

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08401

研究課題名(和文) 性特異的遺伝子発現のエピジェネティックな制御と環境化学物質・医薬品類の影響調査

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of sex-specific gene expression and investigation of the effects of environmental chemicals and drugs

研究代表者

杉原 数美 (sugihara, kazumi)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20271067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬毒物代謝酵素であるaldehyde oxidase(AOX)のマウスでの系統差および性差発現機序の解明を行った。系統差・性差は、主にマウス肝に発現するAOX分子種のうちAOX3の発現変動によることを明らかとした。AOX3遺伝子の upstream 領域に、系統により大きく異なる配列があることを見出した。さらに、マウス肝がん細胞Hepa1-6に成長ホルモン(GH)曝露により、in vivoでみられた性差の再現が可能であることを見出した。細胞では内分泌系のフィードバックがなく、HNF4aを始めとする転写因子の変動がみられている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬毒物の影響や疾病などに性差があることが知られているが、性差発現メカニズムの多くが未解明である。本研究では、マウスの様々な系統やマウス肝がん細胞を用いて、薬毒物代謝酵素の1つであるアルデヒド酸化酵素(AOX)の発現における系統差および性差について調査を行った。マウスではAOX分子種のうちAOX1と3が発現しているが、性差および系統差は主にAOX3の変動であることを明らかとした。AOX3は成長ホルモンや性ホルモンの他、内分泌かく乱物質による影響も受けることを見出した。AOX3の遺伝子 upstream 領域の配列の違いも見出し、これが性差、系統差に関連することを解明している。

研究成果の概要(英文)：The strain and sex differences in the expression of aldehyde oxidase (AOX), a drug metabolizing enzyme, were investigated in mice. The strain and sex differences were mainly due to variation in the expression of AOX3, which is AOX isozyme specifically expressed in mice. AOX molecular species expressed in mouse liver. Significantly different sequences were found in the upstream region of the AOX3 gene in different strains. We found that growth hormone (GH) exposure to mouse hepatocarcinoma cells Hepa1-6 was able to replicate the sex difference in vivo mouse.

研究分野：薬物代謝、環境化学物質影響

キーワード：性差 薬物代謝酵素 成長ホルモン 内分泌かく乱物質 医薬品

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

環境化学物質や医薬品に対する応答に性差があることが知られている。ヒトでは肝 CYP3A4 活性が女性で高く、グルクロン酸抱合は男性で高いといわれている。また、疾病でも高尿酸血症の 95% 以上が男性と著しい性差があるが原因は解明されていない。実験動物ではより明確な性差が知られており、ラットでは acetaminophen の中毒量に性差があり、LD50 はメスがオスより高く、代謝に関与する cytochrome P450 (CYP)、glutathione-S-transferase (GST) および glutathione 合成に関与する  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) の性差に起因するといわれている。薬毒物代謝酵素では既知の性差として、ラット肝でのオス特異的 CYP 分子種 2C11 とメス特異的な 2C12 の発現がよく知られている<sup>1)</sup>。また、薬毒物代謝酵素誘導にも性差が知られており、ラットおよびマウスで、Trp-P-1 による CYP1A2 の誘導に性差 メス > オスがみられ、誘導が androgen により抑制されることや<sup>2)</sup>、Ca 拮抗薬 nifedipine により、オスラット肝で CYP3A9、メス肝で 3A18 の特異的誘導がみられ、代謝に性差が発現することも報告されている<sup>3)</sup>。さらに、脂質代謝に関与する PPAR  $\alpha$  /  $\beta$  などの転写因子の性差も知られており、肥満、生活習慣病との関係も注目されている。

