

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460175

研究課題名(和文) SCARM及びCAR/PXRデュアルリガンドによる異物代謝、エネルギー代謝調節

研究課題名(英文) Regulation mechanism of drug metabolism enzymes by SCARM and dual ligand of CAR/PXR

研究代表者

菅野 裕一郎 (KANNO, Yuichiro)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：40453849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体CARやPXRは、様々な環境化学物質や医薬品などの生体外異物をリガンドとして、異物の代謝などで重要な役割を果たしている。多くの場合、CARとPXRはリガンドを共有している(デュアルリガンド)。本研究では、新規CAR/PXRデュアルリガンドとしてT0901317、Nigramide J及びPXRリガンドとしてNigramide Cを見いだした。さらに、樹立したCAR、PXR発現モデル細胞株を用いた検討の結果、CYP3A4の誘導にはこれまで知られているCARとPXRのクロストーク以外の機構が存在する可能性が示唆された。

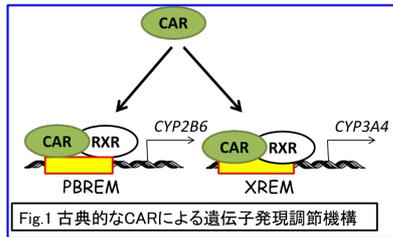
研究成果の概要(英文)：The CAR and PXR regulate various genes involved in xenobiotics and drug metabolism. In many cases, CAR/PXR share ligands termed dual ligands of CAR/PXR. First, we screened compound library to investigate dual ligand of CAR/PXR, we identified Nigramide J and T0901317, as a dual ligand of CAR/PXR. In this study, we established a tetracycline-inducible human CAR and stably human PXR-overexpressing HepG2 cell line (HepTR/hCAR/hPXR) to examine CAR/PXR dual ligands. We investigated the regulation of cytochrome P450 (CYP) 2B6, CYP2C9, CYP3A4, and UDP-glucuronosyl transferase, which are target genes of CAR/PXR, by dual ligands of CAR/PXR in two transfectants. We show that dual ligands of CAR/PXR show distinct gene regulation patterns by crosstalk between CAR and PXR. Furthermore, the two newly established cell lines are useful tools to investigate dual ligands of CAR/PXR.

研究分野：薬学

キーワード：核内受容体 転写因子 遺伝子発現調節 生体外異物

1. 研究開始当初の背景

生体には医薬品や環境汚染物質などの生体外異物に対する防御機構が備わっている。脂溶性の生体外異物(リガンド)が侵入すると、これを認識した受容体型転写調節因子が細胞質から核内へ移行し、標的遺伝子(酸化酵素、抱合酵素、トランスポーターなど)の発現を誘導して代謝・排泄が促進される。核内受容体スーパーファミリーに属する constitutive androstane receptor(CAR)は、異物・薬物代謝酵素である CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4 等の異物による発現誘導に関与している。CAR は、リガンドの結合により活性化し、標的遺伝子である CYP2B6 や CYP3A4 遺伝子プロモーター上に存在する phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM)や xenobiotic-responsive enhancer module(XREM)などの CAR 応答配列に、別の核内受容体 retinol X receptor(RXR)とヘテロダイマーを形成して結合し、標的遺伝子の転写を促進する(Fig.1)。核内受容体は様々な医薬品の分子標的となっている。例えば、乳がん治療薬としてエストロゲン受容体アンタ



ゴニスト、脂質代謝改善薬として PPAR アゴニストなどの適応が認められている。しかしながら、核内受容体は様々な生理作用を持つため、副作用も不可避ではあり、これを軽減した化合物の開発が期待されている。中でも、選択的エストロゲン受容体調節薬であるラロキシフェンは、組織選択的に作用し、骨に対してはエストロゲン様作用を示すが、生殖系に対するエストロゲン様作用は弱いいため、閉経後骨粗鬆症に使用されている。

2. 研究の目的

核内受容体 CAR や pregnane X receptor(PXR)は、様々な環境化学物質や医薬品などの生体外異物をリガンドとして、異物の代謝などで重要な役割を果たしている。多くの場合、CAR と PXR はリガンドを共有している(デュアルリガンド)。これまで、薬物代謝酵素の誘導やエネルギー代謝調節機構に対する CAR や PXR の機能については、リガンドに主眼を置いた検討はほとんどない。CAR の部分アゴニストには**選択的 CAR 調節薬(selective CAR modulator; SCARM)**としての機能が期待される。本研究では、SCARM による薬物代謝酵素やエネルギー代謝関連遺伝子の発現調節機構について、CAR と PXR のクロストークを含めて分子レベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) 新規 CAR/PXR デュアルリガンドの探索

