

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590170

研究課題名（和文） サイクリン依存性キナーゼによる肝薬物代謝酵素活性制御機構の解明

研究課題名（英文） Cyclin-dependent kinase 2 down-regulates expression of drug-metabolizing enzymes UGT1A1 and CYP3A4 through phosphorylation of nuclear receptor PXR

研究代表者

三輪 匡男 (MIWA MASAO)

静岡県立大学・薬学部・名誉教授

研究者番号：10046287

研究成果の概要（和文）：肝細胞増殖因子が内在性サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子の発現を亢進させるとともに、UGT1A1 の発現が CDK2 阻害剤 roscovitine 添加により顕著に増大することを見出した。Roscovitine は PXR の 350 番目セリンのリン酸化に関わる CDK2 の作用を抑制することにより UGT1A1 遺伝子転写を亢進させること、言い換えると、CDK2 による PXR の 350 番目セリンのリン酸化が RXR やコアクチベーターとの結合を低下させ、核内での転写調節抑制に働き、負の制御に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated how the expression of drug-metabolizing enzymes including UGT1A1 and CYP3A4 is regulated by cell signals associated with cell-cycle progression. While the active form of CDK2 (phospho-CDK2) peaked at 2 h and 4 h, respectively, and these levels dropped at 8 h, UGT1A1 and CYP2B6 were present at very low levels at 0 h to 6 h and started accumulating at 8 h. While CDK2 inhibitor roscovitine enhanced the expression of UGT1A1 and CYP3A4, it suppressed the expression of UGT1A1 and CYP3A4 in the cells transfected with S350D PXR. Phosphomimetic mutant at serine-350 of PXR was detected in the nuclei and lost the binding with RXR, and co-transfection with co-activator SRC-2 but not SRC-1 recovered PXR activity. These results indicate that roscovitine stimulated expression of UGT1A1 and CYP3A4 through inhibiting CDK2, which phosphorylated PXR at serine-350 to suppress the transactivation in the nuclei.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：(1) サイクリン依存性キナーゼ、(2) 薬物代謝酵素、(3) 転写調節、(4) 核内受容体、(5) シグナル伝達、(6) CDK 2、(7) 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

肝臓の主たる機能である異物代謝（解毒）に肝細胞中の薬物代謝酵素（CYP2B6, UGT1A1 など）が関わっているが、肝組織細胞の全てに等しく分布しておらず、中心静脈周辺部の細胞に高く、肝動脈枝・門脈枝周辺の細胞には発現が低いなど、生体異物の代謝・解毒・排泄に重要な役割を果たしているこれら薬物代謝酵素が同一組織細胞間で発現量に差があることが知られている。この酵素分布の差が細胞分化あるいは生育環境に依存した核内受容体の発現変動に起因することが考えられるが解明が遅れている。課題遂行者は、細胞の生育環境を整え同調培養した細胞では細胞周期 G1 期チェックポイントにおいて CAR mRNA ならびに蛋白質発現レベルが有意に増大し、CAR の発現増大と並行して薬物代謝酵素（CYP2B6, UGT1A1 など）や、p53 阻害作用を有する MDM2 の発現が増進することを明らかにしている。このように細胞周期に依存して薬物代謝酵素の発現変動が認められたことから、サイクリン依存性キナーゼ CDK の種々の阻害剤の影響を解析したところ、CDK2 阻害剤 roscovitine が核内受容体 CAR の発現を増進させ、強力な薬物代謝酵素誘導作用を有していることを見いだしている。CDK4 をノックダウンすると CAR や薬物代謝酵素の発現が抑制されるが、CDK2 siRNA をトランスフェクトし、ノックダウンした HepG2 細胞では薬物代謝酵素発現量が増大することを明らかにしている。