薬物代謝酵素の性差発現メカニズムとしては、現在のところ growth hormone (GH) が関与する janus kinase 2 (JAK2)-signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) シグナル伝達系が知られている。齧歯類雌雄では脳下垂体からの GH 分泌パターンが異なり、オスでは約 3.5 時間ごとのパルスの分泌だが、メスでは低濃度での持続的分泌が起きている。オスではパルスの分泌による一過性の GH 高値が JAK2-STAT5b 転写系を活性化し、HNF4a を介して直接的あるいは間接的に種々の遺伝子発現誘導あるいは抑制を起こすと報告されている<sup>4)</sup>。しかし、GH 分泌による制御だけでは説明できない現象もあり、エピジェネティクスな制御や他の内分泌系の影響、microRNA の関与も考えられている<sup>5)</sup>。以上、性差発現に関しての詳細なメカニズム、変動する酵素や転写因子類などに関して包括的調査が必要とされており、また内分泌かく乱作用を有する化学物質による影響も懸念される。

### 2. 研究の目的

薬毒物の影響や疾病などに性差があることが知られているが、性差発現メカニズムの多くが未解明である。本研究では、マウスでのみ性差の認められている薬毒物代謝酵素 aldehyde oxidase (AOX) の性差と系統差に注目して、その発現メカニズムの解明を目指した。さらに、環境化学物質、医薬品類やホルモン等による影響を *in vivo*, *in vitro* で調べることにより、系統差、性差発現の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *In vivo* 肝 AOX 活性

マウスは、系統差の著しい C57BL/6N および DBA/2 と両系統の F1 である B6D2F1 の他、BALB/c、C3H/He などの系統の雌雄を用いた。

GH は 1 日 2 回、性ホルモンおよび化学物質は 1 日 1 回 *s.c.* 投与を行った。

肝 AOX 活性は、phthalazine、phenanthridine を基質として、酸化生成物を HPLC で測定した。

AOX1/3 および *cyp2c9/10* の mRNA は real time RT-PCR で測定した。

AOX1/3 の発現量は、AOX1 と AOX3 に特異的抗体を用いて western blot で測定した。

#### (2) 脳下垂体切除マウス

下垂体切除 C57BL/6 マウス (Hx mouse) および疑似手術マウス (sham mouse) 雌雄に GH 投与し、AOX の発現を調べた。

#### (3) *in vitro* AOX 発現

マウス肝がん細胞 Hepa1-6

マウス肝がん細胞 Hepa1-6 は (C57BL マウス最小偏奇肝癌細胞株、ECACC 由来 (ECA3041) 株) は DMEM (high glucose (Life Technology 製)) を用い継代培養した。GH, dexamethasone (DEX), estradiol (E2) などによる AOX1/3, *cyp2b9/10* および転写因子への影響を real time RT-PCR および western blot で調査した。

マウス肝初代細胞培養

マウス肝より、灌流法で初代肝細胞を単離し DMEM 培地で培養した。GH、DEX の添加による AOX1/3, *cyp2b9/10* の発現をみた。

#### (4) 転写因子 HNF4 の DNA 結合測定

転写因子 HNF4 の DNA への結合はクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)で行った。

#### (5) マウス AOX1/3 の上流域の検索

高 AOX 活性系統の C57BL/6N と低活性の DBA/2 の雌雄の AOX1 と AOX3 の上流域をデータベース検索した。データベース上で欠失している配列は各マウスよりゲノム DNA を抽出し、シーケンスすることにより配列を決定した。マウスゲノムデータベースは以下のサイトを参照した。[https://asia.ensembl.org/Mus\\_musculus/Info/Strains](https://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Strains)

### 4. 研究成果

#### (1) マウス AOX 発現の系統差および性差

マウス 4 系統 (C57BL/6J, BALB/c, C3H/He, DBA/2) 8 週齢の雌雄での AOX 活性を調べたところ、最も AOX 活性の高い C57BL/6N と DBA/2 では、約 2.5 倍の活性差があり、またオス > メスの性差も観察され、活性の高い C57BL/6N で最も差が大きかった。オスの系統差に比べ、メスでの差は少なかった (Fig.1)。

