

平成21年 5月15日現在

| |
|---|
| 研究種目：若手研究（B） |
| 研究期間：2007～2008 |
| 課題番号：19790114 |
| 研究課題名（和文）肥満などのエネルギー過剰時に働く核内受容体としての PXR および CAR |
| 研究課題名（英文）Role of nuclear receptors PXR and CAR under the energy surplus condition such as obesity |
| 研究代表者 吉成 浩一（YOSHINARI KOUICHI） 東北大学・大学院薬学研究科・准教授 研究者番号：60343399 |

研究成果の概要：本研究では、薬物応答性の核内受容体 CAR および PXR はコレステロール合成に関わる酵素の遺伝子発現調節を正に調節すること、また、マウスの主要な薬物代謝酵素 Cyp3a11 の発現はコレステロール欠乏により活性化される転写因子 SREBP により抑制的に制御されることが明らかとなった。これらの結果は、脂質代謝と薬物代謝の間に転写調節因子を介したクロストークが存在することを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

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：薬物代謝学

1. 研究開始当初の背景

生体は異物の暴露に応じてその排泄に関わる薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現を亢進し、異物除去能力を上昇させる。この異物除去関連遺伝子の転写亢進には、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子の constitutive androstane receptor (CAR) および pregnane X receptor (PXR) が中心的な役割を果たしている。薬物の暴露により活性化されたこれら核内受容体は、標的遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写を亢進する。CAR と PXR の代表的な標的遺伝子として、薬物代謝酵素チトクロム

P450 (CYP) ファミリーの遺伝子が知られており、古くから CYP 誘導剤として知られていたフェノバルビタールとデキサメタゾンそれぞれ CAR および PXR を活性化することで CYP 遺伝子の発現を亢進する。これらのことから、CAR と PXR は生体の異物センサーとして働き、生体内の異物レベルをコントロールする重要な転写調節因子として考えられている。

一方、フェノバルビタールやデキサメタゾンは、齧歯動物において肝臓中や血中の糖質・脂質レベルを変動させることも知られている。しかしながら、その分子機構は明らか

になっておらず、これらの変動が、CYP 遺伝子の場合と同様に、CAR や PXR を介した脂質・糖質代謝関連遺伝子の直接的な発現調節により起こるのか否かは不明であった。

薬物代謝酵素の発現レベルは、薬物などの外来異物の暴露だけではなく、生理的・病理的要因によっても変動することが知られている。しかし、その分子機構には不明な点が多い。研究代表者らは、1) 遺伝性肥満・糖尿病モデル動物の Zucker fatty ラットにおける肝 CYP2B 酵素の構成的発現量やフェノバルビタール誘導性の低下は、CAR の発現レベルの低下に起因すること、2) 遺伝性糖尿病モデル動物の *db/db* マウスの肝では、CAR や PXR、peroxisome proliferator-activated receptor α とこれらの標的遺伝子である *Cyp2b10* や *Cyp4a10* の発現量が亢進していること、3) 高脂肪食摂取により作製した食餌性肥満マウスの肝では、*Cyp3a* の発現レベルが低下していることなどを見出している。

以上のことから、エネルギー代謝と薬物代謝の調節機構が、核内受容体やその他の転写因子を介して、機能的に関連しているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、エネルギー代謝と薬物代謝の転写因子レベルでのクロストークを明らかにするために、1) 薬物応答性の核内受容体 CAR および PXR の脂質・糖質代謝調節における役割の解明、2) 脂質レベルの変動に伴う薬物代謝酵素発現変動機構の解明を目的とした。本研究成果により、これまでは生体内からの異物除去に関わる転写調節因子として考えられていた CAR および PXR の新たな生理機能が明らかとなると考えられた。また、脂質代謝変動に伴う薬物代謝酵素の発現変動機構の解明は、肥満や糖尿病といった脂質代謝異常症患者におけるより効果的な薬物療法の実践にもつながるのではないかと考えられた。

3. 研究の方法

1) CAR による脂質・糖質代謝関連遺伝子の発現調節

マウス肝 mRNA レベルの測定

野生型マウスあるいは CAR 欠損マウスに 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) を 3 mg/kg で 2 日間腹腔内投与した。対照には未処理マウスを用いた。これらマウスの肝臓より、総 RNA を抽出し、逆転写 PCR 法により mRNA レベルを測定した。

