

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22590159

研究課題名(和文)疾患による免疫系の活性化が肝薬物代謝酵素の機能に及ぼす影響

研究課題名(英文)How do the immune disorders affect drug metabolism?

研究代表者

九川 文彦(Kugawa, Fumihiko)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90205063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系シグナル伝達が、薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。炎症性サイトカインカスケードの最上位に位置するNF-kappa Bに注目し、p65 subunitに結合する核内転写制御関連因子を同定した。タンデム免疫沈降実験とLC-Massを使ったショットガンプロテオミクスにより、シャペロン様タンパク質のBag6/Bat3が、p65 subunitに結合していることがわかった。次にこの因子を制御するmiRNAに注目した。ヒト関節リウマチをモデルに用い、関連するmiRNAを抽出し、そのターゲットとなるmRNAの組み合わせを基に、関節リウマチのどの経路が重要であるかを明らかにできるアルゴリズムを開発した。

研究成果の概要(英文)：We have been interested in the cytokine signal transduction cascade and its effect on drug metabolism. To extract the unknown protein, which may play as transcriptional regulators for metabolic enzymes as well as inflammatory cytokines, we have conducted immune precipitation following shotgun proteomics using LC-Mass. Finally, a chaperon-like protein Bag6/Bat3 was extracted and revealed to bind p65 subunit of NF-kappa B. Then, our interests moved on the miRNA, which may regulate Bag6/Bat3 expression. Using human rheumatoid arthritis as a model disorder, we established Excel VBA algorithm to look for the miRNAs that could regulate irritation-related mRNAs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：免疫系不活化 肝薬物代謝酵素 炎症性サイトカイン miRNA

1. 研究開始当初の背景

「病気そのもの」が、患者が服用している薬の代謝に影響を与えるという現象は、臨床の現場において重大な影響を与えるものの、今までほとんど注目されてこなかった。しかし、1998年、Blumbergによるsteroidやxenobiotics特異的な核内レセプターの発見(Blumberg B., et al., *Genes Dev.* **12**, 3195-3205 (1998))は、この「病気」という新たな薬物代謝酵素活性の変動要因が、分子薬物動態学的に大きな注目を集めるきっかけとなった。つまり、罹った病気に由来する<なにか>が、CYP3A4に代表される肝薬物代謝酵素の、核内受容体を介した転写制御に重大な影響を及ぼすのである。2006年にはZhouらにより、この<なにか>はシグナル伝達因子NF-κBを介した薬物代謝経路と免疫系路の密接なクロストークであることが提唱された(Zhou C., et al., *J.Clin. Invest.* **116**, 2280-2289 (2006))。さらにGuらによる、Lipopolisaccharide (LPS) 投与を受けた細菌感染モデルマウスを用いた実験によって、Tumor Necrosis-α (TNF-α) のup-regulationがNF-κBを活性化し、それが核内受容体のPXR-retinoid X receptorと結合することで、薬物代謝酵素CYP3A4の転写をtransに抑制することが明らかになり(図1; Gu X., et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 17882-17889 (2006))。少なくとも炎症性サイトカインを誘導するような「病気」に罹ると、飲んでる薬の代謝が変わる現象の一因が遺伝子の転写制御レベルで解明されたのである。しかし、どの病気に罹るとどの薬物代謝酵素の活性が変動するのか?さらに、多くの病気に関してこの現象は一般化できるのか?など、未解決の問題が山積していた。

