

平成 30 年 4 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08067

研究課題名(和文) ヒトCYP3Aの生理学的機能の解明と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Studies for physiological functions of human CYP3A enzymes and their clinical applications

研究代表者

小林 カオル (Kobayashi, Kaoru)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30255864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3A欠損マウスでは、遊離型血中テストステロン濃度の上昇により前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子の発現が亢進し、コレステロールレベルが上昇することが明らかとなった。さらに、CYP3A欠損マウスでは、25位水酸化コレステロールの生成低下にともなうSREBP-2活性化によりコレステロール合成が亢進することが明らかとなった。以上より、CYP3Aの機能変化はテストステロンおよびコレステロール値を変化させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Results of this study showed that remarkable increase in free testosterone in plasma enhanced androgen response in the prostate of Cyp3a-knockout (KO) mice. Increased testosterone levels activated the androgen receptor (AR), resulting in stimulation of cholesterol synthesis in the prostates of Cyp3a-KO mice. In addition, KO of Cyp3a genes enhanced the synthesis of cholesterol in the liver via activation of SREBP-2 by reduction of 25-hydroxycholesterol. These findings suggest that CYP3A is a regulator for androgen response in the prostate and for synthesis of cholesterol in the liver.

研究分野：薬物代謝

キーワード：CYP3A テストステロン ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Cytochrome P450 3A (CYP3A) は、50%以上の医薬品の代謝に関与する、最も重要な薬物代謝酵素である。加えて、CYP3A は薬物などの異物代謝以外にもホルモン、胆汁酸、コレステロールなどの内因性物質の代謝にも関わっており、生体における生理機能の制御と維持に何らかの役割を果たしている可能性が指摘されている。しかし、CYP3A には大きな種差が存在するため、一般的な実験動物で得られた結果からヒト *in vivo* における CYP3A の機能を予測することはできない。さらに、CYP3A の発現量および機能は疾患や医薬品の服用により大きく変化することが知られているが、ヒト CYP3A の機能変化が生理機能にどのような影響を与えるかも明らかでない。

(2) CYP3A はコレステロールの 25 位水酸化と 4 $\beta$  位水酸化を触媒することが知られている。また、齧歯類に低コレステロール食を与えた場合には CYP3A の発現量が低下することも報告されている (Inoue et al., 2011)。これらのことから、CYP3A はコレステロールの制御に何らかの役割を担っていると考えられる。最近、申請者らは CYP3A-KO マウスを用いた検討により、CYP3A-KO マウスでは 25 位水酸化コレステロール (25-HC) の生成が低下し、SREBP-2 が活性化した結果、コレステロール生合成系酵素遺伝子の発現が増加することを明らかにした (Hashimoto et al., 2013)。つまり、CYP3A によって生成する 25-HC が SREBP-2 を介してコレステロールの生合成を抑制することにより、生体内におけるコレステロールの恒常性維持に関わっていると考えられた。しかし、CYP3A によるコレステロール生合成の制御がマウス CYP3A だけでなくヒト CYP3A によっても認められるかは明らかではない。