レポーターアッセイ

マウスあるいはヒトゲノム DNA を鋳型として PCR により種々の長さの DHCR24 遺伝子プロモーター領域を増幅して、これらをルシフェラーゼレポーターベクター-pGL3 に挿入し、レ

ポーターコンストラクトを作製した。ヒト CAR およびヒト PXR 発現プラスミドは PCR により増幅した両 cDNA を哺乳細胞発現ベクター pTarget に挿入することにより得た。これらを、phRL-TK と共にリン酸カルシウム法により HepG2 細胞に導入した。12 時間後に、溶媒 (0.1% DMSO)、0.5 μ M 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazole-5-carbaldehyde *o*-(3,4-dichlorobenzyl) oxime (CITCO) または 10 μ M リファンピシンを含む培地に交換し、さらに 24 時間培養した。その後細胞抽出液を調製し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステムによりレポーター活性を測定した。

2) 脂質レベルの変動に伴う薬物代謝酵素の発現変動機構

食餌成分の影響

9 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに、対照食 (CE-2 または高コーンスターチ食 (HCS diet))、高スクロース食 (HS diet) または 2% コレステロールを含む HCS diet を 8 日間与えた。肝ミクロソームを調製し、抗 CYP3A4 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

レポーターアッセイ

マウスゲノム DNA を鋳型として PCR により種々の長さの *Cyp3a11* 遺伝子プロモーター領域を増幅し、これをルシフェラーゼレポーターベクター-pGL4 に挿入し、レポーターコンストラクトを作製した。ヒト sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) 発現プラスミドは、PCR により増幅した cDNA を pTarget に挿入することにより得た。これらを、pSV- β -galactosidase と共にリン酸カルシウム法により HepG2 細胞に導入した。8 時間後に培地を交換し、さらに 40 時間培養した。その後細胞抽出液を調製してレポーター活性を測定した。

ゲルシフトアッセイ

ヒト hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) あるいはヒト SREBP2 の cDNA を pTNT ベクターに挿入し、これらを用いて *in vitro* 転写・翻訳を行い、両タンパク質を得た。これらと ³²P 標識したプローブ DNA を反応させ、ポリアクリルアミドゲルにより複合体を分離した。その後、放射活性を FLA-3000 イメージアナライザーにより検出した。

4. 研究成果

1) CAR による脂質・糖質代謝関連遺伝子の発現調節

野生型マウスおよび CAR 欠損マウスに TCPOBOP を投与し、コレステロール合成に関

わる遺伝子の肝 mRNA レベルを測定した (Fig. 1)。その結果、HMG-CoA 合成酵素 1 (HMGCS1)、HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR)、スクワレンエポキシダーゼ (SQLE) および 24-デヒドロコレステロール還元酵素 (DHCR24) の mRNA レベルは TCPOBOP の投与により増加した。またその増加の割合は野生型マウスに比べて CAR 欠損マウスで低かった。これらのことから、これら遺伝子の発現が CAR により調節されている可能性が示された。

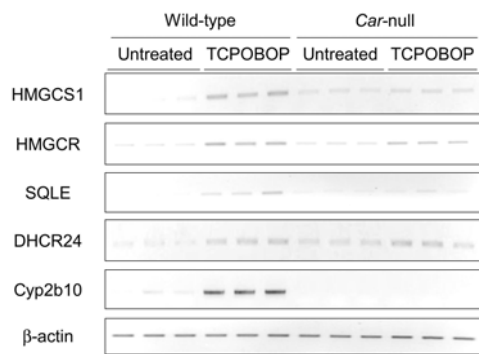


Fig. 1. Changes in hepatic mRNA levels in wild-type and Car-null mice after TCPOBOP-treatment.