2. 研究の目的

HepG2 細胞、SW480 細胞などのがん細胞を用いて、細胞分化・増殖時の細胞周期制御メカニズムの研究を進める過程で、肝細胞や HuH6 細胞などのがん細胞に作用させると増殖促進因子として作用するが、HepG2 細胞には増殖抑制因子として作用する肝細胞増殖因子や、細胞周期制御因子（サイクリン依存性キナーゼ CDK）の阻害剤が薬物代謝酵素（CYP2B6、UGT1A1 など）の発現を増進することを見出した。また CDK2 をノックダウンした肝細胞では CYP2B6、UGT1A1 などの薬物代謝酵素の発現量が増大することを初めて明らかにしている。本研究では、これまでに得た知見を基に、細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現調節機序を核内受容体の活性化機序ならびに発現変動に焦点を合わせ解明することを目的とした。HGF による薬物代謝酵素発現誘導機序の分子レベルの解明を進め、細胞周期制御機能を有する cdk が薬物代謝酵素遺伝子転写を調節する核内受容体 CAR や PXR の発現を制御している可能性について、また細胞質から核内へ移行する過程、核内で DNA に結合する段階での活性化を CDK が抑制し薬物代謝酵素遺伝子の転写を抑制している可能性に焦点を当て解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現調節機序の解析 HGF による UGT1A1 mRNA 発現誘導を指標として各種阻害剤の作用を検討し、UGT1A1 発現

調節に関わるシグナル伝達経路をリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

(2) サイクリン依存性キナーゼ阻害剤による UGT1A1 発現誘導機序の解析 各種阻害剤を用いて UGT1A1 発現調節に関わる因子の同定をリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

(3) UGT1A1 発現調節に関わる CDK の同定 UGT1A1 発現調節に関わる CDK を CDK1, 2 siRNA をトランスフェクトしノックダウンした HepG2 細胞、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

(4) 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動の解析 Double thymidine block 法によって S 期に同調させた細胞を用いて、細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動をウェスタンブロット法を用いて解析した。

(5) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現誘導に関わる核内受容体の同定 HepG2 細胞に核内受容体を強制発現させ、HNF1 α 結合部位を含む近位転写調節領域と gtPBREM を含む遠位転写調節領域を連結したレポーター遺伝子を用いて CDK 阻害剤 roscovitine により活性化される核内受容体をレポーター活性を元に同定した。

(6) CDK2 によりリン酸化される PXR アミノ酸の同定と PXR 活性低下機序の解析 PXR リガンド結合部位のセリン、スレオニン残基をそれぞれアラニン、アスパラギン酸に変異させたリン酸化欠損変異体、偽リン酸化変異体を作製し、PXR 活性への影響を UGT1A1 mRNA 発現誘導から、また CDK2 によるリン酸化に及ぼす影響を解析することから同定した。PXR と heterodimer を形成し活性化される PXR の RXR との結合を、roscovitine を作用させた細胞の核タンパク質を調製し、免疫沈降法、ウエ

スタンブロット法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した CYP2B6,UGT1A1 発現調節機構 HGF が細胞増殖抑制因子として作用する HepG2 細胞と、細胞増殖促進因子として作用する HuH6 細胞を用いて内在性 CDK インヒビター及び薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響を解析したところ、HuH6 細胞では、p16、p21、p27 の有意な発現変動は認められなかったが、HepG2 細胞では、p16、p21、p27 の発現が有意に亢進しており、細胞増殖の抑制が観察された (図 1)。

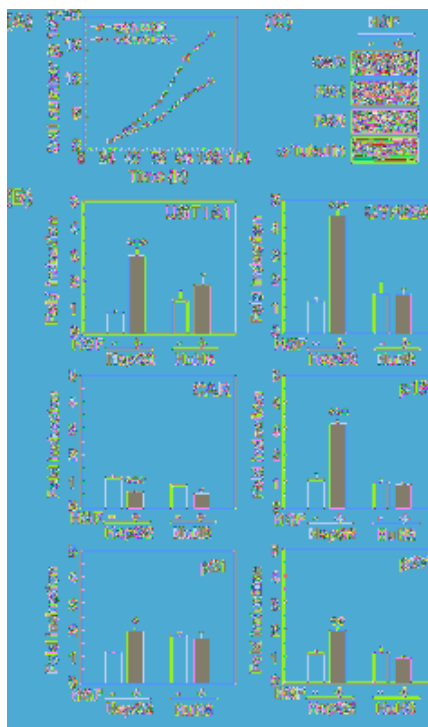


図 1 HGF による CYP2B6,UGT1A1 発現誘導

UGT1A1 の発現調節において重要な役割を演じている CAR の発現は抑制されたが、UGT1A1 及び CYP2B6 の発現は HGF により増大した。さらに、種々のシグナル伝達阻害薬を用いて、UGT1A1 の発現調節に影響を及ぼすシグナル伝達経路の解析を進めた。