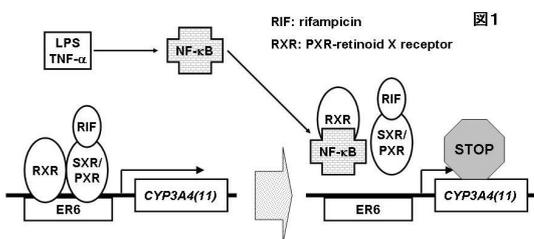


図1：従来の状態

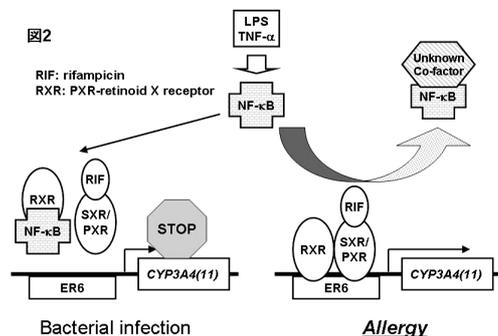


図2：未知因子が存在した状態

2. 研究の目的

生活習慣病などの慢性疾患を持った患者が、新たな疾患に罹患した場合、薬の投与は多くの場合、多剤併用・同時投与となることが一般的である。しかし、異なる疾患の重複した罹患により、治療薬の代謝が変化する可能性はほとんど考慮されることがない。このため、患者には招かざる副作用も生じ、結果として医療費負担の増加を招くなど、社会的な問題にもなりかねない現状がある。反面、しかるべき分子薬物動態学的メカニズムに基づき、“ある疾患によって、どの薬物代謝酵素がどれだけ変化するのか”が明らかになれば、それは、患者にとっても社会にとっても意義深い。

本研究では細菌感染とアレルギーをモデル疾患に選び、「疾患によるCYP薬物代謝酵素の活性変動メカニズム」を、マウスを使った動物実験で、まず明らかにする。特に関節リウマチ(RA:rheumatoid arthritis)などのアレルギー疾患特異的に、薬物代謝酵素の活性変動を制御する未知因子の同定を、遺伝子レベルとタンパク質レベルで行うことを目的とした(図2)。さらに、この未知因子の発現制御因子としてmiRNAに焦点を絞ることは、miRNAをサロゲートマーカーにした、将来のヒトに対する臨床研究の足がかりとなる。これらの成果を、“(免疫関連疾患のみならず)患者個別の疾患に基づく、合理的具体性を持った個別化医療”へ発展させる足がかりとなることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

炎症・アレルギー疾患をモデル疾患に選び、実験に供する細菌感染マウスと1型アレルギーマウスを、Balb/c系雄性マウスを用いて作成した。前者はリポポリサッカライド(LPS)の腹腔内投与により作成し、後者はオプアルブミン(OVA)の腹腔内投与により感作を行い、その2週間後にOVAを再投与することによって、アナフィラキシーを惹起させて作成した。ここで、モデル動物を使った疾患に伴う薬物代謝酵素(CYP)の遺伝子レベルでの変動は、real time PCR法により定量した。また、酵素活性の変動は、ニフェジピンの間クリアランスをマーカーに用いた。

薬物代謝酵素の遺伝子発現は、核内レセプター群によって制御されていることが知られており、CYPの分子種に依存して、それらはPXR, AhR, CARの3レセプター群に分類される。

このため、これらの核内レセプターをあらかじめ活性化する目的で、細菌感染マウスでは、LPS投与後3時間の時点で、PXRにはPCNを、AhRにはB(a)Pを、CARにはTCPOBOPの各レセプター特異的活性化剤を投与した。この後、両群のマウスから肝臓を摘出して、ホモジネートを作成したのち、NF-kappa Bのp65サブユニット抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

免疫系シグナル伝達には、NF-kappa B の活性化が重要であることが知られており、本研究でも実験的に追認されている。そこで、NF-kappa B の p65 サブユニットに結合することが期待され、且つそれが、NF-kappa B を介した炎症性サイトカインシグナル伝達経路のスイッチオン、オフを行う未知因子の同定を目指すこととした。具体的には、NF-kappa B の p65 サブユニットを bait に用いた免疫沈降実験を行い、釣れてきた未知タンパク質を LC-Mass を使ったショットガンプロテオミクスで同定した。

当初の研究計画では、NF-kappa B の p65 subunit と相互作用する未知因子の肝薬物代謝酵素への関わりについて、RNA 干渉実験により証明しようと考えていたが、重要なサロゲートマーカーになりうる miRNA を有力なツールに用い、この未知タンパク質因子の発現制御と免疫疾患の関わり合いを理解することとした。これは、miRNA が血液中でも分解されることなく存在していることから、本研究終了後に、ヒトを対象に行う臨床実験において、例えば、患者からの血液サンプル採取が容易であるという利点があるからである。

しかし、miRNA はその“短鎖”が故に、その真の標的遺伝子を同定することに困難が伴う。そのため、バイオインフォマティクスの観点から、自作 Excel VBA アルゴリズムを作成し、公開されている miRNA 標的遺伝子探索アルゴリズムとの連携を実装するシステムを構築した。