マウスには AOX 分子種の AOX1 と AOX3 が発現していることが知られている。それぞれの mRNA 発現量の比較を Realtime RT-PCR で測定した。AOX1 の mRNA 量に系統差、性差は少ない。一方、AOX3 は AOX1 の 10 倍ほど発現しており、オス > メスの性差もみられた (Fig.2)。

同様の傾向が、AOX1/3 のタンパク質発現でも western blot で認められた。

#### (2) 性ホルモン、成長ホルモンの影響

C57BL/6J マウス、オスに estradiol (E2), メスに testosterone propionate (TP) を 5 日間 1 日 1 回投与することにより、オスは AOX 活性が低下、メスは上昇した。

GH はメスに 1 日 2 回 7 日間投与した。メスでの AOX は上昇した。

性ホルモン、GH の影響は主に AOX3 の変動によることを mRNA および western blot で確認した。

#### (3) 環境化学物質、医薬品による影響

内分泌かく乱物質で女性ホルモン様作用のある bisphenol A (BPA)、diethylstilbestrol (DES) をオスマウスに投与すると、AOX 活性低下、AOX の発現低下がみられた (Fig. 3)。抗アンドロゲン薬である flutamido, あるいは chlormazinone をオスマウスに投与し、肝 AOX 活性の変動をみたところ、いずれも多少の上昇傾向はみられたが、有意な増加ではなかった

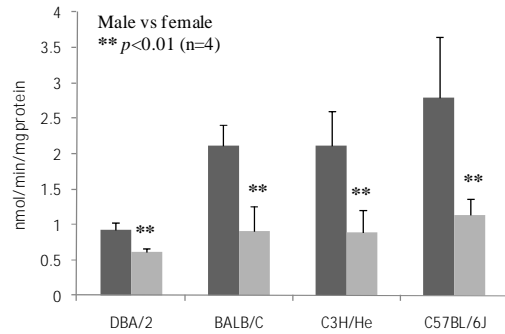


Fig.1 マウス肝 AOX 活性の系統差および性差

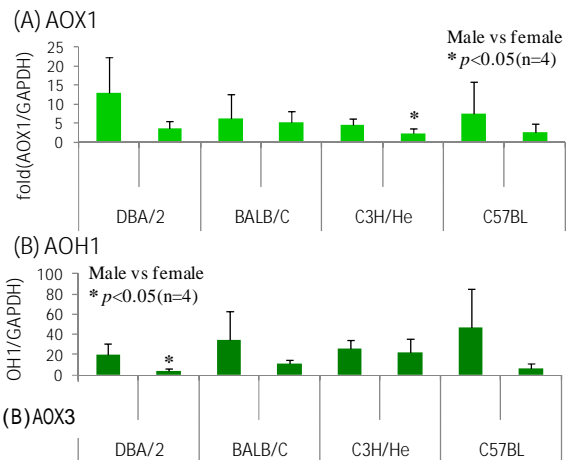


Fig.2 マウス肝 AOX1/3 mRNA の系統差および性差

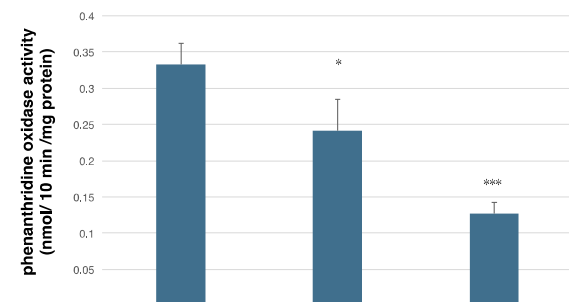


Fig.3 マウス肝 AOX 活性への BPA, DES の影響



(7) マウス肝がん細胞 Hepa1-6 を用いた検討

Hepa1-6 細胞を培養し、AOX1/3 の発現を調べた。AOX 活性は僅かに検出された。mRNA 発現は real-time RT-PCR で測定でき、目的とする AOX 遺伝子が発現していることを確認した。GH を 1 日 2 回午前 8 時と午後 8 時に曝露し、曝露後 1 時間で通常の培地に交換するという作業を 5 日間繰り返した。その結果、AOX3 mRNA の発現が上昇し、cyp2b9 mRNA の低下が観察された。AOX1 の発現は変動しなかった(Fig.7)。

