

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590140  
 研究課題名（和文） 成長ホルモン及びHNF3βまたは4αによる  
 性特異的シトクロムP450発現調節  
 研究課題名（英文） Sex-dependent expression mechanism of cytochrome P450  
 by growth hormone and a transcription factor, HNF3β or HNF4α.  
 研究代表者  
 根本 信雄（NEMOTO NOBUO）  
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授  
 研究者番号：10085631

## 研究成果の概要：

薬物代謝酵素シトクロム P450 は、医薬品の薬理効果発現に重要な役割を担っている。最近ヒト P450 の一部で発現に性差が存在することが明らかとなってきた。そこで、雌特異的な発現を示すマウス CYP2B9 をモデルとして調節機構の基礎的なデータを得た。CYP2B9 の発現に雌雄差が生ずることは、成長ホルモンの雌雄で異なる分泌パターンに基本的に支配され、*Cyp2b9* 遺伝子の発現調節に関わる転写因子として、HNF3β (FoxA2) と STAT5b を同定し、関わる遺伝子領域の解析を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物代謝、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝過程で中心的な役割を果たしているシトクロム P450 (P450) の活性は、遺伝要因によって高低が決定される多型と、

環境要因による誘導または阻害による変動効果とが絡み合っており、個人差は非常に大きい。従って、最近の Nature 誌でも指摘されたように、テーラーメイド医療のさらな

る進展のためには、P450 発現の調節機構を解明するとともに、変動要因を明らかにして、薬物間相互作用を含めた副作用を予知し、避けることが必要である。大きな個人差が認められるにもかかわらず、変動要因として、性差がいくつかの P450 分子種で報告されている。たとえば半数以上の臨床薬の代謝に関わっている CYP3A4 は、女性の代謝能力が高いという報告がある。また CYP1A2 に関しては、男性の方が高いとする報告もある。このような性差を示す常在的な発現が、何が引き金となり、何によって調節されているかはほとんどわかっていない。最近、CYP3A4 遺伝子のエキソン部分に 5'上流域も含めて導入したトランスジェニックマウスでは、メス特異的な発現を示し、マウスの常在性 P450 のうちメス特異的な発現をする分子種と類似して、成長ホルモンによる制御を受けていることが観察された。従って、この遺伝子の性依存的な発現をする調節因子と機構の解明には、マウスを使うことの有用性が示唆され、ヒトとの類似点や相違点を比較検討する際の基礎的データが得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は、発現に顕著な雌雄差が認められるマウスの CYP2B9 分子種を対象に、関わる内分泌ホルモンとして、成長ホルモン、性ホルモン、そして副腎皮質ホルモンの影響をこれまで報告してきた。ラット・マウスの性依存性 P450 発現における転写因子 HNF (肝細胞核内因子) の役割についてこれまで多くの指摘があり、特に HNF4 $\alpha$  欠損マウスの実験で

は、オス特異的な P450 分子種でのポジティブな役割が指摘されている。また、成長ホルモンが関わる転写因子 STAT5b の発現への関与も、複数の P450 分子種で示唆されている。しかし、遺伝子レベルで調節因子の相互関係についての解析はまだ終了していない。本研究では、CYP2B9 のメス特異的な発現に関わる遺伝子調節領域の確定と関わる調節因子やその機構を明らかにすることを目的とした。また、同じくメスマウス特異的な発現をしている CYP3A4I 遺伝子の場合、我々の予備的な実験から、関わる転写因子として HNF4 $\alpha$  であることが明らかとなっていたので、二つの P450 遺伝子がメス特異的な発現は同じであるにもかかわらず、異なった発現調節を受けると想像された。性特異的な発現に関する基礎データが多いほど有用性があると考え、両遺伝子の発現調節領域と因子の解析を並行して進めていくことを申請書に記述したが、Cyp2b9 遺伝子ほど計画が進行しなかったため、本報告書は Cyp2b9 遺伝子に限定した報告とする。