(3) 主要なアンドロゲンであるテストステロンは、CYP3A によって 6 $\beta$  位水酸化テストステロンに代謝され、不活化することが知られている。このため、CYP3A がテストステロンの不活化を介して前立腺におけるアンドロゲン作用を抑制的に制御している可能性が考えられる。最近、CYP3A 誘導剤を投与したマウスでは対照群に比較して血中テストステロン値が低く、前立腺重量が少ないことが報告された (Zhang et al., 2010)。さらに、前立腺癌の悪性度を示す Gleason スコアが高い患者では、前立腺における CYP3A の発現が低いことも明らかにされている (Fujimura et al., 2009)。ヒト CYP3A は、CYP3A4, 5, 7, 43 の 4 分子種で構成されており、肝臓と小腸には CYP3A4 が、前立腺には CYP3A5 が、精巣には CYP3A43 が主に発現している。しかし、どの組織に発現している CYP3A 分子種が前立腺におけるアンドロゲン作用の制御に主要な役割を果たしているかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、本研究では、コレステロールおよびアンドロゲンの CYP3A による代謝に着目し、1) ヒト CYP3A がコレステロールの恒常性維持および前立腺アンドロゲン作用の制御に果たす役割を解明し、2) ヒト CYP3A の機能変化による生理機能への影響を明らかにすることを目的とする。本研究の特色と獨創性は、申請者らが独自に開発した *Cyp3a* ノックアウトマウスと CYP3A ヒト型マウスを用いて、上記の研究目的を追求することにある。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物：野生型マウス、マウス内在性 *Cyp3a* 遺伝子群をノックアウトしたバックグラウンドを持つマウス (CYP3A-KO)、CYP3A-KO マウスと人工染色体 (MAC) ベクターシステムを用いてヒト CYP3A 遺伝子クラスターを導入したマウスを交配して得られた CYP3A ヒト型マウス (雄性、10 週令) を用いた。本研究は実験動物の取り扱いガイドラインに従って行われ、千葉大学および鳥取大学の動物実験委員会において承認された。

(2) トリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性の測定：常法に従って肝ミクロソーム画分を調製した。酵素反応は、トリアゾラム (最終濃度 0.2 mM) を基質とし、ミクロソームと 30 分間インキュベーションした。除蛋白後のサンプルを HPLC に注入し、代謝物量を測定することにより活性を求めた。

(3) mRNA 量の測定：肝および前立腺より抽出した total RNA を逆転写し、real-time PCR 法により増幅産物の検出を行った。各遺伝子の mRNA 量は GAPDH の mRNA 量により補正した。

(4) 血中および組織中濃度測定：血中コレステロールおよび 25 位水酸化コレステロール濃度は LC-MS/MS 法により測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により測定した。

(5) クロマチン免疫沈降アッセイ：前立腺組織とアンドロゲン受容体抗体を用い、アンドロゲン応答遺伝子 Sbp のプロモーター領域にあるアンドロゲン受容体結合配列への結合量を real-time PCR 法により測定した。

(6) CYP3A 誘導剤の投与：CYP3A 誘導剤であるプレグネノロン 16 $\alpha$  カルボニトリル (PCN) をコーン油に溶解し、100 mg/kg/day の用量でマウスに 4 日間腹腔内投与した。対照群にはコーン油を投与した。

## 4. 研究成果

### (1) CYP3A ヒト型マウス肝におけるコレステロール合成酵素の発現制御

申請者らは、CYP3A-KO マウスでは野生型マウスに比較して肝におけるコレステロール生合成が亢進していることから、マウス CYP3A が肝におけるコレステロール生合成を制御することを報告している (Hashimoto et al., 2013)。本研究では、マウス CYP3A だけでなくヒト CYP3A がコレステロール生合成を制御

するかを明らかとするため、CYP3A ヒト型マウスを用いて検討した。CYP3A ヒト型マウスと CYP3A-KO マウスの肝におけるコレステロール合成酵素発現量に有意差は認められなかったが、CYP3A ヒト型マウスへ CYP3A 誘導剤を投与したところ、肝におけるコレステロール合成酵素発現量は有意に減少した (図 1)。この時、肝におけるヒト CYP3A の発現と酵素活性は著しく増加し、コレステロール合成酵素の発現を正に制御する SREBP-2 の活性化を抑制する 25 位水酸化コレステロールの肝および血中濃度も上昇する傾向が認められた (図 2)。一方、CYP3A-KO マウスでは、CYP3A 誘導剤投与によるコレステロール合成酵素発現量の低下は認められなかった (図 1)。これらの結果より、CYP3A 誘導剤を投与した CYP3A ヒト型マウスではヒト CYP3A の発現増加にともない、25 位水酸化コレステロールの生成亢進とコレステロール合成酵素の発現低下を引き起こすことが示唆された。つまり、マウス CYP3A だけでなくヒト CYP3A も肝におけるコレステロール合成を制御すると考えられた。

