

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07226

研究課題名（和文）ヒト腸管におけるCYP3A4誘導の分子機序及び肝臓との異同の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of CYP3A4 induction in the human intestine and its differences from the liver

研究代表者

保坂 卓臣（Hosaka, Takuomi）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30611579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓と並び重要な薬物代謝器官である小腸でのCYP3A4誘導機序の解明は、薬物間相互作用の回避に有益な知見を与え、医薬品開発に貢献すると考えられる。本研究では、ヒト肝臓由来細胞とヒト腸管由来細胞での種々薬物によるCYP3A4酵素誘導作用の異同を明らかにし、腸管独自の酵素誘導機序を解明することを目的とした。

研究の結果、ヒト腸管では肝臓と異なる機序でCYP3A4誘導が起こる可能性が示された。また、核内受容体PPARが腸管特異的なCYP3A4誘導の新規制御因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物代謝酵素誘導を介した薬物間相互作用を回避するため、ヒト肝細胞を用いた医薬品候補化合物の酵素誘導評価が創薬過程で広く行われている。一方、小腸は肝臓と並び主要な薬物代謝器官であるが、小腸での酵素誘導機序は不明であること、ヒト小腸細胞の入手が困難なことなどの理由から、小腸での酵素誘導は肝と同様とみなされ、小腸での誘導評価は行われていない。しかし、本研究の結果、両器官における酵素誘導機序が異なる可能性が高いことが示された。これは従来のヒト肝細胞を用いた酵素誘導評価だけでは薬物間相互作用リスクの評価には不十分であり、インビトロ及びインビボでの小腸における酵素誘導評価が必要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）： Elucidation of the CYP3A4 induction mechanism in the small intestine, which is an important drug-metabolizing organ as well as the liver, will provide useful findings for avoiding drug-drug interactions and will contribute to drug development. The purpose of this study was to clarify the difference in CYP3A4 enzyme-inducing action between human liver-derived cells and human intestine-derived cells by various drugs, and to elucidate the enzyme induction mechanism unique to the intestine.

The results of this study suggest that CYP3A4 induction occurs in the human intestine by mechanisms different from those of the liver. It was also suggested that the nuclear receptor PPAR is a novel regulator of intestine-specific CYP3A4 induction.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：肝臓 腸管 薬物代謝酵素 酵素誘導 臓器差 核内受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物間相互作用の回避は、医薬品の開発や使用において非常に重要な課題である。多くの薬物は経口で投与され、小腸で吸収された後に肝臓を経て全身循環に至る。小腸と肝臓には薬物代謝酵素が高発現しており、両器官における薬物代謝が薬物の全身曝露量、すなわち薬効及び毒性・副作用発現に大きく影響する。薬物間相互作用の主要な原因の1つは、薬物の服用により薬物代謝酵素の含量が増える「酵素誘導」である。酵素誘導が起こると、その酵素の基質となる薬物の代謝が促進され、その薬効は減弱する。

薬物間相互作用の回避に向け、酵素誘導の機序解析や酵素誘導評価系の開発が進んだ結果、現在では肝細胞における酵素誘導の分子機序の概要が解明され、ヒト肝細胞を用いた酵素誘導評価が創薬過程において広く行われるようになった。これら研究の発展には、ヒト肝細胞の単離培養法の確立、ヒト肝細胞の市販化（入手の容易化）が大きく寄与している。

主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の肝での誘導は、主に異物応答性核内受容体の PXR 及び CAR を介することが知られている。抗結核薬リファンピシンはヒト PXR の強力なアゴニストであり、ヒト肝で強く CYP3A4 を誘導する。臨床研究によりリファンピシンはヒト小腸の CYP3A4 も誘導することが示されているが、肝臓で酵素誘導を引き起こす他の薬物が小腸でも同様に誘導作用を示すか否かは全く調べられていない。このように科学的根拠は乏しいにもかかわらず、小腸における酵素誘導の機序や強度は肝と同様とみなされ、初代培養ヒト小腸細胞が入手困難なこともあり、創薬過程において小腸の酵素誘導評価は全く行われていない。日米欧当局が発出している薬物間相互作用ガイドラインでも「必要に応じて小腸における薬物間相互作用について検討することが望ましい」と曖昧な記載となっている。

しかし、ヒトの肝臓と小腸における酵素誘導機序が異なるならば、従来のヒト肝細胞における酵素誘導評価だけでは薬物間相互作用リスクの評価には不十分であり、インビトロ及びインビボでの小腸における酵素誘導評価が必要となると考えられる。

2. 研究の目的

肝での CYP3A4 誘導には上述の PXR 及び CAR に加えて、PPAR α 、LXR α 、VDR(ビタミン D 受容体)、GR(グルココルチコイド受容体)等の様々な核内受容体が関与することが報告されているが、これらを介した誘導がヒト腸管でも起こるか否かは明らかではない。肝と腸管ではこれら核内受容体等の転写調節因子並びに薬物代謝酵素の発現パターンは異なることから、両器官での酵素誘導機序はむしろ異なるのではないかという仮説を考えた。