## 3. 研究の方法

○CYP2B9 発現に関わる転写調節因子の同定と調節機構

マウス P450 遺伝子の発現の観察や遺伝子の発現調節領域の解析実験の場として、マウス肝細胞初代培養系を用いて実験を行ってきたが、一般的に肝細胞初代培養系では、肝臓で常在的に発現している P450 分子種の発現維持が難しい。すなわち、発現に関わる調節因子が培養系では減少してしまうためと考えられている。一方継代化された培養細胞では、こうした常在的に発現している P450 類の発現はほとんど認められない。遺伝子

の発現調節領域の決定には、レポーター遺伝子と結合した *Cyp2b9* 遺伝子 5' 上流域断片を培養細胞に導入することが常法であるが、この方法では転写活性が認められなかったため、マウス尾静脈より遺伝子断片を投与し、肝臓での発現を測定する方法（ハイドロダイナミック法）をとった。

この結果、CYP2B9 の雌雄差発現に FoxA2 (HNF3β) 応答配列を含む遺伝子領域の関与が強く示唆されたので、④ CYP2B9 遺伝子の当該領域 (-234/-194) をプローブとして核内タンパクと結合することを調べるゲルシフトアッセイによって、雌雄差や培養細胞における発現の違いとの相関性を確認する、また⑤ FoxA2 抗体を用いての特異性の確認、さらに⑥ こうした核内転写因子を強制発現させることの影響、などを総合判断して、FoxA2 の役割を明らかにする。またオスで発現抑制が観察されることの原因として、STAT5b の関与が示唆されているので、上記の FoxA2 と同様の実験を行い、両者の関係を解析する。また、個体発生過程における発現変動や、肝臓や性腺が高いなどの組織特異的な発現については既に観察しているので、こうした発現変動に連携する内分泌系の同定とその役割を解析した。

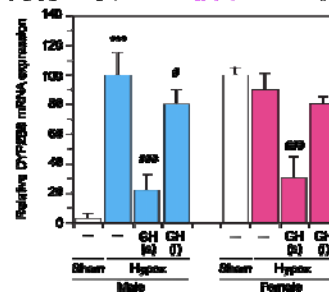
#### 4. 研究成果

##### (1) 雌特異的 CYP2B9 発現における成長ホルモンの役割

脳下垂体摘出マウスに組換えヒト成長ホルモン (hGH) をオス型、メス型それぞれの分泌パターンを模倣するように投与した。

その後、肝臓から得られた total RNA を用いて、CYP2B9 mRNA 発現量を解析した結果、成獣脳下垂体摘出オスマウスでは、無処置メスマウスと同程度の CYP2B9 の発現が観察された。一方、脳下垂体摘出メスマウスでは、無処置のメスマウスと比較して差は観察されなかった。また、脳下垂体摘出オスマウスに、オス型分泌パターンを模倣して hGH を投与することにより、

脳下垂体摘出マウスの CYP2B9 mRNA 発現に対する GH 投与による影響



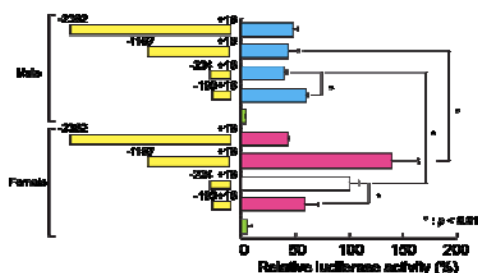
その発現が抑制された。さらに、脳下垂体摘出メスマウスに雄型分泌パターンを模倣して hGH を投与することによっても、CYP2B9 の発現が抑制された。これらのことから、CYP2B9 の成獣におけるメス特異的発現は、オスマウスで成長ホルモンによる抑制が起こっていることが原因であることを明らかにした。

##### (2) 成長ホルモンによる *Cyp2b9* 遺伝子転写制御領域の解析

マウス *Cyp2b9* 遺伝子 5' 上流域 2.4 kbp をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) に結合したコンストラクト (-2382/+18-Luc)、または *Cyp2b9* 遺伝子 5' 上流域を段階的に欠失させレポーター遺伝子に結合させたコンストラクトを作製し、マウス初代肝細胞培養系に導入しても、ベク