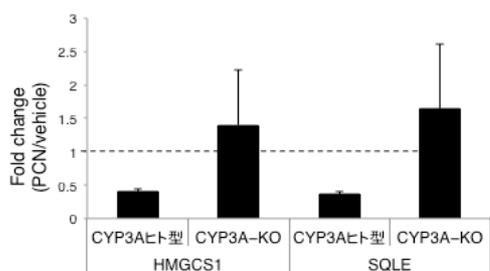


図 1 CYP3A ヒト型マウス肝におけるコレステロール合成酵素発現量に及ぼす CYP3A 誘導剤の影響

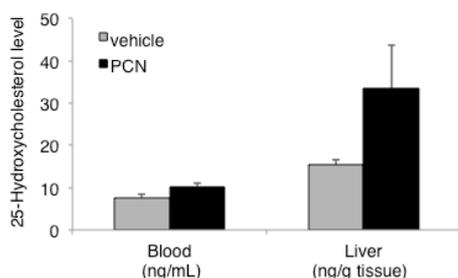


図 2 CYP3A ヒト型マウスの肝および血中に 25 位水酸化コレステロール濃度に及ぼす CYP3A 誘導剤の影響

### (2) CYP3A 欠損によるテストステロン不活化作用への影響

CYP3A はテストステロンを 6β 位水酸化体に

代謝することで不活化する。CYP3A-KO マウスの肝ミクロソームにおけるテストステロン 6β 位水酸化活性を測定したところ、野生型マウスの 1/4 と低い値を示した。一方、血漿中遊離型テストステロン濃度は CYP3A-KO マウスが野生型マウスより 9 倍高い値を示し、肝および前立腺内総テストステロン濃度も 2 倍以上高い値を示した (図 3)。これらの結果より、CYP3A は肝においてテストステロンを不活化することにより全身循環血中および前立腺におけるテストステロン濃度の制御に関与していることが示唆された。

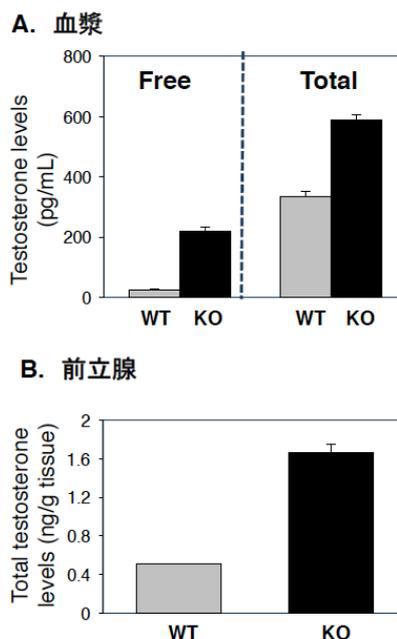


図 3 CYP3A 欠損による血中 (A) および前立腺内 (B) テストステロン濃度への影響

### (3) CYP3A 欠損による前立腺アンドロゲン応答性への影響

CYP3A-KO マウスにおいて前立腺テストステロン濃度が高値を示したことから、前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子の発現量を解析した。その結果、アンドロゲン応答遺伝子発現量は CYP3A-KO マウスが野生型マウスより高い値を示した (図 4)。また、クロマチン免疫沈降アッセイにより、CYP3A-KO マウスの前立腺では野生型マウスに比較して、アンドロゲン応答遺伝子へのアンドロゲン受容体結合が亢進していることが明らかとなった。

