素 CYP2B、CYP3A を誘導することが知られている (Nelson et al. 2006)。これらの酵素がテストステロンの代謝に関わっている (Imaoka et al. 1996)。また、CAR は胆汁やステロイドホルモンのような内因性物質の代謝や肝臓でのエネルギー代謝にも関わっている (Guo et al. 2003, Xie et al. 2003, Kodama et al. 2004, Konno et al., 2008, Masson et al. 2008)。
- CAR や PXR の活性化因子への暴露により肝重量の増加や肝細胞過形成がみられるが、CAR や PXR の欠損マウスではそういった現象は起こらない (Chen et al. 2003, Huang et al. 2005, Staudinger et al. 2001, Yamamoto et al. 2004) また、フェノバルビタールやフェノバルビタール様の誘導物質である TCPOBOP² といった CAR の活性化因子の慢性的な暴露により、野生型のマウスでは肝がんが増加するのに対し、CAR 欠損マウスではそのような増加はみられない (Huang et al. 2005, Yamamoto et al. 2004)
- CAR2 はデスレセプターである DR-3、DR-4、DR-5 などの核内受容体の応答配列に加えて、PBREM³、Cyp2b6-XREM⁴、Cyp3a4-XREM といった配列に対しても構成活性を有する。CAR2 は CITCO⁵ に結合する能力は維持しているものの、CAR の inverse アゴニストであるアンドロスタノールやクロトリマゾールによる抑制パターンは、CAR2 と CAR1 では異なり、CAR2 のほうが用量依存的な抑制である。RXR α とのヘテロ二量体化によって、CAR2 の恒常的活性能が飛躍的に高まることが分かっており、SRC-1 のようなコアクチベーターとの相互作用にも、CAR2 は CAR1 と比べて RXR α に大きく依存していることが哺乳類細胞をもちいたツーハイブリッド法の試験より分かった (Auerbach et al. 2007)。

² 1,4-Bis[(3,5-dichloropyridin-2-yl)oxy]benzene

³ Phenobarbital Response Enhancer Module

⁴ Xenobiotic Response Enhancer Module

⁵ 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime

<参考文献リスト>

1. Albro PW, Absorption, Metabolism, and Excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by Rats and mice. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 65. pp 293-298.1986.
2. Arnold KA, Eichelbaum M, and Burk O (2004) Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. *Nucl Recept* 2:1.
3. Astill BD. Metabolism of DEHP: Effects of prefeeding and dose variation, and comparative studies in rodents and the Cynomolgus monkey (CMS studies). *Drug Metabolism Reviews*. 1989; 21: 35-53.
4. Auerbach SS, Dekeyser JG, Stoner MA, Omiecinski CJ. CAR2 displays unique ligand binding and RXRalpha heterodimerization characteristics. *Drug Metab Dispos*. 2007 Mar;35(3):428-39.
5. Auerbach SS, Ramsden R, Stoner MA, Verlinde C, Hassett C, and Omiecinski CJ (2003) Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic Acids Res* 31:3194–3207.
6. Boverhof DR, Chamberlain MP, Elcombe CR, Gonzalez FJ, Heflich RH, Hernández LG, Jacobs AC, Jacobson-Kram D, Luijten M, Maggi A, Manjanatha MG, Benthem J, Gollapudi BB. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. *Toxicol Sci*. 2011 Jun;121(2):207-33. Review.
7. Chen, C., Staudinger, J. L., and Klaassen, C. D. (2003). Nuclear receptor, pregnane X receptor, is required for induction of UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *Drug Metab. Dispos*. 31, 908–915.
8. Cheung, C., Akiyama, T.E., Ward, J.M., Nicol, C.J., Feigenbaum, L., Vinson, C., Gonzalez, F.J., 2004. Diminished hepatocellular proliferation in mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res*. 64, 3849–3854.
9. David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D. Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di (2-ethylhexyl) phthalate and the effects of recovery. *Toxicological Sciences*. 1999; 50: 195-205.
10. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D. Chronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in mice. *Toxicological Sciences*. 2000b; 58: 377-385.
11. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D. Chronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicological Sciences*. 2000a; 55: 433-443.
12. DeKeyser JG, Laurenzana EM, Peterson EC, Chen T, Omiecinski CJ. Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicol Sci*. 2011 Apr;120(2):381-91.