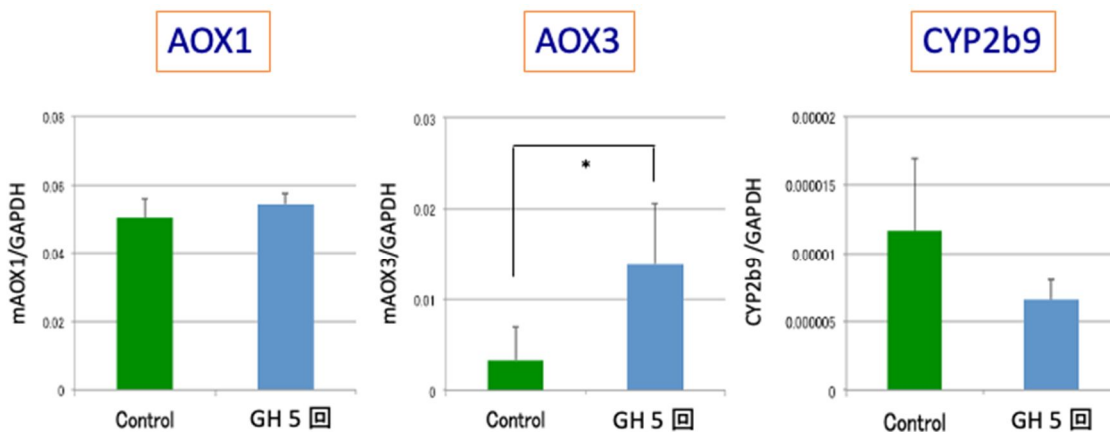


Fig.7 GH 曝露による Hepa1-6 細胞での AOX1/3 および cyp2b9 mRNA 変動

\*P<0.05

しかし、細胞内での転写因子等の変動がつかみにくいため、マウス初代肝細胞を使うことにした。現在、初代肝細胞を用いているが、再現性が悪いため再度 Hepa 1-6 細胞での検討に変えているところである。

以上、マウス肝薬物代謝酵素の AOX 活性に系統差、性差があることより、発現メカニズムの解明に用いた。AOX には AOX1 と AOX3 の分子種があり、性差および系統差は主に AOX3 の発現変動により発生していることを明らかとした。

マウスでの系統差、性差、GH、E2 および TP などの内分泌物質以外に、BPA、DES のような内分泌かく乱物質および医薬品などによる発現変動など、in vivo での影響を確認した。In vivo で、GH の影響が大きいことを明らかとしたが、内分泌系はフィードバックなどが起きるため、詳細なメカニズム検討は細胞を用いることにした。細胞も、GH 曝露で性差発現の再現が可能であった。今後、この系を用いて、更なるメカニズム検討を行う予定である。

また、AOX3 遺伝子上流域に、系統により異なる部分を見出し、雌雄でも一部異なる部分もあるので、これらが系統差、性差発現に関与することが考えられた。現在、この部分のレポーター系を構築している。これにより、さらなる発現調節のメカニズムが解明できるものと考えている。

