

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590170

研究課題名(和文) CYP3A遺伝子クラスター導入マウスを用いたヒトにおける性差の研究

研究課題名(英文) Study for sex differences of CYP3A enzymes using trans-chromosomal mice containing a human CYP3A gene cluster

研究代表者

小林 カオル(Kobayashi, Kaoru)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30255864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3Aヒト化マウスを用いた検討により、肝におけるCYP3A4の発現量には性差が存在するが、小腸においては存在しないこと、およびエストロゲンによりCYP3A4の発現が正に制御されていることが示唆された。しかし、エストロゲンによるCYP3A4の制御メカニズムはエストロゲン受容体の直接的な作用とは異なると考えられた。さらに、肝ではCYP3A4の誘導作用に性差が認められるのに対し、小腸ではそのような性差が認められないことが明らかとなった。以上より、これまでヒトでは詳細な解析が困難であったCYP3A発現における性差が、CYP3Aヒト化マウスにおいて検証された。

研究成果の概要(英文)：Results of this study using trans-chromosomal mice containing a human CYP3A gene cluster suggested that expression of CYP3A4 in liver shows sex differences and is positively regulated by estradiol. However, it is unlikely that estradiol directly regulates the CYP3A4 expression via estrogen receptor alpha. In addition, it was suggested that there are sex differences in induction of CYP3A4 expression in liver. Interestingly, no sex difference was observed in the intestinal expression and induction of CYP3A4. These findings demonstrated that sex differences in the hepatic expression of CYP3A4 are observed in trans-chromosomal mice containing a human CYP3A gene cluster, although it is hard to analyze the sex differences in human.

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：CYP3A 遺伝子導入 性差

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 実験動物であるラットと異なり、ヒトの薬物代謝には明確な性差の報告はない。しかし、一部の薬物の臨床効果には著しい性差が認められ、その原因として薬物代謝の性差の可能性が示唆されている。例えば、脂質過酸化抑制薬であるチリラザドの効果は男性患者のみに認められ、女性患者ではプラシーボとの間に差が認められない。このチリラザドの臨床効果の性差は、チリラザドが主にシトクロム P450 3A (CYP3A) によって代謝されることから、女性の CYP3A 活性が男性よりも高いことによると考えられている。

(2) これまでの報告によれば、ヒト肝組織における CYP3A mRNA 量と CYP3A タンパク量、およびヒト肝ミクロソームにおける CYP3A 活性はいずれも女性の方が男性より高い。また、ヒト *in vivo* における CYP3A 活性のバイオマーカーとして知られる血中 4 $\beta$  水酸化コレステロール濃度も女性の方が男性よりも高い値を示す。これらの知見は女性における CYP3A の活性が男性よりも高いことを示している。しかし、CYP3A の基質となる薬物の代謝クリアランスと性差との関係に関する報告は必ずしも一定の傾向を示さない。例えば、代表的な CYP3A の基質であるミダゾラムのクリアランスには性差があるという報告と無いという報告が混在している。しかし、メタアナリシスの結果によれば、静脈内投与時のミダゾラムのクリアランスには性差があり、女性の方が男性より高いのに対し、経口投与時のクリアランスには性差が認められない。このことは、静脈内投与時におけるクリアランスの主要な決定要因である肝の CYP3A 活性には性差があり、女性の方が男性よりも高いためにクリアランスには性差が認められるが、経口投与時の初回通過効果に大きな影響を与える腸管の CYP3A 活性には性差がないか小さいために、腸管と肝の両方に依存する経口投与時のクリアランスには性差が認められないという可能性を示唆している。

(3) CYP3A の基質であるチリラザドの静脈内投与時のクリアランスは若い女性では若い男性に比較して有意に高いが、その差は閉経期を過ぎた高齢女性では消失する、さらに、CYP3A によって代謝される抗 HIV 薬のクリアランスは妊娠時に増加する。これらの知見は、CYP3A の発現が女性ホルモンによって正に制御されている可能性を示唆する。

(4) このように、CYP3A 活性の性差を示唆する知見がいくつか報告されているものの、ヒトは遺伝的に雑種であり、環境要因も異なるため CYP3A の発現には大きな個体差が存在する。さらに、動物実験のように侵襲や負荷をとまなう研究をヒトで実施することもできない。このため、ヒトでは CYP3A による薬物代謝の性差の原因は未だに明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) ヒトの CYP3A には性

