

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590140

研究課題名（和文）薬物代謝酵素CYP3Aの性特異的発現機構：ヒトとマウスの比較

研究課題名（英文）Mechanisms of female-specific expression of drug-metabolizing enzyme CYP3A: comparison between human and mouse

研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授

研究者番号：30250468

研究成果の概要（和文）：薬物代謝酵素 CYP3A の雌性優勢発現の機序を明らかにするため、マウス肝臓でメス特異的に発現している *Cyp3a41* 遺伝子をモデルに解析した。*Cyp3a41* 遺伝子の発現は近位プロモーターにおいて転写因子 HNF4 α により調節されていた。その領域付近のクロマチン構造には雌雄差あり、それが HNF4 α 結合量の雌雄差（メス>オス）となり、メス特異的発現の一因であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular mechanisms of female-dominant expression of drug-metabolizing enzyme CYP3As in the liver, we analyzed the mechanisms of female-specific expression of mouse *Cyp3a41* gene. Our results indicated that HNF4 α plays an important role in the transcriptional activation of the *Cyp3a41* gene, and a sex difference in chromatin structure may contribute to the female-specific expression of *Cyp3a41* in the livers of mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物代謝酵素、CYP3A、発現制御、性差、マウス

1. 研究開始当初の背景

P450 は薬物の生体内変換を担う重要な酵素で、その発現誘導や機能阻害は薬物間相互作用の主たる原因となる。また、個人個人の P450 活性の違いが、薬理効果や毒性発現の個人差の一因とされており、P450 活性を変動させる因子の情報は、薬物の安全かつ効果的な投与設計を目指したテーラーメイド医療の進展のためには重要である。

一方で、薬物代謝酵素活性の調節機構には種差が知られており、実験動物で得られたデ

ータをヒトに外挿する際には、ヒトと実験動物それぞれでの調節機構とその違いに関する情報は不可欠なものである。

ところで、ヒト P450 の中には男女間で発現に違いがあり、それが特定の薬物に観察される薬物動態の男女差の一因と考えられている分子種も存在する。その一例が成人肝の主要な P450 である CYP3A4 であり、その発現は男性より女性の方が数倍高い。一方、実験動物ではより顕著な性差が観察される。例えば、マウス CYP3A41 は肝臓でメス特異的

に発現している主要 CYP3A 分子種である。この P450 分子種は当研究グループが発見し様々な解析を行ってきた分子種であるが、興味深い事にヒト *CYP3A4* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、ヒト *CYP3A4* がマウス *Cyp3a41* と全く同じ発現プロファイルを示し、成獣肝ではメス特異的に発現していることが明らかにされた (Cheung C. *et al.*, 2006)。この事実は、メス特異的発現をもたらす調節機構に関して両遺伝子がほぼ同一のシスエレメントを有している事を強く示唆し、マウス *Cyp3a41* 遺伝子を解析することで、ヒトとマウスで共通している *CYP3A* 遺伝子の女性優勢発現機構について情報を得ることができると考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究はマウス *Cyp3a41* 遺伝子をモデルとして、メス特異的発現に関わる調節機構を明らかにする事を第一の目的とした。さらに、その情報を基にヒト *CYP3A4* 遺伝子の女性優勢発現の調節機構を考察する事を目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた抗体は以下に示す市販のものを使用した。抗 HNF4 α (sc-8987)、抗アセチル化ヒストン H4 (Lys 8) (略称:AcH4K8、sc-8660)、コントロールウサギ IgG (sc-2027) は Santa Cruz Biotechnology より購入し、抗ジメチルヒストン H3 (Lys 4) (略称: H3K4me2、07-030)、抗トリメチルヒストン H3 (Lys27) (略称: H3K27me3、07-449) は Millipore より購入した。抗体の略称と商品番号を括弧内に記した。

(2) 実験には日本 SLC (静岡) より購入した雌雄の ddY 系マウスを使用した。脳下垂体摘出手術は 5 週齢で実施し (日本 SLC に依頼)、7 週齢から 8 週齢にかけてヒト組換え成長ホルモン (rhGH) を浸透圧ポンプを用いて持続的に皮下に投与 (1.5 μ g/hr、7 日間) した。