本研究では、これら遺伝子のうち、コレステロール合成の最終反応を触媒し、発現調節機構が不明である DHCR24 に着目し、その CAR による転写調節機構の解析を進めた。

まず、ヒトおよびマウスの DHCR24 遺伝子のプロモーター領域約 4 kb を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを作製し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いてレポーターアッセイを行なった (Fig. 2)。その結果、ヒトおよびマウスのいずれのコンストラクトにおいても、ヒト CAR を共発現し、ヒト CAR 活性化物質 CITCO を処理すると、レポーター活性は 1.5~2 倍に増加した。これらの結果より、ヒトとマウスの DHCR24 遺伝子は CAR により転写活性化されることが示唆された。

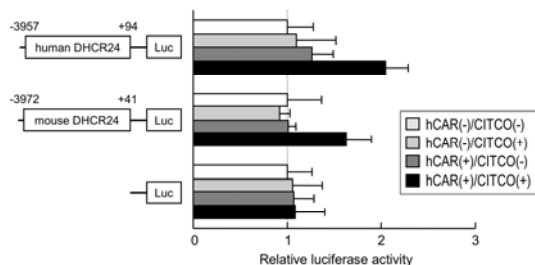


Fig. 2. CAR-mediated transactivation of reporter gene expression derived from human and mouse DHCR24 gene promoters.
The relative reporter activities in the control group (open bar) for each construct are set at 1. Data are the mean \pm S.D. (n = 4). Luc, luciferase; hCAR, human CAR.

そこでさらに、ヒト DHCR24 遺伝子について、プロモーター領域を段階的に欠失したコンストラクトを作製してレポーターアッセイを行い、CAR 応答領域の同定を行なった (Fig. 3)。その結果、CAR は-1532 から-1445

の領域を介してヒト DHCR24 遺伝子の転写を活性化することが示された。この領域には複数の核内受容体結合モチーフが認められたことから、現在 CAR 結合配列の同定を進めている。

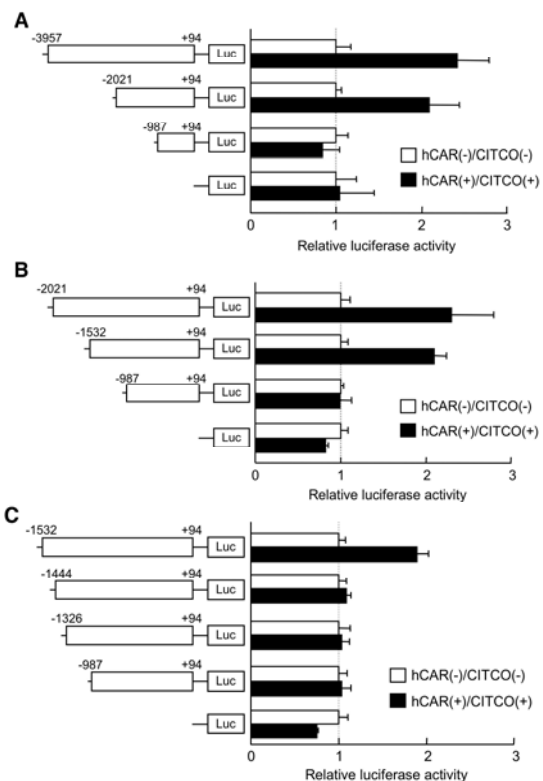


Fig. 3. Identification of a CAR-responsive element in human DHCR24 gene promoter.
The relative reporter activities in the control group (open bars) for each construct are set at 1. Data are the mean \pm S.D. (n = 4). Luc, luciferase; hCAR, human CAR.

本研究ではさらに、ヒト DHCR24 遺伝子が PXR による転写調節を受けるか否かについて、レポーターアッセイにより解析した (Fig. 4)。その結果、ヒト DHCR24 遺伝子はヒト CAR だけでなく、ヒト PXR によっても転写活性化される可能性が示された。

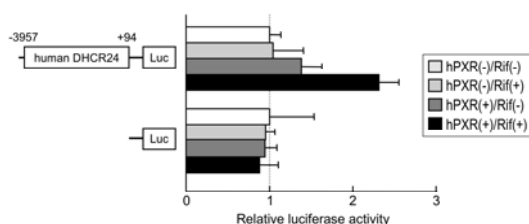


Fig. 4. PXR-mediated transactivation of human DHCR24 reporter gene expression.
The relative reporter activities in the empty vector-transfected/vehicle-treated group for each construct are set at 1. Data are the mean \pm S.D. (n = 4).