差が存在し、若い女性では男性よりも高い発現を示し、(2) この差はおもに腸管ではなく肝臓における CYP3A の発現量の差によるものであり、(3) これらの現象は女性ホルモンによって制御されている、という可能性について、上流域を含むヒト CYP3A 遺伝子クラスターを導入発現させた CYP3A ヒト化マウスを用いて検証することである。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物：マウス内在性 *Cyp3a* 遺伝子群をノックアウトしたバックグラウンドを持つマウスとヒト人工染色体 (HAC) ベクターシステムを用いてヒト CYP3A 遺伝子クラスターを導入した CYP3A ヒト化マウスを交配して得られた雌雄 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウス (10 および 40 週令) を用いた。本研究は実験動物の取り扱いガイドラインに従って行われ、千葉大学および鳥取大学の動物実験委員会において承認された。

(2) トリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性の測定：雌雄 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝および小腸より常法に従ってミクロソーム画分を調製した。酵素反応は、トリアゾラム (最終濃度 0.2 mM) を基質とし、ミクロソームと 30 分間インキュベーションした。除蛋白後のサンプルを HPLC に注入し、代謝物量を測定することにより活性を求めた。

(3) mRNA 量の測定：肝および小腸より抽出した total RNA を逆転写し、real-time PCR 法により増幅産物の検出を行った。各遺伝子の mRNA 量は GAPDH の mRNA 量により補正した。

(4) エストロゲン投与：17 $\beta$ -エストラジオール安息香酸塩をコーン油に溶解し、0.2 mg/kg/day の用量で雄性 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウス (10 週令) に 7 日間皮下投与した。対照群にはコーン油を投与した。

(5) HepaRG 細胞へのエストロゲンおよび成長ホルモンの曝露：分化させた HepaRG 細胞をコーン油コートしたプレートに播種し、72 時間培養した。その後、細胞に 17 $\beta$ -エストラジオールを 48 時間曝露した。成長ホルモンは、播種後 72 時間培養した細胞に、20 mg/mL の濃度で pulse 型あるいは constant 型で曝露した。Pulse 型は成長ホルモン存在下で 1 時間、非存在下で 11 時間の培養を 2 日間とした。Constant 型は成長ホルモン存在下で 2 日間培養することとした。

(6) CYP3A 誘導剤の投与：CYP3A 誘導剤であるプレグネノロン 16 $\alpha$  カルボニトリル (PCN) をコーン油に溶解し、100 mg/kg/day の用量で雌雄 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウス (10 週令) に 4 日間腹腔内投与した。対照群にはコーン油を投与した。

## 4. 研究成果

### (1) CYP3A 活性の性差

10 週令の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスより調製した肝ミクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性は、雌の方が雄よりも約 2

倍高い値を示した (図 1)。一方、同じマウスの小腸マイクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性に雌雄間で有意な差異は認められなかった。また、40 週令の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスより調製した肝及び小腸マイクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性は、雌雄間で差異を示さなかった。

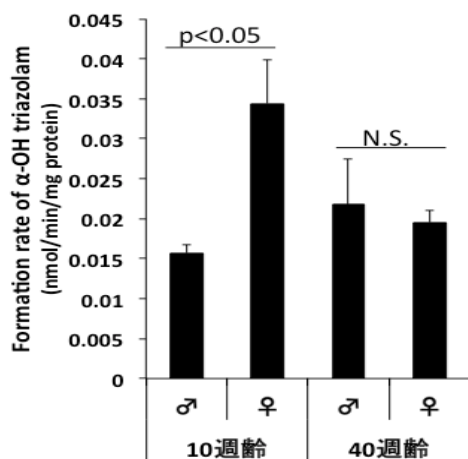


図 1 10 週令および 40 週令の雌雄 CYP3A-HAC マウスの肝マイクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性

#### (2) CYP3A4 発現量の性差

10 週令の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝における CYP3A4 mRNA 発現量は、雌の方が雄よりも約 5 倍高い値を示した (図 2)。一方、同じマウスの小腸における CYP3A4 mRNA 発現量に雌雄間で差異は認められなかった。また、40 週令の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝及び小腸における CYP3A4 mRNA 発現量も、雌雄間で差異を示さなかった。