(3) マウス *Cyp3a41* 遺伝子を含む DNA 断片は C57BL/6 マウス染色体 DNA より PCR により増幅し、pGEM-T easy ベクター (Promega) にサブクローニングした。5'-欠失型レポーター遺伝子構築に当たっては、+61 から様々な位置までの 5'-上流域を PCR で増幅し、pGL3 basic ベクター (Promega) に挿入して作製した。*Cyp3a41* 遺伝子上の位置については、転写開始点を +1 として番号を付した。レポーター遺伝子への塩基置換の導入は QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いた。

(4) マウス肝細胞はコラーゲナーゼ灌流法により調製し、血清およびフェノールレッド非含有ウェイマス培地で初代培養した。プラ

スミドのトランスフェクションは Transpass D1 Transfection Reagent (New England Biolabs) を用いた。*in vivo* レポーターアッセイでは Trans IT-EE hydrodynamic delivery solution (Mirus Bio Corporation) を用い、マウス尾静脈より肝臓にレポータープラスミドを導入した。細胞溶解液あるいは肝臓ホモジネートを用いたレポーター活性の測定には dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いた。

(5) EMSA (electrophoretic mobility shift assay) には ³²P で放射標識したプローブと TNT[®]T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) で調製した組換えタンパク質あるいは肝臓核抽出液を用いた。

(6) ChIP アッセイは雌雄マウス肝臓組織を試料とし、ChIP assay kit (Upstate Biotechnology) と (1) に示した抗体を用い実施した。PCR で増幅した *Cyp3a41* 遺伝子の範囲は -207/+18 である。

(7) トータル RNA 画分はグアニジウムチオシアネート法により調製し、定量的リアルタイム RT-PCR は TaqMan プローブを用いた方法あるいは SYBR-Green を用いた方法で実施した。

4. 研究成果

(1) *Cyp3a41* 遺伝子 5'-隣接領域の転写調節領域の解析

メス肝臓由来マウス肝細胞初代培養系を用いたレポーター遺伝子アッセイにより *Cyp3a41* 遺伝子 5'-隣接領域の転写活性化領域を探索した。オス由来の肝細胞初代培養系では CYP3A41 mRNA がほとんど検出されないことから、メス由来細胞を用いて同定される領域がメス特異的発現に関与すると仮定した。-3669/+61, -2396/+61, -1633/+61, -844/+61, -670/+61, -596/+61, -163/+61 領域を含む 5'-欠失変異体を用いて解析したところ、-163/+61 領域に最も高い転写活性が認められた。その領域について転写因子が結合可能な配列を検索したところ、HNF4 α (-99/-87) や PXR (-162/-145) の推定結合配列が見いだされた。PXR 推定配列は塩基置換の導入やレポーターアッセイ系への PXR 共発現によっても転写活性に変化はなく、mRNA 発現の解析で既に明らかにしていた *Cyp3a41* 遺伝子発現の PXR 非依存性 (Sakuma T. *et al.*, 2004) と矛盾しなかった。

(2) 近位プロモーターの HNF4 α 結合配列の解析

近位プロモーターに見いだされた HNF4 α 結合配列について、レポーター遺伝子アッセイや EMSA により機能を確認した。肝細胞初代培養系に HNF4 α 発現プラスミドをコトランスフェクションすると、-163/+61 を有する

レポーター遺伝子の転写活性は上昇した。推定 HNF4 α 結合部位に塩基置換を導入したレポーターでは転写活性が消失し、HNF4 α 導入による転写促進も観察されなかった (図 1)。