以上の結果より、マウス肝において、コレステロール合成に関わる複数の遺伝子の発現が CAR により調節されている可能性があること、またヒト DHCR24 遺伝子は CAR や PXR により転写活性化されることが明らかとなった。

2) 脂質レベルの変動に伴う薬物代謝酵素の発現変動機構

研究代表者は、高スクロース・高脂肪食の摂取によりマウス肝 Cyp3a11 レベルが低下することを報告している。この低下機構を明らかにするため、まず、食餌中のスクロースの影響を調べた。マウスに、スクロースを 65% 含む飼料 (HS diet)、あるいは対照としてスクロースの代わりに 50% コーンスターチと 15% マルトデキストリンを含む飼料 (HCS diet) または CE-2 を 8 日間摂取させ、肝の Cyp3a11 レベルを測定した (Fig. 5A)。その結果、HS diet と HCS diet のいずれを摂取させた場合にも、CE-2 を摂取させた場合に比べて Cyp3a11 タンパク質レベルは低下した。また Cyp3a11 mRNA レベルも同様の傾向を示した (データ示さず)。これらの結果より、高スクロース・高脂肪食の摂取で認められた Cyp3a11 レベルの低下は、飼料中のスクロース含量とは関連していないことが示唆された。

これまで用いてきた高スクロース・高脂肪食、HS diet ならびに HCS diet のコレステロール含量は、CE-2 (約 0.1%) の約 1/6 から 1/25 である。そこで次に、飼料中のコレステロール含量と Cyp3a11 レベルの関連を解析するため、マウスに CE-2、HCS diet または 2% コレステロールを含む HCS diet を 8 日間摂取させ、Cyp3a11 レベルを測定した (Fig. 5B)。その結果、コレステロールを添加した HCS diet を与えたマウスの肝 Cyp3a11 タンパク質レベルは、CE-2 を与えた場合と同程度であった。また、Cyp3a11 mRNA レベルも同様の傾向を示した (データ示さず)。以上の結果より、飼料中のコレステロールの欠乏は、肝 Cyp3a11 発現レベルを低下させることが示唆された。

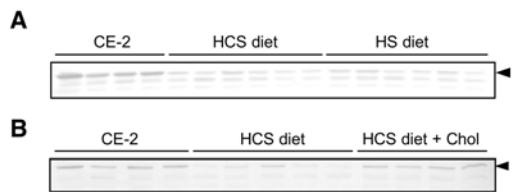


Fig. 5. Influence of dietary intake of sucrose and cholesterol on Cyp3a protein levels in mouse livers. Western blotting were performed with liver microsomes. Arrowheads indicate bands corresponding to Cyp3a11. Chol, cholesterol.

コレステロールの欠乏により活性化される転写因子 SREBP2 は、HNF-4 などの核内受容体の転写活性を抑制することが報告されている。そこで本研究では、Cyp3a11 発現に対する SREBP2 の影響を *in vitro* レポーターアッセイにより解析した。Cyp3a11 のプロモ-

ーター領域 3.4 kb を含むレポーターコンストラクト (pGL4-3a11-3.4k) とヒト SREBP2 発現プラスミドを HepG2 細胞に同時に導入したところ、レポーター活性は SREBP2 発現プラスミドの導入量依存的に低下した (Fig. 6)。このことから、SREBP2 は Cyp3a11 の発現を負に調節する可能性が示された。

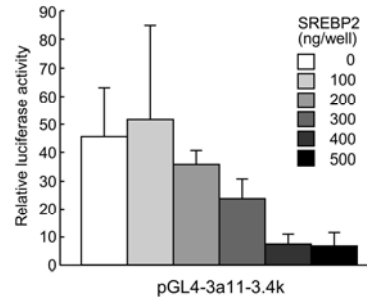


Fig. 6. Influence of SREBP2 expression on Cyp3a11 reporter activity.

Luciferase activities were normalized with β -galactosidase activities and are shown as ratio to those in the cells transfected with pGL4-basic and each amount of SREBP2 expression plasmid. Data are the mean \pm S.D. (n = 4).