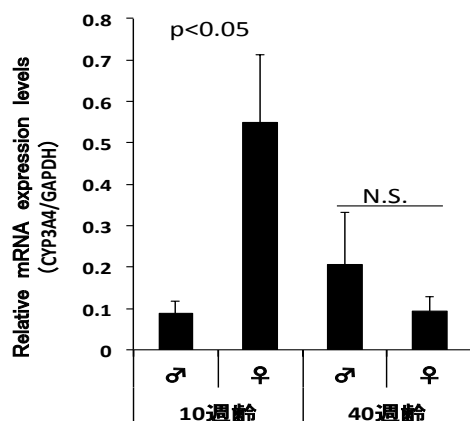


図 2 10 週令および 40 週令の雌雄 CYP3A-HAC マウスの肝における CYP3A4 mRNA 発現量

#### (3) エストラジオール投与による CYP3A4 発現

#### 量および CYP3A 活性への影響

10 週令の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝における CYP3A4 の発現と活性に性差が認められたことから、10 週令の雄性 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスにエストラジオールを投与し、トリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性および CYP3A4 mRNA 発現量への影響を検討した。肝マイクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性は、エストラジオール投与群が対照群の約 2 倍高い値を示した。同様に、肝における CYP3A4 mRNA 発現量もエストラジオール投与群が対照群の約 2 倍高い値を示した (図 3)。一方、小腸における CYP3A4 mRNA 発現量についてはエストラジオール投与群が対照群よりも低い値を示す傾向が認められた。また、肝におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の mRNA 発現量も CYP3A4 mRNA と同様にエストラジオール投与群が対照群よりも有意に高い値を示した。一方、小腸におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の mRNA 発現は検出限界以下であった。

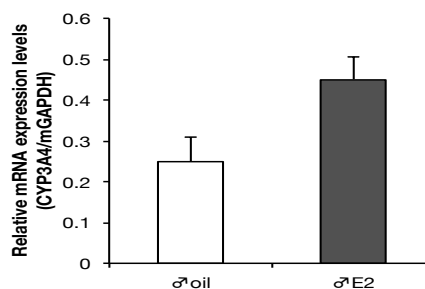


図 3 雄性 CYP3A-HAC マウスへのエストラジオール投与による肝 CYP3A4 mRNA 発現量への影響

#### (4) HepaRG 細胞における CYP3A4 発現量に及ぼすエストラジオールの影響

CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスへエストラジオールを投与することにより肝における CYP3A4 mRNA 発現量の増加が認められたことから、エストラジオールが CYP3A4 の発現を増加させる可能性が考えられた。そこで、ヒト肝ガン由来 HepaRG 細胞にエストラジオールを曝露し、CYP3A4 発現量の変化を検討した。エストロゲン受容体  $\alpha$  を活性化する濃度 (0.1  $\mu$ M) のエストラジオールは CYP3A4 mRNA の発現量を増加させず、プレグナン X 受容体を活性化する濃度 (1 および 10  $\mu$ M) で CYP3A4 mRNA 発現量を有意に増加させた。

#### (5) HepaRG 細胞における CYP3A4 発現量に及ぼす成長ホルモンの影響

HepaRG 細胞における CYP3A4 mRNA 発現量が 0.1  $\mu$ M のエストラジオールでは増加しなかったことから、成長ホルモン曝露の影響を検討した。雌型の成長ホルモン分泌パターンである constant 型で成長ホルモンを曝露した際には CYP3A4 mRNA の発現量は変化せず、雄型

の分泌パターンである pulse 型で成長ホルモンを曝露した際には CYP3A4 mRNA の発現量が減少した。なお、成長ホルモン受容体の発現量は、constant 型で成長ホルモンを曝露した際に増加した。