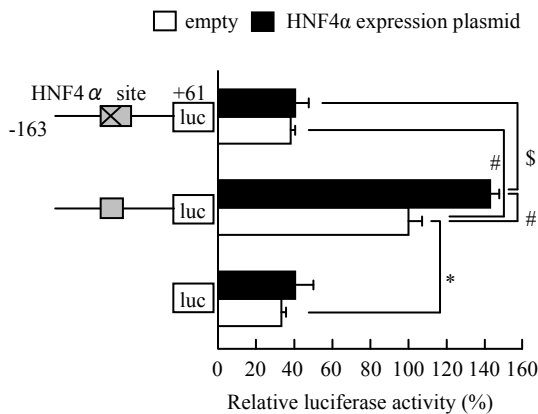


図 1 *Cyp3a41* 遺伝子近位プロモーター中の HNF4 α 結合配列の機能

組換え HNF4 α タンパク質を用いた EMSA では、近位プロモーター中の推定 HNF4 α 結合配列に HNF4 α タンパク質が結合可能であることが確認された。雌雄マウス肝臓核抽出液を用いた EMSA においても複合体が形成し、抗 HNF4 α 抗体によるスーパーシフトが観察された。これらの結果は、近位プロモーターへの HNF4 α の結合が *Cyp3a41* 遺伝子の発現に大きく寄与している事を示している。

(3) HNF4 α のメス特異的発現に対する関与

もし、HNF4 α 活性がオスよりメスで高ければ、(2) で明らかになった HNF4 α 依存的転写活性がメス特異的発現の一因になると考えられる。しかし、マウス肝臓核抽出液を用いた EMSA 解析では、雌雄で同程度の複合体形成が観察された。核抽出液中の HNF4 α タンパク質の量をウェスタンブロット分析で確認しても雌雄差は認められなかった。雌雄マウスを用い *in vivo* レポーターアッセイを行ってみると、*in vivo* でも HNF4 α 依存的転写活性化は確認されたものの、転写活性化は雌雄のマウスで同程度認められた。これらの結果は上記の可能性を支持しない。

しかし、もしクロマチン構造に雌雄で違いがあれば、HNF4 α 結合部位への結合し易さに雌雄で差が生じ、それがメス特異的発現の一因となる可能性が考えられる。またその場合、上述の結果はいずれもクロマチン構造を反映していない実験の結果であり、この可能性とも矛盾しない。そこで、ChIP アッセイを用いクロマチン中での HNF4 α の結合量を雌雄で比較した。その結果、成獣 (7 週齢) マウスでは雌雄の間で結合量に差があり、メスでオスの 4 倍程度多く HNF4 α が結合していることが明らかになった (図 2)。

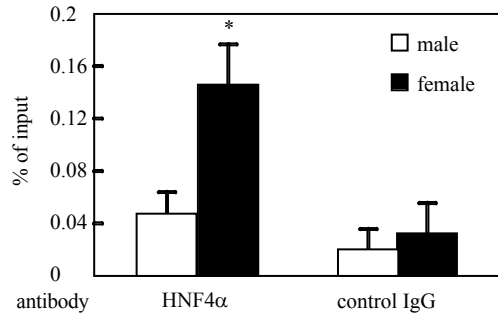


図 2 *Cyp3a41* 遺伝子プロモーター (-207/+18) への HNF4 α の結合 (ChIP アッセイ)

次に *Cyp3a41* の mRNA 発現とクロマチン中の HNF4 α 結合量の間に関連があるか否か検討した。*Cyp3a41* 遺伝子は 3 週齢までは雌雄で同程度発現しているが、それ以降の性成熟に伴いメス特異的発現に移行する。7 週齢では上述の通りメスで多く HNF4 α が結合していたが、3 週齢では雌雄同程度の HNF4 α の結合が観察された。

Cyp3a41 遺伝子は成長ホルモン (GH) による調節を受け、メス型 GH 分泌によって促進的に調節されている。従って、脳下垂体摘出により mRNA 発現が消失し、rhGH のメス型投与で発現が一部回復する (Sakuma T. et al., 2002)。HNF4 α のクロマチン中の結合量は、脳下垂体切除で 50%程度に低下し、rhGH 投与で上昇傾向を示し、mRNA と同様の変動を示した。これらの結果は HNF4 α が *Cyp3a41* 遺伝子のメス特異的発現の中心的調節因子である可能性を支持するものと考えられる。