そこで本研究では、ヒト肝臓由来細胞とヒト腸管由来細胞での種々薬物による CYP3A4 酵素誘導作用の異同を明らかにし、腸管独自の酵素誘導機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定量的逆転写 PCR 法

培養細胞を各種薬物で 48 時間処置後、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega 社) を用いて total RNA を抽出し、260 nm の吸光度を基に RNA 濃度を算出した。その後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて total RNA を鋳型とした逆転写反応を行い、cDNA 溶液を作製した。続いて Gotaq qPCR Master Mix (Promega 社) および各種プライマーを用いて cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR を行った。リファレンス遺伝子として 18S rRNA を用いた。

(2) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて培養細胞に各種レポータープラスミドをトランスフェクション後、各種薬物で 48 時間処置した。Passive Lysis Buffer (Promega 社) を用いて細胞溶解液を調製し、そのレポーター活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いて測定した。トランスフェクション効率補正用の *Renilla* ルシフェラーゼレポータープラスミドとして pGL4.74[hRluc/TK] を使用した (Promega 社)。

4. 研究成果

(1) ヒト肝臓と腸管における CYP3A4 誘導機序に差異があるか否かを明らかにするため、種々薬物による CYP3A4 誘導パターンを両器官由来の培養細胞で比較した。ヒト肝細胞様細胞株 HepaRG 細胞およびヒト結腸腺癌由来 LS180 細胞をそれぞれ肝臓および小腸モデルとして選択した。ヒト凍結肝細胞において CYP3A4 誘導が報告されている 14 種の薬物を両細胞に 48 時間処置し、定量的逆転写 PCR 法により CYP3A4 mRNA レベルを測定した。その結果、各薬物の CYP3A4 誘導能の順列は HepaRG 細胞と LS180 細胞間で大きく異なり、薬物処置群の誘導倍率に相関は認められなかった。特に、核内受容体 PPAR γ のアゴニストであり、糖尿病治療に用いられる rosiglitazone および pioglitazone (ともに 30 μ M で処置) は、代表的なヒト PXR リガンドである rifampicin (10 μ M) を顕著に上回る CYP3A4 誘導作用を LS180 細胞においてのみ示した (図 1)。

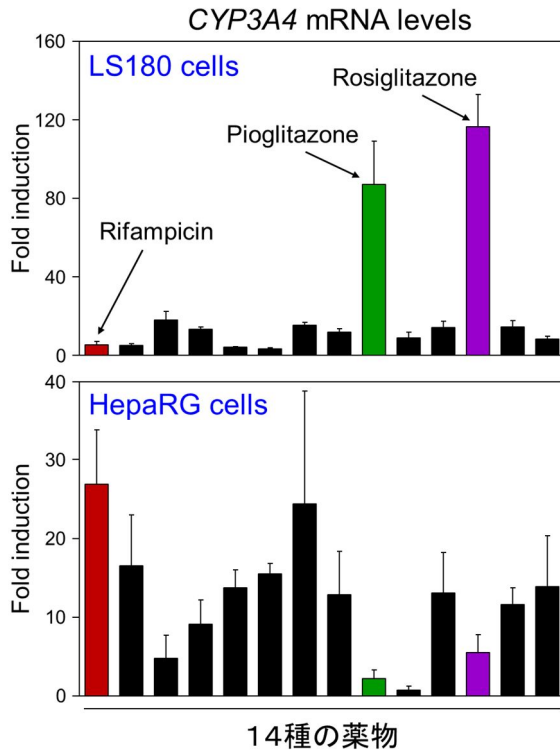


図1. LS180細胞とHepaRG細胞での種々薬物によるCYP3A4誘導プロファイルの比較

PPAR γ アンタゴニスト SR16832、もしくは、PPAR γ および PXR 標的 siRNA を用いた解析を行ったところ、30 μ M rosiglitazone による CYP3A4 の誘導は、SR16832 の前処置、並びに siRNA による PPAR γ または PXR のノックダウンによりいずれも部分的に抑制された。

(5) 高濃度 rosiglitazone による著しく強い CYP3A4 誘導は PPAR γ と PXR を同時に活性化することによるものかを明らかにするために、0.1 μ M rosiglitazone と rifampicin の共処置を行ったところ、相乗的な CYP3A4 mRNA レベルの増加が認められ、その強さは 30 μ M rosiglitazone 処置群に匹敵した。