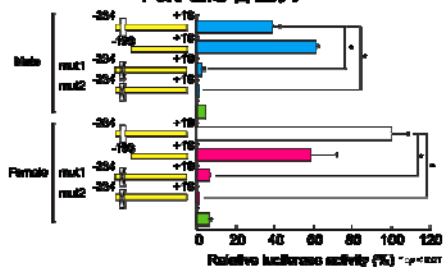
ターのみよりも高いルシフェラーゼ活性は検出されなかった。この結果は、マウス肝細胞が培養系に移されることによって *Cyp2b9* 遺伝子の転写に必要な各種転写調節因子の活性が低下したためと考え、ハイドロダイナミック遺伝子導入法を用いた in vivo レポーター遺伝子アッセイを実施した。各種レポーター遺伝子コンストラクトを尾静脈から導入し、20 時間飼育後、肝臓のルシフェラーゼ活性を解析した。-193/+18-Luc では雌雄で同程度のルシフェラーゼ活性を示したが、-234/+28-Luc、-1167/+18-Luc ではメスで高いルシフェラーゼ活性が検出され、-234/-193 の領域に依存したルシフェラーゼ活性

#### ハイドロダイナミック法による *Cyp2b9* 遺伝子 5' 上流域のエンハンサー活性の検索



が、雌雄で異なることが示された。この領域には推定 FoxA2 結合サイトが存在している。興味深いことに推定 FoxA2 結合サイトを含む -234/-193 領域を欠失させた

#### *Cyp2b9* 遺伝子プロモーター領域における FoxA2 応答配列



-193/+18-Luc では、雌雄で同程度の高いルシフェラーゼ活性が観察されているのに対し、FoxA2 結合サイトを変異させたコンストラクトでは、雌雄においてルシフェラーゼ活性が消失したことから、推定 FoxA2 結合領域近傍に抑制因子が結合する配列が存在しており、FoxA2 結合領域を変異させると抑制因子のみが結合しているため、雌雄で活性が消失したのに対し、-193/+18-Luc ではその抑制因子の関与も失われたため、性に依存しない発現が起こると推察した。さらに、あらかじめ hGH をオス型パターンで投与した雌マウスに、ハイドロダイナミック法で -234/+28-Luc と -193/+28-Luc コンストラクトを肝臓に導入したところ、-234/+28-Luc において無処置メスマウスと比較してルシフェラーゼ活性が有意に抑制された。このことから、-234/-193 にオス型成長ホルモン分泌により調節されている領域が存在していることを確認した。

#### (3) 雌雄差発現への FoxA2 及び STAT5b の関与

次に、FoxA2 発現はメス型成長ホルモン分泌で活性化されることを明らかにした。さらに、マウス *Cyp2b9* 遺伝子のプロモーター領域に FoxA2 が結合しているかを ChIP 解析により調べた結果、成獣メスの肝臓では FoxA2 の結合が観察されたが、オスでは観察されなかった。また、FoxA2 推定結合領域周辺の塩基配列からの推定、及び成長ホルモンのオス型分泌パターンにより活性化される転写因子としての性質から、STAT5b を候補と考え、この抗体を用いて、

同様の ChIP 解析を行った結果、FoxA2 とは反対に、成獣オスの肝臓において

### Cyp2b9 遺伝子プロモーター領域上への FoxA2、STAT5b の結合



STAT5b の結合が観察されたが、メスでは観察されなかった。以上のことから、CYP2B9 発現におけるマウスでの雌雄差は、メスでは FoxA2 がプロモーター領域に結合することで、抑制因子の結合を阻害して転写を促進するのに対し、オスでは STAT5b がプロモーター領域に結合することによって、転写を抑制する一因になっていると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Sakuma T., Bhadhprasit W., Hashita T. and Nemoto N.: Drug Metab. Dispos., 36:878-884, Synergism of glucocorticoid hormone with growth hormone for female-specific mouse *Cyp3a44* gene expression. 2008, 査読有.
- ② Hashita T., Sakuma T., Akada M., Nakajima A., Yamahara H., Ito S., Takesako H., and Nemoto N.: Drug Metab. Dispos., 36:1080-

1087, Forkhead box A2-mediated regulation of female-predominant expression of the mouse *Cyp2b9* gene. 2008., 査読有.