(4) 近位プロモーター付近のヒストンタンパク質の修飾状態

Cyp3a41 遺伝子近位プロモーター付近のクロマチン構造に雌雄差があるか否か確かめるため、ヒストンタンパク質の修飾状態を ChIP アッセイにより解析した (図 3)。

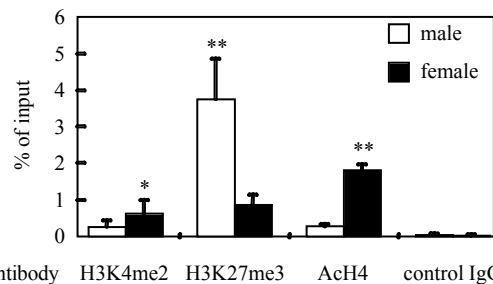


図 3 *Cyp3a41* 遺伝子プロモーター (-207/+18) 付近のヒストンタンパク質の修飾 (ChIP アッセイ)

クロマチン構造をゆるめ転写因子がよりアクセスし易くなるヒストン H4 のアセチル化 (AcH4) は、オスよりメスで高いレベルで

あった。エピジェネティックコードの一つで、転写活性化領域に見いだされるヒストン H3 リジン 4 のジメチル化 (H3K4me2) はオスよりメスで 2 倍程度高く、転写抑制領域に見いだされヘテロクロマチンの保持にも関わるとされるヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) はメスよりオスが高いという結果になった。これらの結果はクロマチン構造に雌雄差があることを示唆し、オスに比べメスのクロマチンの方がより転写活性化され易い状態にあると考えられる。

(5) HNF4 α と他の転写因子との協調的調節

クロマチン中の-99/-87 領域への HNF4 α 結合量に雌雄差が観察されたが、その差は 4 倍程で 20 倍以上の大きな差が観察される mRNA 程ではない。そこで HNF4 α と他の転写因子との相互作用によってメスでの転写がさらに増強されメス特異的発現となると仮定し、肝細胞初代培養系を用いたレポーターアッセイにより検討した。

その結果、転写因子 COUP-TFII と HNF4 α が協調的に転写を活性化する可能性が示された。その際、-163/+61 領域を含むレポーター遺伝子の転写活性は、メス由来の肝細胞初代培養系にメス型 GH 分泌を模倣するように rhGH を持続的に添加した条件で COUP-TFII と HNF4 α を共発現させると協調的に活性化された。しかし、オス由来の肝細胞初代培養系にオス型 GH 分泌を模倣するように rhGH を 11 時間の間においてパルス状に添加した条件では観察されなかった。それらの実験がクロマチン構造を正確に反映していないプラスミドを用いていることを考え合わせると、この結果はクロマチン構造の雌雄差に起因する HNF4 α 結合量の雌雄差に加え、クロマチン構造以外の要因の関与によって、メスにおいてのみ COUP-TFII と HNF4 α が協調的に働き、*Cyp3a41* 遺伝子の強い転写活性が生じている可能性を示している。

また、*Cyp3a41* 遺伝子はグルココルチコイド受容体 (GR) 依存的にグルココルチコイドと GH による協調的転写活性化を受けるが、肝細胞初代培養系を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、グルココルチコイドに対する応答性が HNF4 α 結合配列に変異を導入することによって消失した。この結果は、HNF4 α が GR を介した *Cyp3a41* 遺伝子のメス肝臓での高発現にも関与している事を示唆し、HNF4 α の *Cyp3a41* 遺伝子発現における中心的役割を支持するものである。

(6) 総括および展望

本研究によってマウス *Cyp3a41* の成獣肝におけるメス特異的発現の背景にある分子機

構の一端が明らかになった。上述の様に、HNF4 α の結合量の性差は mRNA で観察される特異的とも言えるほどの大きな差ではなく、検討していない領域を含め、他の要因も関与することで性特異的になると推測できる。候補の一つとして COUP-TFII が挙げられることより、COUP-TFII と HNF4 α の *Cyp3a41* 遺伝子上での相互作用の詳細について、今後さらなる研究が必要と考える。同様にグルココルチコイドホルモンと GH による協調的転写機構についてもさらに解析する必要がある。

