

令和元年5月12日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08368

研究課題名(和文) ヒト胎児肝における薬物代謝酵素の糖質コルチコイド応答性の差異に関わる機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying different glucocorticoid responses of drug-metabolizing enzymes, SULT1E1 and CYP3A7, in human fetal liver cells

研究代表者

大森 栄 (OHMORI, Shigeru)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・教授

研究者番号：70169069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト胎児肝細胞におけるSULT1E1およびCYP3A7の糖質コルチコイドに対する応答性の差異に関わる機構を明らかにすることを目的とした。両遺伝子の糖質コルチコイド応答性の差異はグルココルチコイド受容体の発現パターンや、DNAのメチル化およびクロマチンの構造変化の様なエピジェネティクスでは説明できず、異なる発現調節因子が関わっている可能性が示唆された。今後、SULT1E1およびCYP3A7の糖質コルチコイド応答性とそれぞれ相関する候補遺伝子の役割について解析していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒト胎児肝における薬物応答性を規定する肝組織の特性と薬物の特徴を明確にすることができた。すなわち、胎児期に産生されるステロイドホルモンの不活性化に關与する薬物代謝酵素SULT1E1およびCYP3A7の糖質コルチコイド応答性には、それぞれ異なる発現調節因子が関わっている可能性が示唆された。本研究成果を基盤にして、将来より多くの薬物に対する応答性を明らかにすることができれば、妊娠中の適正な薬物療法に対する新たな治療戦略の構築に大きく貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Inducibility of SULT1E1 and CYP3A7 by glucocorticoids was examined with human fetal liver cells to elucidate mechanisms underlying different glucocorticoid response of SULT1E1 and CYP3A7 genes. Expression profile of glucocorticoid receptors and epigenetic regulation did not explain such a different glucocorticoid response. Our study suggests that distinct regulatory factors may be responsible for glucocorticoid responses of SULT1E1 and CYP3A7 genes. Further studies are needed to clarify a role of SAA1 in SULT1E1 induction and roles of FOXO1, ASF1B and E2F1 in CYP3A7 induction.

研究分野：薬物動態学、薬物代謝学

キーワード：ヒト胎児肝細胞 糖質コルチコイド SULT1E1 CYP3A7 発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、これまで胎児期における薬物動態変動因子の解明を目的として、ヒト胎児肝細胞を用いた研究に取り組み、多くの成果を上げてきた。最近では、57種類の薬物を用いて、ヒト胎児肝細胞における各種薬物代謝酵素の発現解析を行った。その結果、胎児肝の主要なシトクロム P450 である CYP3A7 や出生後よりも胎児期の肝で多く発現している硫酸転移酵素の SULT1E1 の発現を顕著に誘導する薬物を複数見出した。これら誘導薬物のうち、糖質コルチコイドであるデキサメタゾンは両酵素の発現を誘導した。しかしながら、両酵素のデキサメタゾンに対する応答性は用いたヒト胎児肝細胞によって大きく異なっていた。すなわち、SULT1E1 については、胎齢の進行とともに発現誘導レベルが上昇したが、CYP3A7 については胎齢との関連性は示されなかった。デキサメタゾンはグルココルチコイド受容体 (GR) を介して SULT1E1 および CYP3A7 の発現を誘導するが、解析したいずれのヒト胎児肝細胞においても同程度の GR が発現していた。これらの結果より、SULT1E1 および CYP3A7 のデキサメタゾンに対する応答性の差異は GR のみの単純な関与では説明できない。GR だけでなく、他の発現調節因子がデキサメタゾンによる SULT1E1 および CYP3A7 の発現誘導を GR 依存的または非依存的に制御している可能性が考えられる。しかし、ヒト胎児肝細胞における SULT1E1 および CYP3A7 の糖質コルチコイドに対する応答性の差異に関わる機構は不明である。