#### (6) CYP3A 誘導における性差

非誘導時の CYP3A4 発現に性差が認められたことから、誘導剤投与による影響に性差が認められるかを検討した。CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスより調製した肝ミクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性は、雌雄ともに PCN 投与により上昇したが、その上昇は雄性 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスと雌性 CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスでそれぞれ 18 倍および 6 倍であり、誘導の程度は雄が雌よりも大きかった(図 4)。肝における CYP3A4 mRNA 発現量も、PCN 投与により雌雄ともに増加したが、その増加の程度は雄性および雌性マウスでそれぞれ 42 倍および 14 倍と、雄が雌よりも大きかった。一方、小腸ミクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性は、雌雄ともに PCN 投与による上昇は 3 倍程度であり、雌雄間の差異も小さかった。

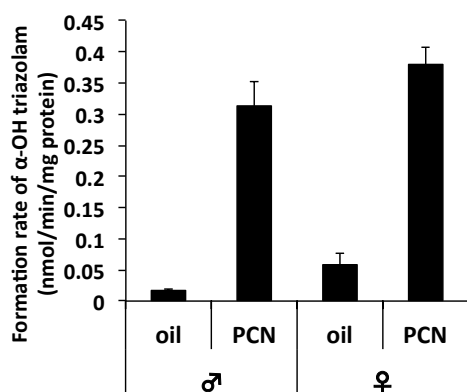


図 4 雌雄 CYP3A-HAC マウスの肝ミクロソームにおけるトリアゾラム  $\alpha$  位水酸化活性の PCN 投与による影響

#### (7) まとめ

CYP3A ヒト化マウスを用いた検討により、肝における CYP3A4 の発現量には性差が存在するが、小腸においては性差が存在しないことが示唆された。また、エストロゲンにより CYP3A4 の発現が正に制御されていることが示唆された。しかし、エストロゲン受容体  $\alpha$  を活性化する濃度のエストラジオールでは CYP3A4 mRNA 発現量が増加しなかったことから、エストロゲンによる CYP3A4 の制御メカニズムはエストロゲン受容体  $\alpha$  の直接的な作用とは異なる可能性が考えられた。今回の研究では、雄型の成長ホルモン分泌パターンである pulse 型で成長ホルモンを曝露した際に HepaRG 細胞における CYP3A4 mRNA の発現減少が認められたことから、CYP3A4 の発現における性差には成長ホルモンの分泌パター

ンが関与している可能性が考えられた。さらに、肝では CYP3A4 の誘導作用に性差が認められるのに対し、小腸ではそのような性差が認められないことが明らかとなった。以上より、これまでヒトでは詳細な解析が困難であった CYP3A の発現における性差が、上流域を含むヒト CYP3A 遺伝子クラスターを導入発現させた CYP3A ヒト化マウスにおいて検証された。今後、性差を生じるメカニズム解明にも本ヒト化マウスは有用であると期待される。

#### 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 1 件)

(1) Hashimoto M, Kobayashi K, Watanabe M, Kazuki Y, Takehara S, Inaba A, Nitta S, Senda N, Oshimura M, Chiba K. Knockout of mouse Cyp3a gene enhances synthesis of cholesterol and bile acid in the liver. J Lipid Res. Vol. 54, No. 8, 2013, pp. 2060-2068. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

(1) Mika Endo, Mio Watanabe, Kaoru Kobayashi, Yasuhiro Kazuki, Yuki Yamasaki, Shoko Takehara, Mitsuo Oshimura, and Kan Chiba, Sex-dependent Differences of CYP3A4 Expression in CYP3A-HAC Mice 50th Anniversary Symposium On Cytochrome P450, 2012/12/2~3, FUKUOKA, JAPAN

(2) 遠藤美佳、小林カオル、山崎由貴、稲葉明日実、阿部千尋、香月康宏、嵩原昇子、押村光雄、千葉寛、エストロゲンによる肝 CYP3A4 発現誘導メカニズム、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20~22、東京

(3) 遠藤美佳、渡邊未央、小林カオル、香月康宏、山崎由貴、嵩原昇子、押村光雄、千葉寛、ヒト人工染色体ベクターを用いて作製した CYP3A-HAC マウスにおけるヒト CYP3A4 発現の性差、日本薬物動態学会第 26 回年会、2011/11/16~18、広島

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakubutu/framepage4.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 カオル (KOBAYASHI, Kaoru)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：30255864

##### (2) 連携研究者

香月 康宏 (KAZUKI, Yasuhiro)  
鳥取大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90403401