Cyp3a41 遺伝子の GH による調節機構に関し本研究では大きな進展はなかった。肝細胞初代培養系を用いた mRNA レベルの解析においては、雌雄の分泌様式を模倣して GH を添加すると、その違いが mRNA 発現の違いとして反映される。しかし、同様の GH 処理をした肝細胞初代培養系を受容細胞として用いても、レポーター遺伝子アッセイにおいては、影響を認めることは出来なかった。その理由として、第一に解析した範囲 (最大-10 kbp 上流まで) に GH 応答領域がふくまれていないという可能性が考えられる。一方で第二の可能性としては、今回明らかになったクロマチン構造の雌雄差の形成に GH が関わるという可能性である。その仮説が正しければ、レポーター遺伝子アッセイで GH 応答領域が同定されないことも説明でき、今後の重要な検討課題である。

代表者らのグループでは他の性特異的 P450 遺伝子の解析も実施している。その中で *Cyp3a41* 同様メス特異的発現を示すマウス *Cyp2b9* 遺伝子は *Cyp3a41* 遺伝子とは全く異なる機構によって性特異性を示す事が明らかになった (Hashita T. et al., 2008)。 *Cyp2b9* 遺伝子の場合、メスで活性が高い FoxA2 による転写促進とオスにおいてオス型 GH 分泌によって選択的に活性化される STAT5b による抑制の二つの性依存的転写因子の関与によりメス特異的発現となっていた。本研究で明らかになった *Cyp3a41* 遺伝子のメカニズムはそのような性特異的トランス因子によるものではなく、クロマチン構造の雌雄差というシスエレメントの雌雄差に起因するものであり、新しいメカニズムの発見となった。

本研究申請段階における予備検討では、*Cyp3a41* 遺伝子の性差の原因が今回明らかになったシスエレメント側の雌雄差ではなくトランス因子側の雌雄差を強く示唆するものであった。詳細な解析の後、その可能性は否定されたのだが、その確認に時間を要してしまった。また、その後も ChIP アッセイなど実験方法の確立に時間を要したこともあり、当初予定していたヒト *CYP3A4* 遺伝子を対象とした解析で成果を得る段階にまで進展させることがかなわなかった。ヒト *CYP3A4* 遺伝子は転写活性化に HNF4 α が関与するこ

とが報告されている (Tirona RG. et al., 2003)。また、ヒト GH の分泌にも性差が知られている。ヒト *CYP3A4* 遺伝子のトランスジェニックマウスでは、ヒト *CYP3A4* がメス特異的に発現していることと本研究の結果を考えあわせると、ヒト *CYP3A4* 遺伝子の HNF4 α 結合部位近辺のクロマチン構造が女性で男性よりもリラックスした状態を取りやすいマーク (エピジェネティックコード) が付与されているという仮説を立てる事ができ、今後その可能性について検討することを計画している。

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 8 件)

- ① Bhadhprasit W., Sakuma T., Kawasaki Y., and Nemoto N. (2011) Hepatocyte nuclear factor 4 alpha regulates expression of the mouse female-specific *Cyp3a41* gene in the liver. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 490-497, 査読有
- ② Kondo S., Chatuphonprasert W., Jaruchotikamol A., Sakuma T., Nemoto N. (2011) Cellular glutathione content modulates the effect of andrographolide on β -naphthoflavone-induced CYP1A1 mRNA expression in mouse hepatocytes *Toxicology*, **280**: 18-23, 査読有.
- ③ Chatuphonprasert W., Kondo S., Jarukamjorn K., Kawasaki Y., Sakuma T., and Nemoto N. (2010) Potent modification of inducible CYP1A1 expression by flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**: 1698—1703, 査読有.
- ④ Kawasaki Y., Sakuma T., Goto Y., and Nemoto N. (2010) Regulatory xenobiotic responsive elements in the distal 5'-flanking region of the mouse *Cyp1a2* gene required for transcriptional activation by 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Drug Metab. Dispos.*, **38**: 1640-1643, 査読有.
- ⑤ Jarukamjorn K., Kondo S., Chatuphonprasert W., Sakuma T., Kawasaki Y. and Nemoto N. (2010) Gender-associated modulation of inducible CYP1A1 expression by andrographolide in mouse liver. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **39**: 394-401, 査読有.
- ⑥ Jaruchotikamol A, Takase A, Ito S, Kawasaki Y., Kondo S, Sakuma T., and Nemoto N. (2009) Alteration of acetaminophen-induced cytotoxicity in

mouse hepatocytes during primary culture. *J. Health Sci.*, **55**: 767-776, 査読有.