(6) ChIP-Seq のデータベースを検索したところ、ヒト腸管由来 HT-29 細胞での抗 PPAR γ 抗体を用いた ChIP-Seq データが見つかったため、CYP3A4 遺伝子周辺のピークを調べた。その結果、遺伝子下流にピークを発見し、この配列 (約 500 bp) が CYP3A4 エンハンサーとして機能するか否かをレポーターアッセイにて調べた。CYP3A4 近位プロモーターと既知の遠位エンハンサー (PXR 応答配列を含む) を Firefly ルシフェラーゼ遺伝子上流に組込んだレポータープラスミド (p3A4) を用いた場合は、低濃度 rosiglitazone による LS180 細胞でのレポーター活性増加は全く認められなかったが、上述の配列を p3A4 のルシフェラーゼ遺伝子下流に組込んだレポータープラスミドを用いた場合は有意な活性増加が認められた。転写因子結合サイトの予測データベースを用いてこの配列内の PPAR γ 応答配列を検索したところ、3 か所が候補として見つかったため、3 か所全てを欠損させたレポータープラスミドを作製してアッセイを行った。その結果、この変異により低濃度 rosiglitazone によるレポーター活性の増加は完全に消失した。これより、LS180 細胞での rosiglitazone による CYP3A4 誘導に寄与すると考えられる PPAR γ 応答配列を CYP3A4 遺伝子下流に見出すことに成功した。

以上、本研究の結果、ヒト腸管では肝臓と異なる機序で CYP3A4 誘導が起こる可能性が示された。また、LS180 細胞での rosiglitazone による著しく強い CYP3A4 誘導は PPAR γ と PXR 両受容体の活性化を介して起こることが示され、PPAR γ が腸管特異的な CYP3A4 誘導の新規制御因子であることが示唆された。本研究成果はヒト腸管における CYP3A4 誘導機序の全容解明及び CYP3A4 誘導評価系の確立に役立つと考えられる。

(2) rosiglitazone は核内受容体 PPAR γ のアゴニストであるが、PXR 活性化作用も有することが示唆されている。そこで rosiglitazone が各受容体を活性化する濃度を明らかにするため、Firefly ルシフェラーゼ遺伝子上流に PXR または PPAR γ 応答配列を含むプラスミドを用いてレポーターアッセイを行った。その結果、0.3 μ M 以下の rosiglitazone 処置では PPAR γ のみが活性化され、1 μ M 以上では PPAR γ と PXR の両方が活性化された。

(3) PPAR γ のみを活性化する濃度、及び PPAR γ 及び PXR の両方を活性化する濃度における LS180 細胞での CYP3A4 誘導作用を比較するため、CYP3A4 mRNA レベルを定量的逆転写 PCR 法で測定した。その結果、rifampicin 処置群と比較して CYP3A4 の mRNA レベルは 0.1 μ M rosiglitazone 処置群では低く、30 μ M rosiglitazone 処置群では著しく高かった。この傾向は rosiglitazone とは化学構造が全く異なる PPAR γ アゴニストの GW1929 を処置した場合においても同様であった。

(4) rosiglitazone による CYP3A4 誘導における PPAR γ 及び PXR の寄与を明らかにするため、

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西口輝、志津怜太、保坂卓臣、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 リガンド依存的なタンパク質構造変化に着目したPXR活性化評価系の構築
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志津怜太、石村麻衣、信澤純人、保坂卓臣、佐々木崇光、柿崎暁、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質によるPXR活性化のマウス肝発がんへの影響解析
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木貴章、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 ヒト腸管由来細胞でのrosiglitazoneによるCYP3A4誘導機序の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝山早苗、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 ヒト肝細胞におけるCYP3A4の構成的発現に対する転写因子TFE3の寄与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦佳恵、志津怜太、佐藤拓海、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 非遺伝毒性肝がんを誘発する化学物質の核内受容体活性化作用
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉成浩一、志津怜太、石村麻衣、信澤純人、保坂卓臣、佐々木崇光、柿崎暁
2. 発表標題 核内受容体PXRの肝がんプロモーション作用の解析
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志津怜太、西口輝、田代紗莉依、佐藤拓海、菅原彩加、保坂卓臣、菅野裕一朗、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 PXR活性化評価系構築のための、リガンド依存的に構造変化し活性化するPXR変異体の作製
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓海、志津怜太、馬場遼之介、石村麻衣、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 核内受容体PXRによる肝がん進行抑制機序の解析
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊豆倉裕翔、保坂卓臣、森田華帆、志津怜太、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 肝のCYP3A4発現における肝星細胞の役割
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木貴章、保坂卓臣、鶴田聡志、志津怜太、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 ヒト腸管由来LS180細胞でのrosiglitazoneによるCYP3A4誘導機序の解析
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 保坂卓臣、勝山早苗、志津怜太、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 転写因子TFE3を介したヒト肝細胞におけるCYP3A4の転写調節
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	志津 怜太 (Shizu Ryota) (50803912)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐々木 崇光 (Sasaki Takamitsu) (20382674)	静岡県立大学・薬学部・客員共同研究員 (23803)	
研究分担者	吉成 浩一 (Kouichi Yoshinari) (60343399)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関