CAR 及び PXR の LBD を GAL4 の DNA 結合領域に融合させたタンパク質を用いた Mammalian 1-hybrid assay を用い、生薬抽出成分をスクリーニングした。

(2) CAR、PXR 発現モデル細胞株を用いたデュアルリガンドによるクロストーク機構の解明

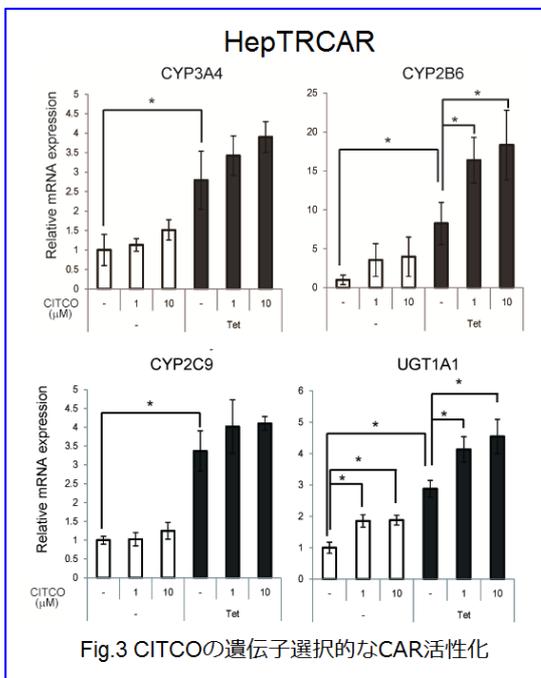
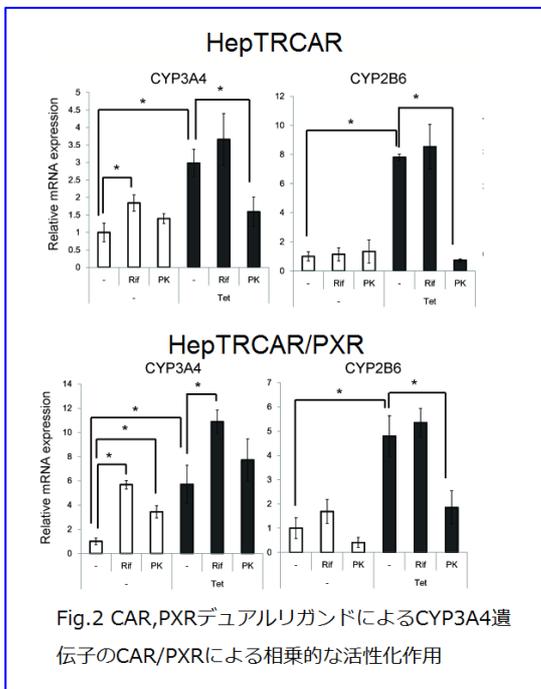
CAR の条件付き発現細胞として構築した HepTR-CAR 細胞と HepTR-CAR/PXR 細胞を用いて、CAR/PXR デュアルリガンドによる遺伝子発現を mRNA 及びタンパク質レベルで解析した。最終的には、ヒト初代培養肝細胞を用いて、モデル細胞におけるデュアルリガンドの作用機構の確認を行った。

4. 研究成果

本研究は、デュアルリガンドにより活性化された CAR と PXR のクロストークを明らかにするために(1)新規 CAR/PXR デュアルリガンドの探索及び(2)CAR、PXR 発現モデル細胞株を用いたデュアルリガンドによるクロストーク機構の解明を行った。

(1) 新規 CAR/PXR デュアルリガンドの探索のため、GAL4 DNA 結合領域に CAR 及び PXR のリガンド結合領域を融合させたタンパク質を用いたレポーターアッセイを用いて、新規 CAR/PXR デュアルリガンドのスクリーニングを行った。初めに核内受容体リガンドとして知られる化合物を用いてスクリーニングを行った。その結果、LXR や PXR のアゴニストとして知られていた T0901317 が CAR のインバースアゴニストとしても働くことを明らかとした。次に、生薬由来成分を用いてスクリーニングを行った結果、*Piper nigrum* (コショウ、胡椒)に含まれる成分であるシクロヘキササン型アルカロイドの Nigramide J が CAR のインバースアゴニスト、PXR のアゴニスト活性をもつデュアルリガンドであることを見いだした。さらに、Nigramide C は、PXR の選択的アゴニストであることを見いだした。本研究により、新たに2種類の CAR/PXR のデュアルリガンドを見いだすことができた。