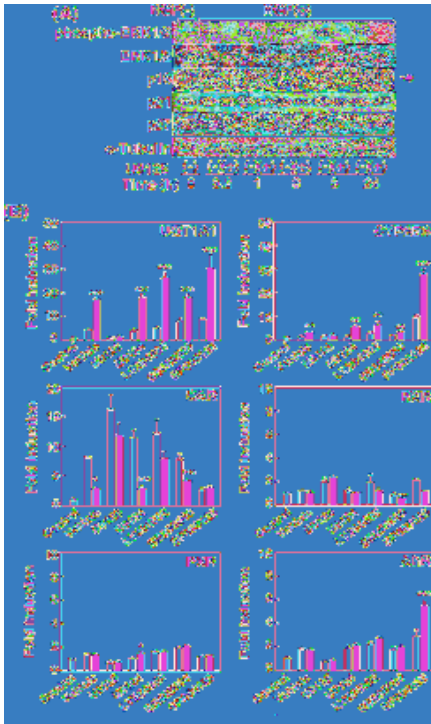


図2 HGFによるCYP2B6,UGT1A1発現誘導をU0126が抑制する

図2に示したようにMEKを阻害するU0126によってHGFによるUGT1A1の発現が抑制され、HGFによるUGT1A1の発現亢進にERK経路が関与していることが示された。HGFによるERKの活性化に伴いp16、p21、p27の発現が亢進するが、U0126を作用させると、ERKのリン酸化が抑制され、併行してp16、p21、p27の発現亢進の抑制が認められ、ERK経路を介して発現が調節されていることが示唆された。

(2) サイクリン依存性キナーゼ阻害剤によるUGT1A1発現誘導機序の解析 Roscovitine、SU9516、CDK inhibitor p35はいずれもUGT1A1の発現を亢進させたが、Roscovitineを作用させると、UGT1A1 mRNA、蛋白質の発現量は顕著に増大した(図3)。また、CYP2B6、CYP3A4の発現量も増加していた。これらの結果から、CDKがUGT1A1の発現に抑制的に作用していることが推察された。

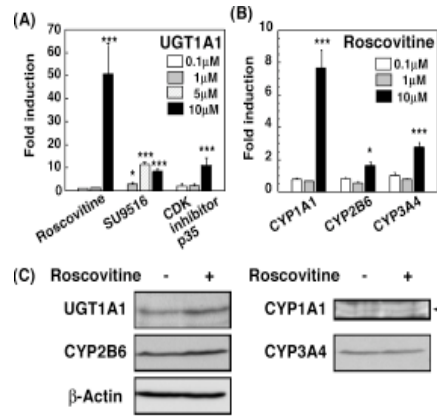


図3 CDK阻害剤による薬物代謝酵素の発現誘導

(3) UGT1A1発現調節に関わるCDKの同定

p16はCDK4を、p21、p27はCDK2を阻害することから、CDK4やCDK2がUGT1A1の発現に関与している可能性を検討した。CDK4 siRNAをトランスフェクトしてCDK4をノックダウンしても、薬物代謝酵素のmRNAと蛋白質の発現に影響は認められなかった。HepG2細胞とSW480細胞を用いてCDK2 siRNAをトランスフェクトしてCDK2をノックダウンすると、UGT1A1、CYP2B6、CYP3A4 mRNAならびにタンパク質の発現量が有意に増大し、CDK2がUGT1A1、CYP2B6の発現を抑制的に制御することが示された。

(4) 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動の解析

リン酸化され活性化したCDK2の蛋白質発現レベルは、同調から解放後、2~4h後までのS期に高く、この期間は薬物代謝酵素蛋白質の発現は低い結果が得られた(図4)。UGT1A1、CYP2B6の蛋白質発現レベルは8h後から増加し始めており、UGT1A1、CYP2B6の発現レベルの増大に先行してCDK2の脱リン酸化が認められ、活性化CDK2による負の制御が推察された。