そこで次に、プロモーター領域を段階的に欠失したレポーターコンストラクトを作製し、SREBP2 応答領域の同定を試みた (Fig. 7)。その結果、-1725 から -1524 の領域を欠失すると SREBP2 による Cyp3a11 レポーター活性の抑制が認められなくなった。したがって、SREBP2 はこの領域を介して、Cyp3a11 の発現抑制効果を発揮すると考えられた。

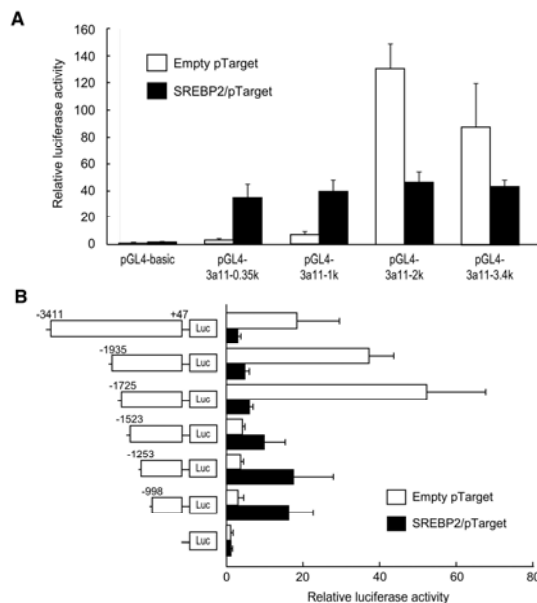


Fig. 7. Identification of a region responsible for the SREBP2-induced downregulation in the Cyp3a11 promoter. Luciferase activities were normalized with β -galactosidase activities and are shown as ratio to those in the cells transfected with pGL4-basic and empty pTarget. Data are the mean \pm S.D. (n = 4).

TESS (Transcription Element Search System) を利用してこの領域に結合しうる転写因子を検索したところ、-1568 から -1580 に存在する direct repeat separated by 1 nucleotide (DR1) タイプの核内受容体結合

モチーフに HNF-4 が結合する可能性が見出された。そこで、実際にこの領域をプローブとしてゲルシフトアッセイを行なったところ、この DR1 にヒト HNF-4 α が結合することが示された (Fig. 8)。一方、ヒト SREBP2 はこの配列には結合しなかった (データ示さず)。

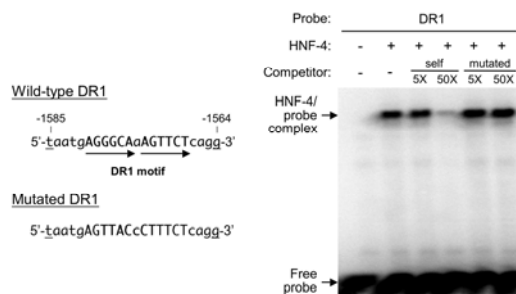


Fig. 8. Binding of HNF-4 α to the DR1 motif in the *Cyp3a11* promoter. Gel shift assays were performed with 32 P-labeled DR1 probe in combination with wild-type DR1 (self) or mutated DR1 (mutated) as competitors at the indicated amount.

前述のように SREBP2 は HNF-4 の転写活性を抑制することが報告されている。そこで次に、SREBP2 依存的な *Cyp3a11* レポーター活性抑制における DR1 モチーフの重要性を調べるため、DR1 に変異を導入したレポーターコンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行なった (Fig. 9)。その結果、DR1 への変異導入により、構成的なレポーター活性は低下し、また SREBP2 依存的なレポーター活性の抑制は認められなくなった。

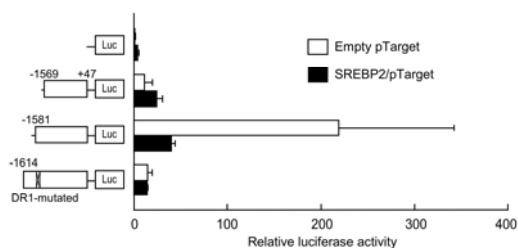


Fig. 9. Influence of a mutation of the DR1 motif on the SREBP2-dependent suppression of *Cyp3a11* promoter activity. Relative reporter activities are shown as Fig. 7. Data are the mean \pm S.D. (n = 4).