- ③ Jarukamjorn K., and Nemoto N.: J. Health Sci., 54: 370-381, Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent Andrographolide. 2008, 査読有.
- ④ Jaruchotikamol A., Jarukamjorn K., Sirisangtrakul W., Sakuma T., Kawasaki Y., and Nemoto N.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 224: 156-162, Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. 2007, 査読有..
- ⑤ Bhadhprasit W., Sakuma T., Hatakeyama N., Fuwa M., Kitajima K., and Nemoto N.: Drug Metab. Dispos., 35: 1880-1885, Involvement of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor in the regulation of mouse CYP3A44 female-predominant expression by glucocorticoid hormone. 2007., 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Wattanaporn Bhadhprasit, 佐久間勉, 赤田真美, 根本信雄. グルココルチコイドによる *Cyp3a41* 遺伝子の調節機構: C/EBP の役割. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.
- ② Wattanaporn Bhadhprasit, 佐久間勉, 根本信雄: Glucocorticoid-mediated induction of mouse *Cyp3a41* gene expression; involvement of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4 alpha, 第 23 回

- 日本薬物動態学会年会, 2008, 10, 30-11, 1, 熊本.
- ③ 河崎優希, 佐久間勉, 根本信雄. 12 のXRE を含む*Cyp1a2* 遺伝子の5'上流域による3-MC並びに2,3,7,8-TCDD誘導性マウス*Cyp1a2* 遺伝子転写調節. 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会. 2008, 12, 9-12, 神戸.
- ④ 根本信雄, 古澤裕之, 上野真一, 佐久間勉: メス優位に発現するマウス*Cyp3a41* 遺伝子転写過程におけるHNF4 $\alpha$ の役割. 第15回肝細胞研究, 2008, 6, 27-28, 静岡.
- ⑤ Sakuma T., Bhadhprasit W., and Nemoto N. Growth hormone-mediated expression of female-specific *Cyp3a44* gene in mouse livers. 8th International ISSX meeting, 2007, 10, 9-12, Sendai.
- ⑥ Bhadhprasit W., Sakuma T., and Nemoto N. Involvement of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor in the regulation of mouse *Cyp3a44* gene expression by glucocorticoid hormone. 8th International ISSX meeting, 2007, 10, 9-12, Sendai.
- ⑦ 坡下真大, 中島明日香, 赤田真美, 佐久間勉, 根本信雄. *Cyp2b9* 遺伝子の性依存的転写活性における調節領域の同定. 日本薬学会127 年会, 2007, 3, 28-30, 富山.
- ⑧ 佐久間勉, Bhadhprasit W., 根本信雄. メスマウス特異的*Cyp3a* 遺伝子の発現調節. 第5回ながの遺伝子発現調節研究会, 2007, 11, 24-25, 諏訪.
- ⑨ 古澤之裕, 佐久間勉, ペットパラシットワッタナポン, 坡下真大, 宮内希弥子, 阿部かおる, 向井恭行, 根本信雄. マウス

- メス特異的*Cyp3a41* 遺伝子の常在的発現機構のHNF4 $\alpha$ の役割. 日本薬学会北陸支部第117 回例会, 2007, 11, 11, 金沢.
- ⑩ 古澤之裕, 佐久間勉, 上野真一, ペットパラシットワッタナポン, 坡下真大, 阿部かおる, 根本信雄. メスマウス肝臓における*Cyp3a41* 遺伝子の常在的発現に対するHNF4 $\alpha$ の役割. 第30 回日本分子生物学会年会・第80 回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

根本 信雄 (NEMOTO NOBUO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号：1 0 0 8 5 6 3 1

### (2)研究分担者

佐久間 勉 (SAKUMA TSUTOMU)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・准教授

研究者番号：3 0 2 5 0 4 6 8

河崎 優希 (KAWASAKI YUKI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・助教

研究者番号：3 0 4 3 2 1 0 7

### (3)連携研究者

無し