- ⑦ Hashita T., Sakuma T., Akada M., Nakajima A., Yamahara H., Ito S., Takesako H., and Nemoto N. (2008) Forkhead box A2-mediated regulation of female-predominant expression of the mouse *Cyp2b9* gene. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 1080-1087, 査読有.
- ⑧ Sakuma T., Bhadhprasit W., Hashita T., and Nemoto N. (2008) Synergism of glucocorticoid hormone with growth hormone for female-specific mouse *Cyp3a44* gene expression. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 878-884, 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 佐久間 勉, 池松 怜美, Bhadhprasit Wattanaporn, 河崎 優希, 根本 信雄: マウス *Cyp3a41* 遺伝子構造と HNF4 α による性特異的発現. 日本薬学会北陸支部第 122 回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- ② 佐久間 勉, 池松 怜美, Bhadhprasit Wattanaporn, 河崎 優希, 近藤 佐千子, 根本 信雄: メスマウス肝での *Cyp3a41* 遺伝子発現におけるクロマチン構造と HNF4 α の役割. 日本薬物動態学会第 25 回年会, 2010, 10, 6-9, 東京.
- ③ 佐久間 勉, Bhadhprasit Wattanaporn, 河崎 優希, 近藤 佐千子, 根本 信雄: マウス *Cyp3a41* 遺伝子メス特異的発現の調節機構. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- ④ Kawasaki Y., Yuma Goto, Sakuma T. and Nemoto N.: Regulatory XREs in distal 5'-flanking region of the mouse *Cyp1a2* gene for transcriptional activation by 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 18th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2010, 5, 16-20, Beijing.
- ⑤ Sakuma T., Bhadhprasit W., Kawasaki Y., and Nemoto N.: Role of hepatocyte nuclear factor 4 alpha and chromatin structure in the regulation of female-specific *Cyp3a41* gene expression. 18th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2010, 5, 16-20, Beijing.
- ⑥ Bhadhprasit Wattanaporn, 佐久間 勉, 河崎 優希, 根本 信雄: グルココルチコイドによる *Cyp3a41* 遺伝子の発現調節機構: Glucocorticoid receptor および Hepatocyte nuclear factor-4 α の役割. 日本薬学会第 129 年会, 2009, 3, 26-28, 京都.

- ⑦Bhadhprasit Wattanaporn, 佐久間勉, 根本信雄 : Glucocorticoid-mediated induction of mouse *Cyp3a41* gene expression; involvement of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4 alpha , 第23回日本薬物動態学会年会, 2008, 10, 30-11, 1, 熊本.
- ⑧根本信雄, 古澤裕之, 上野真一, 佐久間勉 : メス優位に発現するマウス *Cyp3a41* 遺伝子転写過程における HNF4 α の役割. 第15回肝細胞研究会, 2008, 6, 27-28, 静岡.
- ⑨ 古澤之裕, 佐久間勉, 上野真一, Bhadhprasit Wattanaporn, 坂下真大, 根本信雄 : マウス *Cyp3a41* の性特異的発現における HNF4 α の役割. 日本薬学会第128年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.
- ⑩Bhadhprasit Wattanaporn, 佐久間勉, 赤田真美, 根本信雄 : グルコルチコイドによる *Cyp3a41* 遺伝子の調節機構 : C/EBP の役割. 日本薬学会第128年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
准教授

研究者番号 : 30250468

(2) 研究分担者

根本 信雄 (NEMOTO NOBUO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
教授

研究者番号 : 10085631

河崎 優希 (KAWASAKI YUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
助教

研究者番号 : 30432107