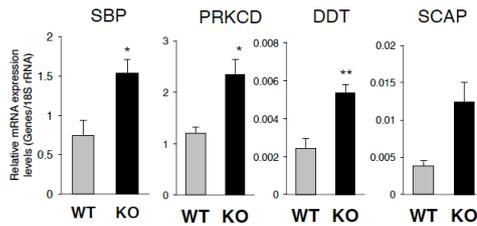


図4 CYP3A 欠損による前立腺内アンドロゲン応答遺伝子発現への影響

#### (4) CYP3A 欠損による前立腺内ジヒドロテストステロン生成酵素発現への影響

テストステロンはSRD5A2によりアンドロゲン作用の強いジヒドロテストステロンへ活性化する。そこで、CYP3A-KO マウス前立腺におけるSRD5A2の発現量を解析した。CYP3A-KO マウスでは野生型マウスに比較してSRD5A2発現量が高いことから、CYP3A-KO マウスではテストステロンの不活化が低下することに加え、活性化も亢進していることが示唆された。

#### (5) まとめ

本研究では、CYP3A ヒト型マウスを用いることにより一般的な実験動物では解明しえないヒトCYP3Aの生理機能について検討を行い、マウスCYP3Aに加え、ヒトCYP3Aも肝におけるコレステロール合成の制御に関与することを明らかとした。さらに、CYP3Aは肝においてテストステロンを不活化することにより、生体内テストステロン濃度を制御し、前立腺におけるアンドロゲン作用の恒常性維持に関与していることが示唆された。これらの知見は、医薬品の服用によるCYP3Aの機能変化が生化学検査値や病態への影響を及ぼす可能性を示唆するものであり、新たな医薬品適正使用の推進に寄与することができると思われる。

#### <引用文献>

- ① Inoue S, Yoshinari K, Sugawara M, Yamazoe Y. Activated sterol regulatory element-binding protein-2 suppresses hepatocyte nuclear factor-4-mediated Cyp3a11 expression in mouse liver. *Mol. Pharmacol.* (2011) 79:148-56.
- ② Hashimoto M, Kobayashi K, Watanabe M, Kazuki Y, Takehara S, Inaba A, Nitta S, Senda N, Oshimura M, Chiba K. Knockout of mouse Cyp3a gene enhances synthesis of cholesterol and bile acid in the liver. *J. Lipid Res.* (2013) 54:2060-2068.
- ③ Zhang B, Cheng Q, Ou Z, Lee JH, Xu M, Kochhar U, Ren S, Huang M, Pflug BR, Xie W, Pregnane X receptor as a therapeutic target to inhibit androgen activity, *Endocrinology* (2010) 151: 5721-5729.
- ④ Fujimura T, Takahashi S, Urano T,

Kumagai J, Murata T, Takayama K, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S. Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology.* (2009) 74:391-397.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

(1) Nitta S, Hashimoto M, Kazuki Y, Takehara S, Suzuki H, Oshimura M, Chiba K, Kobayashi K. Evaluation of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol as endogenous biomarkers of CYP3A4: study with CYP3A-humanized mice. *AAPS J.* 査読有、in press

(2) Hashimoto M, Kobayashi K, Yamazaki M, Kazuki Y, Takehara S, Oshimura M, Chiba K. Cyp3a deficiency enhances androgen receptor activity and cholesterol synthesis in the mouse prostate. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 査読有 Vol. 163, 2016, pp. 121-128.

[学会発表] (計3件)

(1) 小林カオル、異物代謝酵素CYP3Aの生理機能、日本薬物動態学会第32回年会(シンポジウム)、2017/11/29~12/1、東京

(2) 橋本真里、小林カオル、香月康宏、押村光雄、千葉寛、Cytochrome P450 3Aの生理的機能：肝コレステロール合成と前立腺アンドロゲンの受容体活性制御における役割、日本薬学会第136年会(シンポジウム)、2016/3/26~29、横浜

(3) Mana Yamazaki, Kaoru Kobayashi, Yasuhiro Kazuki, Shoko Takehara, Mari Hashimoto, Mitsuo Oshimura and Kan Chiba. Effect of human CYP3A genes transferred into Cyp3a-KO mouse on cholesterol synthesis in the liver. 日本薬物動態学会第30回年会(ポスター). 2015/11/12~14、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakubutu/framepage4.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 カオル (KOBAYASHI, Kaoru)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30255864