#### 2. 研究の目的

ヒト胎児肝細胞における SULT1E1 および CYP3A7 の糖質コルチコイドに対する応答性の差異に関わる機構を明らかにする。

(1) 各種糖質コルチコイドの SULT1E1 および CYP3A7 発現誘導能を評価し、それらの誘導機構における GR の関与について詳細に解析する。

(2) *SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子のエピジェネティックな制御機構について解析する。

(3) 糖質コルチコイドによる SULT1E1 および CYP3A7 の発現誘導におけるエピジェネティクス以外の発現調節因子の関与について解析する。

#### 3. 研究の方法

(1) 胎齢の異なるヒト胎児肝細胞 (13 週、14.4 週、16 週、18.3 週) に各種糖質コルチコイドを 24 時間処理し、その後、mRNA レベルの発現解析をリアルタイム PCR 法により行った。

(2) 胎齢の異なるヒト胎児肝細胞 (13 週、14.4 週、16 週、18.3 週) に DNA 脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンを 96 時間処理した後、デキサメタゾンを 24 時間処理し、mRNA レベルの発現解析をリアルタイム PCR 法により行った。また、各ヒト胎児肝細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸またはトリコスタチン A の存在下でデキサメタゾンを 24 時間処理し、mRNA レベルの発現解析をリアルタイム PCR 法により行った。

(3) 胎齢の異なるヒト胎児肝細胞 (13 週、14.4 週、16 週、18.3 週) にデキサメタゾンを 24 時間処理し、その後、DNA マイクロアレイによる発現解析を行った。*SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性と相関する候補遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 胎齢 18.3 週のヒト胎児肝細胞を用いて、各種糖質コルチコイド (100 nM) の発現誘導能を評価した結果、SULT1E1 および CYP3A7 の発現上昇はそれぞれデキサメタゾンで 15.3 倍、4.44 倍、メチルプレドニゾロンで 13.4 倍、4.94 倍、プレドニゾロンで 10.6 倍、3.22 倍、ベタメタゾンで 10.2 倍、4.25 倍、コルチゾールで 7.48 倍、2.89 倍、コルチコステロンで 4.27 倍、2.89 倍、コルチゾンで 1.32 倍、2.34 倍であった。また、他の異なる胎齢のヒト胎児肝細胞 (13 週、14.4 週、16 週) についても同様に解析したところ、SULT1E1 では胎齢の進行とともに発現誘導レベルが上昇したが、CYP3A7 については胎齢との関連性は認められなかった。

GR には GR とそのスプライスバリエントである GR および GRP が存在するが、ヒト胎児肝細胞には主に GR および GRP が発現しており、これらの GR はデキサメタゾンによる発現制御を受けていないことが確認された。しかし、各種 GR の発現パターンでは、糖質コルチコイドによる SULT1E1 の発現誘導レベルが胎齢の進行とともに上昇することを説明できなかった。同様に *CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性の差異も説明できなかった。これらのことから、SULT1E1 および CYP3A7 の糖質コルチコイドに対する応答性の差異は、*SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子のエピジェネティックな機構によって制御されている可能性が考えられた。

(2) DNA メチル化の解除が *SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性に及ぼす影響について検討した。その結果、*SULT1E1* 遺伝子のデキサメタゾン応答性は DNA 脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンにより消失した。一方、*CYP3A7* 遺伝子のデキサメタゾン応答性は胎齢 13 週のヒト胎児肝細胞においてのみ 5-アザ-2'-デオキシシチジンによって増強された。このように、両遺伝子とも、DNA のメチル化では糖質コルチコイド応答性の差異を説明できなかった。

