

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33919

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23810

研究課題名(和文) Wntシグナル経路を介した薬物代謝酵素の変動が精神神経疾患治療に与える影響の解明

研究課題名(英文) Wnt/beta-catenin signaling pathway regulates the expression of drug metabolizing enzyme

研究代表者

榊原 有季子 (Sakakibara, Yukiko)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40848503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt/ β -catenin経路を活性化する薬物をHuh-7細胞に曝露し、UGT mRNAの発現変動を検討した。さらに、mRNA発現が増加したUGT分子種に対し、 β -catenin経路を抑制するスリダクを共曝露しその影響を検討した。LiClの曝露により、UGT1A4は6.4倍、UGT1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7では2.5～3.3倍に発現量が増加し、スリダクの共曝露により、LiClによるUGT1A6の発現増加は37%、UGT2B7では58%有意に減少した。以上の結果から、UGTの発現調節に対するWnt/ β -catenin経路の関与と分子種による差異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化医療の実現のために、薬物の作用に影響する要因の解明は社会的意義が大きい。その要因の一つに、薬物代謝能の変動がある。本研究では、精神神経疾患の治療薬や、セロトニンやドーパミンなどの神経伝達物質の代謝に関与するUDP-glucuronosyltransferase (UGT) の発現変動の新たなメカニズムとして、Wnt/ β -catenin経路の関与を明らかにした。この知見は、精神神経疾患における治療薬の開発ならびに薬物治療の戦略に重要な知見を付与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The expression of the drug metabolizing enzymes is regulated by ligand-activated transcriptional factors. The purpose of the present study was to elucidate whether the expressions of UDP-glucuronosyltransferase isoforms are regulated by Wnt/ β -catenin pathway, which is involved in embryonic development and tissue homeostasis.

Huh-7 cells were treated by 30 mM LiCl, that promotes transcriptional activation of target genes by β -catenin signaling pathway. Consequently, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7 mRNAs were increased by 2.5-, 6.4-, 2.8-, 3.3-, and 2.8-fold, respectively, following LiCl exposure for 72 hr in Huh-7 cells. Moreover, sulindac, which is known to suppress the expression of β -catenin, was exposed to Huh-7 cells with LiCl. As a result, the induction rates of UGT1A6 and UGT2B7 mRNAs were decreased by 1.8- and 1.2-fold, respectively. These results suggested that the expression of UGT1A6 and UGT2B7 mRNAs are regulated by Wnt/ β -catenin pathway in Huh-7 cells.

研究分野：薬物代謝

キーワード：薬物代謝酵素 Wnt/ β -catenin経路 UDP-グルクロン酸転移酵素 精神神経疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個別化医療の実現のために、薬物の作用に影響する要因の解明は社会的意義が大きい。その要因の一つに、薬物代謝能の変動がある。薬物代謝酵素は、薬物の構造を変換し、薬理効果や体内からの消失を左右し、体内での薬物量を制御しているため、薬物代謝酵素の変動は、薬物の有効性や安全性に影響する。近年、薬物代謝酵素の変動メカニズムとして、Wnt/ β -catenin 経路の関与が注目されており、この経路を介したシトクロム P450(CYP)の発現変動が報告されている。CYPは酸化・還元・加水分解を担う第 I 相反応の主な薬物代謝酵素である。しかし、糖の付加などを担う第 II 相反応の主な薬物代謝酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) の発現変動と Wnt/ β -catenin との関連についての報告は皆無である。UGT は精神神経疾患の治療薬や、セロトニンやドーパミンなどの神経伝達物質の代謝に関与する。また、Wnt/ β -catenin 経路は、統合失調症や躁うつ病、パーキンソン病、アルツハイマー病等の精神神経疾患の発症や病状に関連することが報告されており、治療標的として新薬の開発や、ドラッグ・リポジショニングに向けた研究がなされている。したがって、Wnt/ β -catenin 経路を介した薬物代謝能の変動を解明することは、精神神経疾患における治療薬の開発ならびに薬物治療の戦略に重要な知見を付与すると考えられる。

2. 研究の目的

抱合酵素は、精神神経疾患の治療薬や神経伝達物質の代謝に関与するため、その変動はこれら薬物や神経伝達物質の量を変化させ、治療効果に影響を与える可能性がある。薬物代謝酵素の発現変動メカニズムの一つに、核内受容体を介した発現変動が挙げられるが、これによる併用薬物の治療効果の減弱は、臨床で広く認知されている。