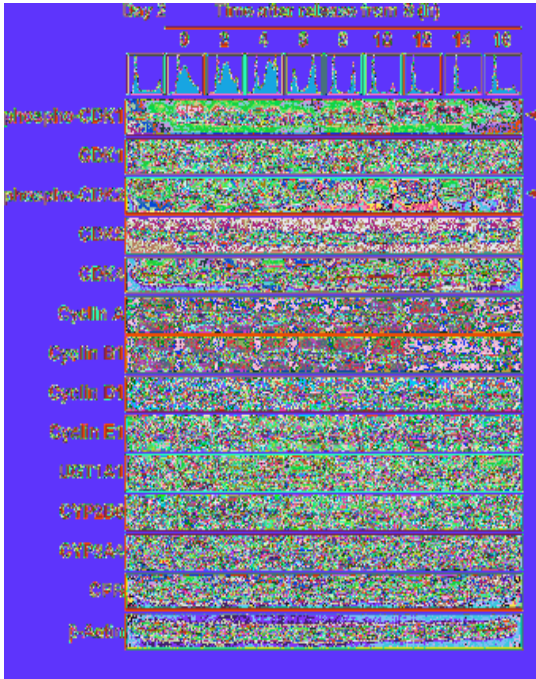


図4 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現

(5) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現誘導に関わる核内受容体の同定 CAR、PXR、AhR 発現プラスミドを導入した HepG2 細胞を用いて、CAR や PXR リガンドのリファンピシン、AhR リガンドのベンザピレンによる転写誘導作用に及ぼす roscovitine の作用を解析した。CAR や AhR リガンドのベンザピレンによる転写誘導作用に対して roscovitine は $5\ \mu\text{M}$ をピークに僅かに亢進した。PXR はリガンド非存在下では転写誘導作用は非常に低く、また PXR リガンドであるリファンピシン存在下 roscovitine の亢進作用は認められなかったが、PXR を強制発現させた細胞に roscovitine を作用させると、リガンド非存在下でもリガンド存在下と同レベルの転写誘導作用が認められた。Roscovitine により CAR の核内レベルに有意な影響が認められなかったが、PXR の核内レベルが増大したことから、roscovitine により活性化される核内受容体は PXR と推察され

た。

(6) CDK2 によりリン酸化される PXR アミノ酸の同定と PXR 活性低下機序の解析 CDK2 は Ser/Thr キナーゼであることから、CDK2 によって制御される活性部位を同定するために、PXR の ligand binding domain に含まれる 9 箇所の Ser/Thr に焦点を当て解析した。Ser350 を Asp に変異させると対照である野生型の 12% にまで roscovitine による UGT1A1 遺伝子発現が抑制された。CDK2 の基質特異性が Ser350 を含むアミノ酸配列に認められることから、 ^{32}P 放射標識した ATP 存在下 CDK2 を作用させたところ、野生型 PXR はリン酸化されるが、Ser350 を Asp に変異させた PXR では、リン酸化が抑制されており、CDK2 の作用点が Ser350 であることを明らかにした。S350D PXR を過剰発現した HepG2 細胞に roscovitine を作用させ、核内 S350D PXR と RXR の結合を PXR を免疫沈降させウエスタンブロット法で RXR を検出したところ、RXR との結合が顕著に低下していることが示された。またコアクチベーター SRC2 とともに過剰発現させると PXR 活性が回復することから、Ser350 をリン酸化するとコアクチベーターや RXR との結合親和性が低下し、活性が低下することが推察された。

これらの結果から、S350D PXR により UGT1A1 の発現が抑制され、CDK2 によるリン酸化が抑制されたが、核内 PXR の発現抑制は認められず、roscovitine は PXR の 350 番目セリンをリン酸化に関わる CDK2 の作用を抑制することにより UGT1A1 遺伝子転写を亢進させること、言い換えると、CDK2 による PXR の 350 番目セリンのリン酸化が核内での転写調節抑制に働き、負の制御に関わっていることを明らかにした。

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 15 件)

1. Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Hayashi H, Hirakawa J, Sugatani J: Magnesium deficiency suppresses cell cycle progression mediated by increase in transcriptional activity of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} in renal epithelial NRK-52E cells. *J. Cell. Biochem.* **112**:3563-3572 (2012) 査読有 doi: 10.1002/jcb.23284
2. Sugatani J, Sadamitsu S, Wada T, Yamazaki Y, Ikari A, Miwa M: Effects of dietary inulin, statin, and their co-treatment on hyperlipidemia, hepatic steatosis and changes in drug-metabolizing enzymes in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Nutr. Metab.* **9**:23-46 (2012) 査読有 doi:10.1186/1743-7075-9-23
3. Yamazaki Y, Hashizume T, Morioka H, Sadamitsu S, Ikari A, Miwa M, Sugatani J: Diet-induced lipid accumulation in liver enhances ATP-binding cassette transporter g5/g8 expression in bile canaliculi. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **208**:442-450 (2011) 査読有 http://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/26/5/26_442/_article
4. Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sato T, Sugatani J: Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Physiol.*, **226**, 1471-1478 (2011) 査読有 doi: 10.1002/jcp.22386
5. Ikari A, Sanada A, Sawada H, Okude C, Tonegawa C, Sugatani J: Decrease in transient receptor potential melastatin 6 mRNA stability caused by rapamycin in renal tubular epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1808**, 1502-1508 (2011) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2010.11.006>
6. Ikari A, Atomi K, Kinjo K, Sasaki Y, Sugatani J: Claudin-2 knockdown decreases matrix metalloproteinase-9 activity and cell migration via suppression of nuclear Sp1 in A549 cells. *Life Sci.*, **88**, 628-633 (2011) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.02.002>
7. Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sugatani J: Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J. Cell. Physiol.*, **226**, 2448-2456 (2011) 査読有 doi: 10.1002/jcp.22590
8. Ikari A, Sawada H, Sanada A, Tonegawa C, Yamazaki Y, Sugatani J: Magnesium deficiency suppresses cell cycle progression mediated by increase in transcriptional activity of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} in renal epithelial NRK-52E cells. *J. Cell. Biochem.*, **112**, 3563-3572 (2011) 査読有 doi: 10.1002/jcb.23284
9. Ikari A, Atomi K, Kinjo K, Sasaki Y, Sugatani J: Magnesium deprivation inhibits a MEK-ERK cascade and cell proliferation in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Life Sci.* **86**, 766-773 (2010) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.03.016>
10. Ikari A, Sanada A, Okude C, Sawada H, Yamazaki Y, Sugatani J, Miwa M: Up-regulation of TRPM6 transcriptional activity by AP-1 in renal epithelial cells. *J Cell Physiol.* **222**, 481-487 (2010) 査読有 doi: 10.1002/jcp.21988

11. Sugatani J, Sadamitsu S, Kurosawa M, Ikushiro S, Sakaki T, Ikari A, Miwa M: Nutritional status affects fluvastatin-induced hepatotoxicity and myopathy in rats. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1655-1664 (2010) 査読有 doi: 10.1124/dmd.110.034090
 12. Sugatani J, Osabe M, Kurosawa M, Kitamura N, Ikari A, Miwa M: Induction of UGT1A1 and CYP2B6 by an antimitogenic factor in HepG2 cells is mediated through suppression of cyclin-dependent kinase 2. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 177-186 (2010) 査読有 doi: 10.1124/dmd.109.029785
 13. Ikari A, Kinjo K, Atomi K, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J: Extracellular Mg²⁺ regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1798**: 415-421 (2010) 査読有 doi:10.1016/j.bbamem.2009.11.005
 14. Osabe M, Sugatani J, Takemura A, Kurosawa M, Yamazaki Y, Ikari A, Miwa M: Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress. *FEBS Lett.*, **583**, 885-889 (2009) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.051>
 15. Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Miwa M, Sugatani J: Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **384**, 306-310 (2009) 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.120>
- [学会発表] (計 14 件)
1. 内田貴啓、黒澤雅俊、平川城太郎、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、萱谷純子 : Cyclin-dependent kinase 2 down-regulates expression of drug-metabolizing enzymes UGT1A1 and CYP3A4 through phosphorylation of nuclear receptor PXR in S phase. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜)、プログラム、p.360、2011 年 12 月 16 日
 2. Junko Sugatani: Nutritional status influences basal and drug-induced expression of drug-metabolizing enzymes and transporters and drug-adverse effects. 第 26 回日本薬物動態学会 (広島)、講演要旨集 p.189 2011 年 11 月 18 日
 3. 萱谷純子 : 核内受容体を介した UGT1A1 遺伝子転写調節 P450 と UGT の勉強会 (大阪)、2011 年 6 月 18 日
 4. 内田貴啓、黒澤雅俊、平川城太郎、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、萱谷純子 : サイクリン依存性キナーゼ 2 は核内受容体 PXR を介して薬物代謝酵素 CYP3A4、UGT1A1 の発現を負に調節する 第 75 回日本生化学会中部支部シンポジウム (静岡)、抄録集、p.38、2011 年 5 月 28 日
 5. 内田貴啓、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、萱谷純子 : 核内受容体 PXR を介した UGT1A1 発現調節機構の解析 第 131 年回日本薬学会 (静岡)、講演要旨集 3、p.173、2011 年 3 月 30 日
 6. 黒澤雅俊、内田貴啓、五十里彰、三輪匡男、萱谷純子 : CDK シグナル伝達系を介した核内受容体 CAR 発現調節機序の解明 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)