参考文献：1) Sakuma, T. *et al.*, *Journal of Health Science* (2009), 2) Matsukura N, *et al.*, *Science* (1981), 3) Konno Y., *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2004), 4) Chang, T., *et al.*, *Encyclo. Drug Metab. Inter.* (2012), 5) Wauthier, V. *Mol Endocrinol* (2008), 6) Kitamura, S., *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (2006), 21(2), 83-98.,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Takaoka; Seigo Sanoh; Katsuhiko Okuda; Yaichiro Kotake; Go Sugahara; Ami Yanagi; Yuji Ishida; Chise Tateno; Yoshitaka Tayama; Kazumi Sugihara; Shigeyuki Kitamura; Mami Kurosaki; Mineko Terao; Enrico Garattini; Shigeru Ohta	4. 巻 154
2. 論文標題 Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Pharmacol., 154, 28-38. 2018	6. 最初と最後の頁 28-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.04.017. Epub 2018 Apr 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Takaoka; Seigo Sanoh; Katsuhiko Okuda; Yaichiro Kotake; Go Sugahara; Ami Yanagi; Yuji Ishida; Chise Tateno; Yoshitaka Tayama; Kazumi Sugihara; Shigeyuki Kitamura; Mami Kurosaki; Mineko Terao; Enrico Garattini; Shigeru Ohta	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.04.017. Epub 2018 Apr 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanoue C, Sugihara K, Tayama Y, Uramaru N, Watanabe Y, Ohta S, Kitamura S.	4. 巻 10(4)
2. 論文標題 Variability of Zaleplon 5-Oxidase Activity in Mice and Humans, and Inhibition by Raloxifene	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Metab Lett.	6. 最初と最後の頁 278-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1872312810666161227145358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉原 数美, 村川 晃大, 荒井 美幸, 田山 剛崇, 清水 良, 北村 繁幸, 太田 茂
2. 発表標題 離乳期におけるラット肝CYPおよびaldehyde oxidaseの変動
3. 学会等名 日本薬学会139年会 千葉幕張メッセ 2019年3月20-22日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 真帆, 佐能 正剛, 高岡 尚輝, 大月 佑也, 杉原 数美, Mineko TERAO, Enrico GARATTINI, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 マウス、ヒトに発現するA0 タンパク質の分解系の同定
3. 学会等名 日本薬学会139年会 千葉幕張メッセ 2019年3月20-22日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumi Sugihara, Yoshitaka Tayama, Seigo Sanoh, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta
2. 発表標題 Sex differences of aldehyde oxidases in mouse liver
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Takaoka, Seigo Sanoh, Katsuhiko Okuda, Go Sugahara, Ami Yanagi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Yoshitaka Tayama, Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Mami Kurosaki, Mineko Terao, Enrico Garattini, Shigeru Ohta, Yaichiro Kotake
2. 発表標題 Assessment of inhibitory effects of drugs on mouse and human aldehyde oxidases through in silico, in vitro, and in vivo approaches.
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤祐子、田坂真希、富吉博也、濱崎千尋、清水 良、佐能 正剛、太田 茂、北村繁幸、杉原 数美
2. 発表標題 マウス肝アルデヒドオキシダーゼの性特異的発現機序の検討
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸沙也香、村川晃大、平本耕一、清水 良、佐能正剛、太田 茂、北村繁幸、杉原数美
2. 発表標題 薬物代謝酵素アルデヒドオキシダーゼのマウスにおける性差と系統差
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉原数美、平本耕一、田坂真希、田山剛崇、佐能正剛、太田 茂、北村繁幸
2. 発表標題 Strain and sex differences of aldehyde oxidase isozymes in mouse liver
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第32回年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島国際大学薬学部 環境衛生薬学研究室 研究室紹介  <a href="https://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/environmental/">https://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/environmental/</a>          広島国際大学薬学部 環境衛生薬学研究室 研究室紹介  <a href="https://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/environmental/">https://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/environmental/</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 良  (Ryo Shimizu)  (00570491)	広島国際大学・薬学部・講師    (35413)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 茂 (Ohta Shigeru) (60160503)	広島大学・医系科学研究科(薬)・名誉教授  (15401)	
研究分担者	渡部 容子 (Watanabe Yoko) (60628056)	日本薬科大学・薬学部・助教  (32425)	
研究分担者	田山 剛崇 (Tayama Yoshitaka) (80389121)	広島国際大学・薬学部・准教授  (35413)	