次に、クロマチンの構造変化が *SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性に及ぼす影響について検討した。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸はいずれのヒト胎児肝細胞においても、デキサメタゾンによる *SULT1E1* の誘導を増強した。一方、デキサメタゾンによる *CYP3A7* の発現誘導はバルプロ酸によって増強されなかった。別のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A は、胎齢 13 週および 16 週のヒト胎児肝細胞におけるデキサメタゾンによる *SULT1E1* の誘導を増強したが、胎齢 14.4 週および 18.3 週のヒト胎児肝細胞においては増強しなかった。一方、デキサメタゾンによる *CYP3A7* の発現誘導はトリコスタチン A によって抑制された。これらの結果より、*SULT1E1* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性はクロマチン凝縮により制御を受けている可能性が示唆された。一方、*CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性はクロマチン凝縮以外の機序により制御を受けている可能性が考えられた。しかし、両遺伝子とも、クロマチンの構造変化では糖質コルチコイド応答性の差異を説明できなかった。

以上のことから、*SULT1E1* および *CYP3A7* の糖質コルチコイド応答性の差異はエピジェネティクス以外の機序によって制御されている可能性が考えられた。

(3) *SULT1E1* および *CYP3A7* 遺伝子の糖質コルチコイド応答性の差異に関わる発現調節因子を探索するため、DNA マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、*SULT1E1* のデキサメタゾン応答性と相関する候補遺伝子として、*APCDD1*、*INHBB*、*LAMA3*、*METTL7A*、*SAA1*、*SERPINA3*、*FRMD5*、*HBEGF*、*LIF* など 34 遺伝子が見出された。また、*CYP3A7* のデキサメタゾン応答性と相関する候補遺伝子として、*FOXO1*、*GPM6B*、*INHA*、*IP6K3*、*TSC22D3*、*ANGPTL1*、*AFP*、*ASF1B*、*E2F1* など 41 遺伝子が見出された。これらのうち、*APCDD1*、*INHBB*、*LAMA3*、*METTL7A*、*SAA1*、*SERPINA3*、*FRMD5*、*HBEGF*、*LIF*、*FOXO1*、*GPM6B*、*INHA*、*IP6K3*、*TSC22D3*、*ANGPTL1*、*AFP*、*ASF1B*、*E2F1* の発現をリアルタイム PCR 法により解析した結果、*SAA1* は *SULT1E1* のデキサメタゾン応答性と負の相関を示した。また、*FOXO1* は *CYP3A7* のデキサメタゾン応答性と正の相関を、*AFP*、*ASF1B* および *E2F1* は *CYP3A7* のデキサメタゾン応答性と負の相関を示した。

今後、*SULT1E1* の糖質コルチコイド応答性における *SAA1* の役割と、*CYP3A7* の糖質コルチコイド応答性における *FOXO1*、*ASF1B*、*E2F1* の役割について解析していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Satoshi Yamaori、Noriyuki Araki、Mio Shionoiri、Kurumi Ikehata、Shinobu Kamijo、Shigeru Ohmori、Kazuhito Watanabe、A specific probe substrate for evaluation of CYP4A11 activity in human tissue microsomes and a highly selective CYP4A11 inhibitor: Luciferin-4A and epalrestat、J. Pharmacol. Exp. Ther.、査読有、Vol.366、No.3、2018、446-457  
DOI ; 10.1124/jpet.118.249557

### 〔学会発表〕(計 2 件)

山折 大、相川香織、上条しのぶ、松永民秀、大森 栄、ヒト胎児肝細胞における糖質コルチコイドによる硫酸転移酵素 *SULT1E1* の発現誘導、日本薬学会、2017 年 3 月 27 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Satoshi Yamaori、Noriaki Ikemura、Chinatsu Kobayashi、Shinobu Kamijo、Shigeru Ohmori、Characterization of antihypertensive drugs as potent inhibitors of CYP2J2、North American International Society for the Study of Xenobiotics、2018 年 7 月 17 日、Montréal (Canada)

### 〔図書〕(計 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山折 大  
ローマ字氏名：(YAMAORI, Satoshi)  
所属研究機関名：信州大学  
部局名：学術研究院医学系（医学部附属病院）  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40360218

研究分担者氏名：吉成 浩一  
ローマ字氏名：(YOSHINARI, Kouichi)  
所属研究機関名：静岡県立大学  
部局名：薬学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60343399

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。