さすれば、この方法論を使うことで、今後ヒトを対象にしたアレルギー疾患におけるバイオマーカーとして機能、並びに標的遺伝子探索ツールとしての機能も期待できる。

4. 研究成果

本研究は、感染症や炎症による免疫系の賦活化が薬物代謝に及ぼす影響の解明を目的としている。最初に、マウス薬物代謝酵素遺伝子群における発現制御に、シグナル伝達物質である NF-kappa B が関与しているかどうかの検討を主に行った。薬物代謝酵素には、ヒト Cyp3a4 のマウスオルソログである Cyp3a11 を中心に、Cyp1a2, 2b10, 2c29, 2c55 を選んだ。その結果、リポポリサッカライド投与のマウス肝臓では、Cyp2b10 以外の Cyp3a11 を始めとする多くの薬物代謝酵素遺伝子の発現抑制が認められた。さらに、NF-kappa B により転写が活性化される IL-1 beta や TNF-alpha の発現量を定量したところ、上述した CYP 遺伝子群の変動と相関することが明らかになった。また、1 型アレルギーモデルマウスの肝臓では、IL-beta や TNF-alpha の発現量が増加しているにもかかわらず、Cyp3a11 の発現には変動が認められなかった（図 3）。一方、Cyp2b10 ではその発現量が増加し（図 4）これはアナフィラキシーショック後、7, 30, 180 分後まで経時的に上昇していた。おそらく、CYP2B10 は、他の酵素群

と違って、異なるシグナルカスケードにより制御を受けている可能性があり、文献的には、NO を介したものである可能性が指摘されている。

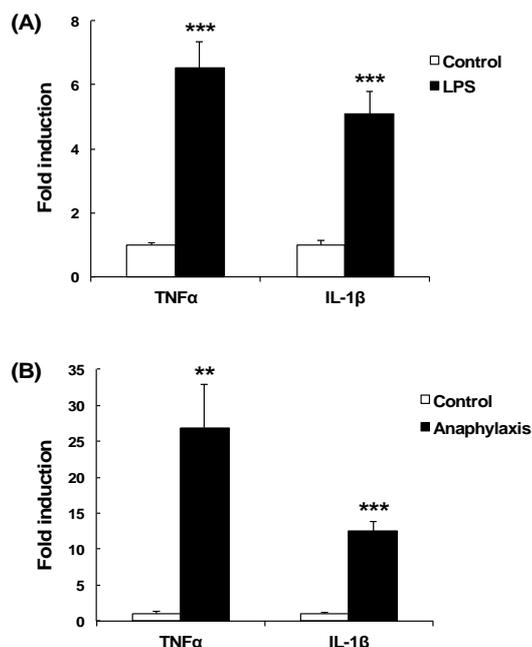


図 3 : 炎症性サイトカインの活性化

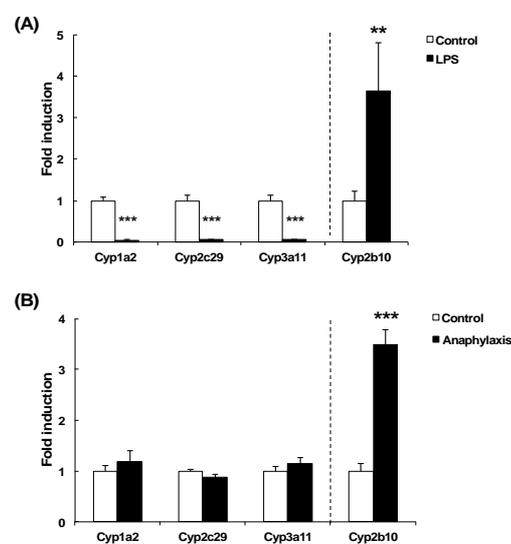


図 4 : Cyp2b10 の挙動

以上のことから、免疫系賦活化経路の違いにより、Cyp 遺伝子の発現変動パターンが異なることが明らかになった。しかし何れにせよ、CYP 薬物代謝酵素の多くは、炎症性サイトカインの上流に位置する NF-kappa B の関与を受けていることが、本研究から明らかになった (Moriya N., et al., Bio. Pharm. Bull., 35, 473-480 2012.)