13. DeKeyser JG, Stagliano MC, Auerbach SS, Prabhu KS, Jones AD, Omiecinski CJ. Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol Pharmacol.* 2009 May;75(5):1005-13.
14. Elcombe CR, Mitchell AM. Peroxisome proliferation due to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Species differences and possible mechanisms. *Environmental Health Perspectives.* 1986; 70: 211-219.
15. European Chemicals Bureau. European Union Risk Assessment Report(EU RAR, CAS No. 117-81-7, bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), volume 80. 2008
16. Eveillard A, Mselli-Lakhal L, Mogha A, Lasserre F, Polizzi A, Pascussi JM, Guillou H, Martin PG, Pineau T. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol.* 2009a Jun 1;77(11):1735-46.
17. Eveillard A, Lasserre F, de Tayrac M, Polizzi A, Claus S, Canlet C, Mselli-Lakhal L, Gotardi G, Paris A, Guillou H, Martin PG, Pineau T. Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009b May 1;236(3):282-92.
18. Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 51: 899-911, 2007.
19. Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology.* 2008 Apr 3;246(1):2-8. Review.
20. Grosse Y, Baan R, Secretan-Lauby B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L, Straif K , 2011 Carcinogenicity of chemicals in industrial and consumer products, food contaminants and flavourings, and water chlorination byproducts. *Lancet Oncol.* 2011 Apr;12(4):328-9.
21. Guo, G. L., Lambert, G., Negishi, M., Ward, J. M., Brewer, H. B., Jr., Kliewer, S. A., Gonzalez, F. J., and Sinal, C. J. (2003). Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* 278, 45062–45071.
22. Guyton KZ, Chiu WA, Bateson TF, Jinot J, Scott CS, Brown RC, et al. 2009. A reexamination of the PPAR- α activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 117:1664–1672.
23. Hayashi Y, Ito Y, Yamagishi N, Yanagiba Y, Tamada H, Wang D, Ramdhan DH, Naito H, Harada Y, Kamijima M, Gonzales FJ, Nakajima T. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α may have an important role in the toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on offspring of mice. *Toxicology.* 2011 Oct 28;289(1):1-10.

24. Huang, W., Zhang, J., Washington, M., Liu, J., Parant, J. M., Lozano, G., and Moore, D. D. (2005). Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol. Endocrinol.* 19, 1646–1653.
25. IARC carcinogens Views and Expert opinions of an IARC/NORA expert group meeting Lyon, France: 30 June - 2 July 2009 ; Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of highpriority.IARC Technical Publication No. 42 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/index.php>
26. Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sakaki, T., Yabusaki, Y., and Funae, Y. (1996). Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 51, 1041–1050.
27. Ito Y, Yokota H, Wang R, et al., Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* 79: 147-154, 2005
28. Ito Y, Yamanoshita O, Asaeda N, Tagawa Y, Lee CH, Aoyama T et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent pathway. *Journal of Occupational Health.* 2007; 49(3): 172-182
29. Ito Y, Nakamura T, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Yamagishi N, Naito H, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. PPAR Research 2012 (in press)
30. Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Ishida S, Saeki M, Soyama A, Itoda M, Nishimura T, Saito Y, Ozawa S, Ando M, and Sawada J (2004) Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver. *Mol Pharmacol* 65:496–502.
31. Kayano et al., Involvement of a Novel Mouse Hepatic Microsomal Esterase, ES46.5K, in the Hydrolysis of Phthalate Esters. *Biol Pharm Bull* 20: 749-751, 1997.
32. Kessler et al., Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicology and Applied Pharmacology* 195 (2004) 142-153.
33. Kim NY, Kim TH, Lee E, Patra N, Lee J, Shin MO, Kwack SJ, Park KL, Han SY, Kang TS, Kim SH, Lee BM, Kim HS. Functional role of phospholipase D (PLD) in di(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2010;73(21-22):1560-9.
34. Kluwe WM, Haseman JK, Douglas JF, Huff JE.. The carcinogenicity of dietary di (2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 1982; 10: 797-815.
35. Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., and Yamamoto, Y. (2004). Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode

- drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7931–7940.
36. Konno, Y., Negishi, M., and Kodama, S. (2008). The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23, 8–13.
 37. Kurata Y, Kidachi F, Yokoyama M, Toyota N, Tsuchitani M, Katoh M. Subchronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in common marmosets: Lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicological Sciences.* 1998; 42: 49-56.
 38. Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T., and Kliewer, S. A. (2002). Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.* 62, 638–646.
 39. Maloney EK and Waxman DJ. trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 161, 209-218 (1999)
 40. Masson, D., Qatanani, M., Sberna, A. L., Xiao, R., Pais de Barros, J. P., Grober, J., Deckert, V., Athias, A., Gambert, P., Lagrost, L., et al. (2008). Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wildtype and human apoA-I transgenic mice. *J. Lipid Res.* 49, 1682–1691.
 41. Morimura, K., Cheung, C., Ward, J.M., Reddy, J.K., Gonzalez, F.J., 2006. Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor alpha to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* 27, 1074–1080.
 42. Palmer CNA, Griffin KJ, Raucy JL, et al. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Molecular and Pharmacology.* 1998; 53: 14-22
 43. Pauley CJ, Ledwith BJ, Kaplanski C. Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor α -independent mechanisms. *Cellular Signalling* 14 (2002) 351-358
 44. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2012 Feb 9;12(3):181-95.
 45. Peters, J. M., Cheung, C. & Gonzalez, F. J. Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: where do we stand? *J. Mol. Med.* 83, 774–785 (2005).
 46. Pugh G Jr, Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Clare LJ, Brown R et al.. Effects of Di-isononyl phthalate, Di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences.* 2000; 56: 181-188.
 47. Ren H, Aleksunes LM, Wood C, Vallanat B, George MH, Klaassen CD, Corton JC. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor α —independent effects of PPAR α activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also

- activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci.* 2010 Jan;113(1):45-59.
48. Rhodes C, Orton TC, Pratt IS, Batten PL, Bratt H, Jackson SJ, Elcombe CR. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in rats and marmosets: Extrapolation of effects in rodents to man. *Environmental Health Perspectives.* 1986; 65: 299-307.
 49. Roberts RA. Peroxisome proliferators: mechanisms of adverse effects in rodents and molecular basis for species differences. *Archives of Toxicology.* Volume 73, Numbers 8-9, 413-418
 50. Satake S, Nakamura C, Minamide Y, Kudo S, Maeda H, Chihaya Y, Kamimura Y, Miyajima H, Sasaki J, Goryo M, Okada K. Effect of a Large Dose of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on Hepatic Peroxisome in Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*). *J Toxicol Pathol.* 2010 Jun;23(2):75-83.
 51. Shah, Y.M., Morimura, K., Yang, Q., Tanabe, T., Takagi, M., Gonzalez, F.J., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation. *Mol. Cell Biol.* 27, 4238–4247.
 52. Staudinger, J., Liu, Y., Madan, A., Habeebu, S., and Klaassen, C. D. (2001). Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1467–1472.
 53. Takashima K, Ito Y, Gonzalez FJ, Nakajima T. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar alpha-null mice. *J Occup Health.* 2008;50(2):169-80.
 54. Ueda, A., Hamadeh, H. K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M., and Negishi, M. (2002). Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 61, 1–6.
 55. Voss C, Zerban H, Bannasch P, Berger MR. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology.* 2005; 206: 359-371.
 56. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. Receptor and Nonreceptor-Mediated Organ-Specific Toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor a-Null Mice. *Toxicol Pathol.* 1998 Mar-Apr; 26(2): 240-6.
 57. Xie, W., Yeuh, M. F., Radominska-Pandya, A., Saini, S. P., Negishi, Y., Bottroff, B. S., Cabrera, G. Y., Tukey, R. H., and Evans, R. M. (2003). Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4150–4155.
 58. Yamamoto, Y., Moore, R., Goldsworthy, T. L., Negishi, M., and Maronpot, R. R.

- (2004). The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res.* 64, 7197–7200.
59. Yang Q, Nagano T, Shah Y, Cheung C, Ito S, Gonzalez FJ. The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci.* 2008 Jan;101(1):132-9.
60. 伊藤 由起、上島 通浩、長谷川 知恵、田川 雅大、三宅 美緒、林 由美、那須 民江. プラスチック可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差および個人差の検討. *日衛誌 (Jpn. J. Hyg.)* 第 67 卷 第 2 号 2012 年 3 月