Wnt/ β -catenin 経路は細胞の増殖や分化の制御を担っている。Wnt は初期発生や器官形成を制御する分泌性糖タンパク質である。Wnt/ β -catenin 経路の異常は、統合失調症や躁うつ病、アルツハイマー病等の精神神経疾患の発症と関連があるとされているため、本経路を治療標的とした新薬の開発に関する研究が多くなされている。近年、新たに Wnt/ β -catenin 経路を介した薬物代謝酵素の発現量の増加と、酵素活性の上昇が報告された(図 1)。したがって、Wnt/ β -catenin 経路を介して抱合酵素が変動した場合、体内での精神神経疾患の治療薬や神経伝達物質の量が変動し、薬物治療効果に影響を与える可能性がある。しかしながら、Wnt/ β -catenin 経路と薬物代謝酵素の発現変動に関する知見は不十分であり、さらなる知見の蓄積が必要である。本研究は、Wnt/ β -catenin 経路を介した薬物代謝酵素の発現変動を明らかにし、精神神経疾患の薬物治療の適正化に与える影響を解明することを目的とした。

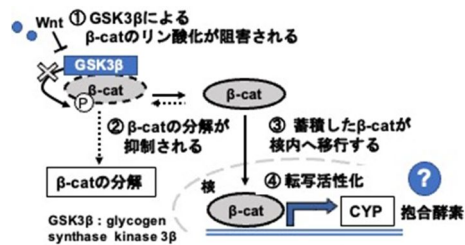


図1. Wnt/ β -cat 経路による標的遺伝子の発現増加

3. 研究の方法

(1) 細胞培養及び薬物曝露

ヒト肝がん由来 Huh7 細胞は、10% FBS、4 mM グルタミンを含む DMEM を使用し、ヒトヘパトサイトは BD Hepatocyte Culture Medium を使用し、5% CO₂ 下、37°C で培養した。細胞播種 24 時間後に、以下の薬物を曝露し、72 時間後に細胞を回収した。GSK3 β 阻害作用を有し、Wnt/ β -catenin 経路を促進する薬物として、CHIR-99021 (3 μ M)、LiCl (30 mM)、クロザピン (10 μ M)、ハロペリドール (20 μ M) を曝露した。さらに、 β -catenin の核内移行を抑制する薬物としてスリダク (0.5 mM) の共曝露を行った(図 2)。

(2) RNA 抽出およびリアルタイム PCR

薬物曝露後、回収した細胞より TRIreagent 試薬を用いて total RNA を抽出した。また、ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて得られた cDNA 溶液と、標的遺伝子と特異的なプライマー、SYBR Premix Ex TaqII を用いて、リアルタイム PCR 法により、UGT の mRNA 発現変動について検討した。なお、 β -catenin の代表的な標的遺伝子として LGR5 についても合わせて検討した。

(3) SDS-PAGE ウェスタンブロット法による核内 β -catenin タンパク質発現量の定量

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents を用いて核タンパク質を抽出した。ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride 膜に電氣的に転写した。その後、抗体を用いて核内における β -catenin のタンパク質発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) GSK3β 阻害作用を有する薬物による UGT mRNA の発現変動

HuH-7 細胞の UGT1A1 mRNA 発現量は、CHIR-99021 および LiCl の曝露により、それぞれ 14.3 倍、2.5 倍、UGT1A6 mRNA 発現量はそれぞれ 8.3 倍、2.8 倍に有意に増加した。また、β-catenin の標的遺伝子として知られている LGR5 mRNA 発現量はそれぞれ 5.9 倍、10.4 倍に有意に増加した。しかし、クロザピンやハロペリドールの曝露では、UGT1A1、UGT1A6、LGR5 mRNA 発現量の増加は認められなかった。一方、ヒトヘパトサイトへの LiCl 曝露では、UGT1A1 および UGT1A6 mRNA 発現量の有意な増加は認められず、LGR mRNA は検出限界以下であった。以上の結果から、GSK3β 阻害作用を有する薬物として、CHIR-99021 および HuH-7 細胞の UGT1A1 および UGT1A6 mRNA 発現量を増加させることが示された。しかし、ヒトヘパトサイトではこの増加が認められなかったことから、HuH-7 細胞とヒトヘパトサイトにおいて GSK3β 阻害薬は UGT1A 発現に異なる影響を及ぼす可能性が示された。

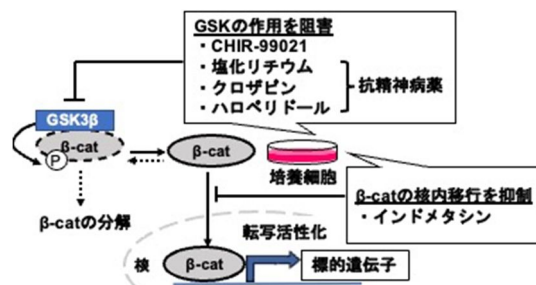


図2. 曝露薬物のWnt/β-catenin経路に対する作用点

(2) CHIR-99021 および LiCl による核内 β-catenin タンパク質発現量の変動

HuH-7 細胞の核内 β-catenin 核内発現量は CHIR-99021 曝露により 2.4 倍に有意に増加した。また LiCl 曝露群においても増加傾向が認められたことから、CHIR-99021 及び塩化リチウムの曝露により、核内での β-catenin タンパク質発現量が増加し、β-catenin 経路を介した標的遺伝子の活性化が生じている可能性が示された。