- p.191、2010年12月7日
7. 菅谷純子 : Transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene expression and the alteration in its protein expression by intracellular factors controlling cell proliferation. 第25回日本薬物動態学会(東京)、講演要旨集 p.178、2010年10月8日
 8. 黒澤雅俊、内田貴啓、五十里彰、三輪匡男、菅谷純子 : Expression of UGT1A1 is regulated by cell signals associated with cell-cycle progression. 第25回日本薬物動態学会(東京)、講演要旨集 p.294、2010年10月7日
 9. 黒澤雅俊、定光慧、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、菅谷純子 : 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現抑制 第130年回日本薬学会(岡山)、講演要旨集3、p.169、2010年3月30日
 10. 黒澤雅俊、長部誠、喜多村直美、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、菅谷純子 : CDK2シグナル伝達系を介した薬物代謝酵素 CYP2B6、UGT1A1 発現調節機構の解明 第82回日本生化学会大会(神戸)、プログラム、p.285、2009年10月23日
 11. 菅谷純子、長部誠、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男 : 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携したCYP2B6、UGT1A1発現調節機構の解明 第2回博多シンポジウム「内・外環境と生物応答」(博多)、2009年10月9日
 12. Junko Sugatani, Makoto Osabe, Masatoshi Kurosawa, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari : Induction of UGT1A1 and CYP2B6 by an antimetogenic factor in HepG2 cells is mediated through suppression of CDK2 activity. 2nd International conference on health and longevity sciences,

- Yaku-shoku Dogen, 'Medicine and food, sharing a common origin, University of Shizuoka, p.39 2009年10月1日
13. 黒澤雅俊、長部誠、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子 : 細胞外シグナル伝達系と連携したグルクロン酸抱合酵素UGT1A1発現調節機構の解明 UGT研究会2009(静岡)、2009年9月11日
 14. Junko Sugatani : Cell cycle-dependent expression of CYP and UGT regulated by cyclin-dependent kinases in HepG2 and SW480 cells. 16th International Conference on Cytochrome P450, Okinawa (Nago), p.185, June 21-25, 2009

[図書] (計1件)

1. Junko Sugatani and Masao Miwa : Transcriptional regulation of human bilirubin: UDP-glucuronosyltransferase *UGT1A1* gene and implication of defects in the *UGT1A1* gene promoter in "Bilirubin: Chemistry, Regulation and Disorder" (Jakub F. Novotny and Florian Sedlacek eds) NOVA Science Publishers pp. 8.1-8.27 (2011)

[その他]

ホームページ等
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
三輪 匡男 (MIWA MASAO)
静岡県立大学・薬学部・名誉教授
研究者番号 : 1 0 0 4 6 2 8 7
- (2) 研究分担者
菅谷 純子 (SUGATANI JUNKO)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号 : 3 0 0 9 8 1 3 1