以上の結果より、*Cyp3a11* 遺伝子は、-1568 から -1580 に存在する DR1 を介して HNF-4 α により転写活性化されること、コレステロール欠乏により活性化される転写因子 SREBP2 は、この HNF-4 α による転写を阻害することで *Cyp3a11* の発現を抑制する可能性があることが示された。今後は、*Cyp3a11* 遺伝子プロモーター上における SREBP2 と HNF-4 の相互作用について、より詳細な解析を行なうとともに、この SREBP2 依存的な *Cyp3a11* 遺伝子の転写抑制と、コレステロール欠乏飼料の摂取で認められるマウス肝 *Cyp3a11* 発現レベルの低下との関連について解析する必要がある。

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 9 件)

(1) T. Toriyabe, K. Nagata, T. Takada, Y. Aratsu, T. Matsubara, K. Yoshinari, and Y. Yamazoe: Unveiling a new essential cis-element for the transactivation of the CYP3A4 gene by xenobiotics. *Mol Pharmacol*, 75, 677-684 (2009) 査読有

(2) M. Ohbuchi, M. Miyata, D. Nagai, M. Shimada, K. Yoshinari, and Y. Yamazoe: Role of enzymatic N-hydroxylation and reduction in flutamide metabolite-induced liver toxicity. *Drug Metab Dispos*, 37, 97-105 (2009) 査読有

(3) M. Nomoto, M. Miyata, S. Yin, Y. Kurata, M. Shimada, K. Yoshinari, F. J. Gonzalez, K. Suzuki, S. Shibasaki, T. Kurosawa, and Y. Yamazoe: Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull*, 32, 172-178 (2008) 査読有

(4) L. Senggunprai, K. Yoshinari, M. Shimada, and Y. Yamazoe: Involvement of ST1B subfamily of cytosolic sulfotransferase in kynurenine metabolism to form natriuretic xanthurenic acid sulfate. *J Pharmacol Exp Ther*, 327, 789-798 (2008) 査読有

(5) T. Matsubara, K. Yoshinari, K. Aoyama, M. Sugawara, Y. Sekiya, K. Nagata, and Y. Yamazoe: Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos*, 36, 2058-2063 (2008) 査読有

(6) K. Yoshinari, R. Ueda, K. Kusano, T. Yoshimura, K. Nagata, and Y. Yamazoe: Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem Pharmacol*, 76, 139-145 (2008) 査読有

(7) M. Nomoto, M. Miyata, M. Shimada, K. Yoshinari, F. J. Gonzalez, S. Shibasaki, T. Kurosawa, Y. Shindo, and Y. Yamazoe: ME3738 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity, which is associated with enhancement of biliary bile acid and cholesterol output. *Eur J Pharmacol*, 574, 192-200 (2007) 査読有

(8) Y. Kamiyama, T. Matsubara, K. Yoshinari, K. Nagata, H. Kamimura, and Y. Yamazoe: Role of human hepatocyte nuclear factor 4a in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 287-298 (2007) 査読有

(9) T. Matsubara, W. Noracharttiyapot, T. Toriyabe, K. Yoshinari, K. Nagata, and Y. Yamazoe: Assessment of human pregnane X receptor-involvement in pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos*, 35, 728-733 (2007) 査読有

〔学会発表〕 (計6件)

国内学会

(1) 吉成浩一:薬物応答性核内受容体と医薬品副作用、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

(2) 松原勤、吉成浩一、青山和誠、菅原実香、関谷裕次、永田清、山添康:リトコール酸によるCYP3A誘導におけるビタミンD受容体の役割. 第23回日本薬物動態学会年会、2008年10月31日、熊本

(3) 鳥谷部貴祥、高田智成、荒津佑輔、松原勤、吉成浩一、永田清、山添康:外来異物によるCYP3A4遺伝子の転写活性化に必須な新規シスエレメント. 第23回日本薬物動態学会年会、2008年10月31日、熊本

(4) 依田典朗、吉成浩一、山添康:CARによるヒトCYP1A1およびCYP1A2遺伝子の転写活性化. 第23回日本薬物動態学会年会、2008年10月30日、熊本

国際学会

(5) Tsutomu Matsubara, Kouichi Yoshinari, Kazunobu Aoyama, Mika Sugawara, Yuji Sekiya, Kiyoshi Nagata, Yasushi Yamazoe: Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction. ISSX 15th North American Regional Meeting, 2008.10.13-15, San Diego, USA.

(6) 菅原実香、吉成浩一、山添康:食餌中の糖・脂質レベルが肝チトクロムP450発現レベルに及ぼす影響、日本薬学会第128年会、2008年3月26日、横浜

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉成 浩一 (YOSHINARI KOUICHI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号:60343399

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書