(3) スリンドク共曝露が UGT mRNA 発現変動に与える影響

HuH-7 細胞において LiCl の曝露により、mRNA 発現が増加した UGT 分子種に対し、スリンドクの共曝露による影響を検討した。スリンドクは β-catenin の核内移行を抑制することから、LiCl の曝露による UGT mRNA の発現増加に対し、β-catenin 経路を介した転写活性化が関与している場合、スリンドクの共曝露により β-catenin の核内移行が抑制され、UGT mRNA の発現増加が抑制される可能性がある。LiCl による UGT mRNA 発現量の増加に対する β-catenin 経路の関与を明らかにするため、スリンドクの共曝露が UGT mRNA 発現変動に与える影響について検討した。その結果、スリンドクの共曝露は LiCl 単独曝露時と比較して、LGR5 の mRNA 発現量を 81%、また UGT1A6 では 37%、UGT2B7 では 58% 有意に減少させ、UGT1A4 についても減少傾向であったが、UGT1A1 および UGT1A9 には影響を及ぼさなかった (図 3)。

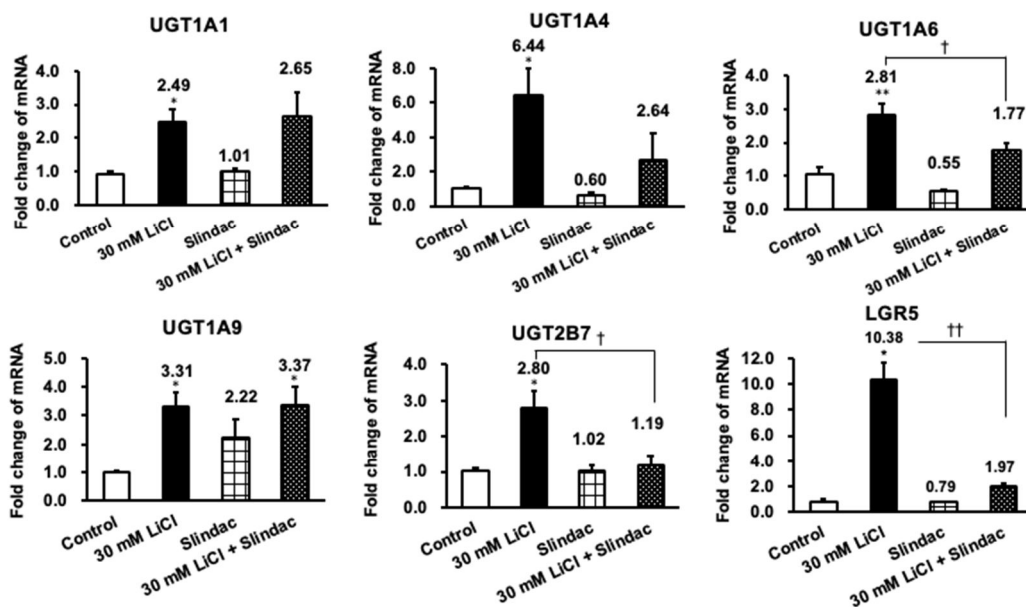


図3 Huh-7細胞におけるLiClおよびスリンドク曝露時のUGT分子種のmRNA変動

以上の結果から、UGT の発現調節に対する Wnt/β-catenin 経路の関与は分子種により異なるが、少なくとも UGT1A6 および UGT2B7 mRNA の発現調節に関与している可能性が示された。したがって、精神神経疾患発症時における Wnt/β-catenin 経路の変動や、その治療薬によって Wnt/β-catenin 経路が活性化した場合、これら UGT 分子種の発現変動により、神経伝達物質の量や治療薬の体内曝露量が変動し、治療効果に影響を与える可能性があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榊原有季子、加藤美紀、瀬井雅行
2. 発表標題 Wnt/ -catenin経路を介したUDP-glucuronosyltransferase mRNA発現変動
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 榊原有季子、加藤美紀、瀬井雅行
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase-3 阻害薬がUDP-グルクロン酸転移酵素1Aの発現に与える影響
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榊原有季子、加藤美紀、瀬井雅行
2. 発表標題 UDP-グルクロン酸転移酵素および硫酸転移酵素の発現調節に対するWnt/ -catenin経路の関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------