(2) CAR の条件付き発現細胞として構築した HepTR-CAR 細胞と PXR を過剰発現させた HepTR-CAR/PXR 細胞を用いて、CAR/PXR デュアルリガンドによる遺伝子発現を mRNA で解析を行った。その結果以下のことが明らかとなった。CAR と PXR の両方の活性化(高濃度 CITCO 処置及び Tet + Rifampicin 処置)により、CYP3A4 の誘導の相乗的な活性化が認められたが、CYP2B6、CYP2C9、UGT1A1 においては認められなかった(Fig.2)。このことより、CYP3A4 の誘導にはこれまで知られている CAR と PXR のクロストーク以外の機構が存在する可能性が示唆された。



CAR のリガンドである CITCO は、CYP2B6 と UGT1A1 において恒常的な CAR による活性を促進したが、CYP3A4 や CYP2C9 において促進作用は認められなかった (Fig.3)。このことは、リガンドによる CAR の活性化に遺伝子選択的な機構があることが示唆された。

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 6 件)

Kanno Y, Tanuma N, Yazawa S, Zhao S, Inaba M, Nakamura S, Nemoto K, Inouye Y. Differences in gene regulation by dual ligands of nuclear receptors constitutive androstane

receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) in HepG2 cells stably expressing CAR/PXR. *Drug Metab Dispos.*、査読あり、2016 May 19. pii: dmd.116.070888 Kanno Y, Inajima J, Kato S, Matsumoto M, Tokumoto C, Kure Y, Inouye Y. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is a novel coactivator of constitutive androstane receptor (CAR). *Biochem Biophys Res Commun.*、査読あり、2015 459 143-147. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.085.

Kuang X, Li W, Kanno Y, Mochizuki M, Inouye Y, Koike K. Cycloartane-type triterpenes from *Euphorbia fischeriana* stimulate human CYP3A4 promoter activity. *Bioorg Med Chem Lett.*、査読あり、2014 24:5423-5427. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.10.032

Kanno Y, Tanuma N, Yatsu T, Li W, Koike K, Inouye Y. Nigramide J is a novel potent inverse agonist of the human constitutive androstane receptor. *Pharmacol Res Perspect.*、査読あり、2014 2:2. DOI: 10.1002/prp2.18.

Kanno Y, Yatsu T, Li W, Koike K, Inouye Y. Nigramide C is a natural agonist of human pregnane x receptor. *Drug Metab Dispos.*、査読あり、2014 42:1084-1089. DOI: 10.1124/dmd.114.057810.

Kanno Y, Tanuma N, Takahashi A, Inouye Y. T0901317, a potent LXR agonist, is an inverse agonist of CAR. *J Toxicol Sci.*、査読あり、2013;38(3):309-315. PMID: 23665929

〔学会発表〕(計 7 件)

宮川 ありす、宮下 優香、根本 清光、菅野 裕一郎、核内受容体型転写因子 CAR のコアクチベーターとしての IVNS1ABP、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

宮下 優香、宮川 ありす、根本 清光、菅野 裕一郎、核内受容体型転写因子 CAR のコアクチベーターとしての TRIM33、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

菅野 裕一郎、井上 義雄、デュアルリガンドによる核内受容体 CAR・PXR のクロストーク、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、デザインクリエイティブセンター神戸 (兵庫県、神戸市)

呉 由貴、白石 光、徳元 千香子、菅野 裕一郎、井上 義雄、新規 CAR 結合タンパク質による CAR 機能調節機構、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、デザインクリエイティブセンター神戸 (兵庫県、神戸市)

徳元 千香子、稲葉 美季、呉 由貴、

白石 光、菅野 裕一朗、井上 義雄、Steroid receptor coactivator による選択的 CAR 標的遺伝子発現調節機構、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、デザインクリエイティブセンター神戸（兵庫県、神戸市）

菅野 裕一朗、入内島 潤、加藤 さやか、徳元 千香子、呉 由貴、井上 義雄、核内受容体 CAR と PRMT5 の相互作用、フォーラム 2014：衛生薬学・環境トキシコロジー、2014 年 9 月 19 日、つくば国際会議場（茨城県、つくば市）

菅野 裕一朗、矢沢 幸紀、加藤 さやか、松本 茉衣華、田沼 信明、井上 義雄、デュアルリガンドによる核内受容体 CAR・PXR のクロストーク、フォーラム 2013：衛生薬学・環境トキシコロジー、2013 年 9 月 13 日、九州大学医学部百年講堂（福岡県、福岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 裕一朗 (KANNO, Yuichiro)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：4 0 4 5 3 8 4 9