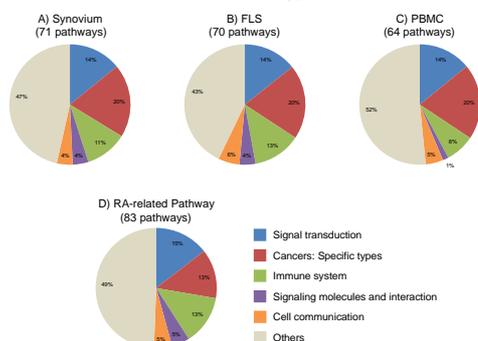
次のステップでは、マウス肝細胞の核抽出画分から、NF-kappa B の p65 subunit に結合する未知因子の精製を行った。当初は GST pull-down system を使うことを計画していたが、この system では、既知のタンパク質を使った p65 への結合/非結合実験において、再現性が見られない不具合が確認された。試

行錯誤の結果、p65 抗体を使ったタンデム免疫沈降実験を行い、その後、1 次元電気泳動と western blotting を組み合わせたシステムを使えば、bait である p65 subunit に結合するタンパク質を探索する系が確立できることがわかった。対照実験では、ヒト肝細胞培養株の HepG2 細胞を用いたところ、p65 bait への I-kappa B の結合が確認されている。

無処置マウス、LPS 投与マウス、アナフィラキシーマウスの間においては、銀染色で 5~6 本程度の p65 subunit 結合タンパク質バンドの出現の差異が認められていた。そこで、LC-Mass を使ったショットガンプロテオミクスを行い、未知バンドの定性的同定を行ったところ、p65 subunit に結合する有力な候補タンパク質として、シャペロン様タンパク質の機能を持つ、Bag6/Bat3 を同定することができた。すなわち Bag6/Bat3 は、NF-kappa B の p65 subunit を介して Cyp3a11 の転写を制御する可能性が高い。

その後、研究の興味は、この Bag6/Bat3 の発現制御メカニズムの解明に移って行った。そこで、研究の最終段階では、Bag6/Bat3 の発現を制御する miRNA に着目した。当初の計画では、未知タンパク質の直接定量系を構築し、そのタンパク質をもって、アナフィラキシー系疾患の発症に関わるサロゲートマーカーとすることを計画していた。しかし、Bag6/bat3 の発現制御を行う miRNA 集団が明らかになれば、血液中でも miRNA の定量は可能であることから、タンパク質の定量よりはるかに検出が容易であり、将来のヒトを対象とした臨床応用へ端緒が開かれることになると考えたためである。

しかし、miRNA は“短い鎖”という特徴があるが故に、それが標的とする mRNA は膨大な種類になり、疾患と遺伝子と miRNA という対応を一義的に決めるためには、コンピュータを使ったバイオインフォマティクスが必須になる。そこで、ヒト関節リウマチに関連してその増減が文献的に報告されている miRNA を抽出し、そのターゲットとなる miRNA の組み合わせにより、関節リウマチのどの経路が重要であるかを明らかにできるアルゴリズムを開発した(図5)。ヒト関節リウマチで発現が変動する miRNA が、どのようなシグナル伝達経路を制御しているかが明らかになった。(森家他、日本薬学会第 134 年会 平成 26 年 3 月 熊本)、 図 5



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 2件)

N. MORIYA, H. KATAOKA, H. FUJINO, J. NISHIKAWA, F. KUGAWA,
Different expression patterns of hepatic cytochrome P450s during anaphylactic or lipopolysaccharide-induced inflammation
Die Pharmazie 69, 142-147, 2014, 査読あり
DOI: 10.1691/ph.2014.3725

Nozomu Moriya, Hiromi Kataoka, Hideki Fujino, Jun-ichi Nishikawa, Fumihiko Kugawa

Effect of Lipopolysaccharide on the Xenobiotic-Induced Expression and Activity of Hepatic Cytochrome P450 in Mice

Biol Pharm Bull, 35(4), 473-480, 2012, 査読あり

[学会発表](計 1件)

森家 望、中西祐貴、渡辺麻梨菜、九川文彦

関節リウマチ関連 miRNA 標的遺伝子の *in silico* 予測-既存データベースと自作 Excel VBA を用いて-

日本薬学会第 134 年会, 熊本市総合体育館 (熊本市), 2014 年 3 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

九川 文彦 (KUGAWA FUMIHIKO)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 90205063

(2) 研究分担者

西川 淳一 (NISHIKAWA JUN-ICHI)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号: 90218131

(H22)

藤野 秀樹 (FUJINO HIDEKI)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号: 90510975

(H22)

(3) 連携研究者

岩崎 剛 (IWASAKI TSUYOSHI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 10151721

森家 望 (MORIYA NOZOMU)

兵庫医療大学・薬学部・助手

研究者番号: 30509138