

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658116

研究課題名(和文)食品中の非変異原性発がん化合物による薬物代謝酵素のエピジェネティック制御

研究課題名(英文)Molecular regulation of epigenetics of the cytochrome P450 genes by food chemicals

研究代表者

今石 浩正 (Imaishi, Hiromasa)

神戸大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：50223318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：有用な生体触媒であるP450は、医薬、化成品などの酸化反応を触媒する事が知られている。特に、P450はガンに関与する様々な化学物質を代謝活性化することが知られている。変異原性を持つ化学物質は、P450などの酵素により生体内変化を受けて変異原性化学物質へと変化する事が明らかになっている。一方、変異原性を示さない発ガン性化学物質については、その作用機作が不明であった。本研究では、食品由来の非変異原性物質であるイソチオシアネートが、P450のプロモーターへと作用する事で、P450の発現量を変動させる事を見出した。

研究成果の概要(英文)：It is known that P450 which is a useful biological catalyst can carry out the mono oxygenation of the medicine and chemicals. Especially P450 can carry out metabolic activation of various chemical substances which participate in the generation of cancer cells. We know that the chemical substance with has mutagenicity can increase the cancer cells in our body. In general, these mutagenic chemicals are metabolic activated by P450 monooxygenase. On the other hand, there is a little information about the mechanism for the activation of non-mutagenic chemicals. In this research, we show that the isothiocyanate which is a non-mutagenicity substance of food origin can regulate the total amount of mRNA of P450.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学・食品安全性

キーワード：P450

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトが生活をする上で食品成分は必要不可欠であるが、近年、一部の食品成分中には、栄養素として吸収された後に生体内酵素により代謝される事で、代謝的活性化を受け、変異原性や発がん性といったヒトに対して悪影響を及ぼす化学物質へと変化することが知られている(加藤ら, 薬物代謝学第3版, 東京化学同人, 176; Shu-Feng et al. 2007)。これら化学物質に対する毒性評価の手法としては、現在、サルモネラ菌を用いたエイムス試験やウムラック試験といった変異原性試験が利用されている。食品成分には、非変異原性発がん物質と呼ばれる変異原性を示さないが発がんを誘導するものがあり、どのような過程を経てこれら化合物がヒトへとガンを生じさせるのかについては明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

現在、変異原性を示す発がん物質による発がんメカニズムは明らかになっているが、一方、一部の食品成分などの非変異原性発がん物質による発がんメカニズムは解明されていない。

本研究では、これら変異原性を示さない非変異原性発がん物質が、直接代謝活性化を通して変異原性を示すのではなく、発がん化学物質の代謝活性化に関与する P450 の転写を制御する転写調節剤として作用し、その結果細胞内の発がん物質の総量が変化するのは無いかとの仮説を立て研究を行った。

### 3. 研究の方法

ヒト肝臓がん由来培養細胞株である HepG-2 に ITC 類の溶媒として用いた DMSO をおよび、本研究で用いた各 ITC を混合した培地に曝露させ、24 時間毎に培地交換し計 72 時間インキュベートした。ITC 類を曝露した培養細胞から totalRNA を抽出し、逆転写によって得た cDNA を用いて、定量 PCR で分析した。ITC 類の溶媒として用いた DMSO を添加した際の各 P450 遺伝子の発現量を基準とし、各 ITC 添加時における相対的な各 P450cDNA の増幅倍率を求めた。

### 4. 研究成果

我々が摂取している食品成分や食品添加物の一部には栄養素として吸収された後に、生体内酵素により代謝されることで、代謝活性化を受け、変異原性や発がん性といったヒトへの悪影響を示す物質もある。特に発がん性を示す物質は、大きく変異原性発がん物質と非変異原性発がん物質に分類される。変異原性発がん物質に対して、非変異原性発がん物質はその発がんメカニズムの詳細は明らかでない。また、遺伝子上流領域に存在するプロモーター領域のメチル化量によって、遺伝子の発現量が変化するなどの、後天的な遺伝子発現の制御(エピジェネティクス)に

対する知見が集まりつつある。特に、P450 遺伝子のエピジェネティック制御に関する研究報告は最近増加しており、新しい知見への期待が高まっている。そこで、本研究では、非変異原性発がん物質に分類される食品成分の1つである ITC 類が、直接代謝活性化を通して変異原性を示すのではなく、発がん化学物質の代謝活性化に関与する P450 の転写を制御する転写調節剤として作用し、その結果細胞内の発がん物質の総量が変化するのは無いかとの仮説を立て、P450 遺伝子の転写量に与える影響や、細胞内の DNA メチル化量を変化させることによる、P450 遺伝子の発現量とエピジェネティックな発現制御機構との関連性に着目した。

以上の研究背景から、本研究は、ヒト培養細胞中に存在する P450 遺伝子の食品成分や食品関連化合物に対する発現応答や、その際の細胞内における DNA メチル化量の変化による、P450 遺伝子の発現量変化を解析することにより、非変異原性発がん物質によって生じる発がんへの分子機構に関する知見を得た。

ヒト肝臓がん由来培養細胞株である HepG-2 に ITC 類の溶媒として用いた DMSO をおよび、本研究で用いた各 ITC を混合した培地に曝露させ、24 時間毎に培地交換し計 72 時間インキュベートした。ITC 類を曝露した培養細胞から totalRNA を抽出し、逆転写によって得た cDNA を用いて、定量 PCR で分析した。ITC 類の溶媒として用いた DMSO を添加した際の各 P450 遺伝子の発現量を基準とし、各 ITC 添加時における相対的な各 P450cDNA の増幅倍率を求めたところ、CYP1A2 遺伝子において、methyl ITC 50  $\mu$ M, ethyl ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IP ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, hexil ITC 1  $\mu$ M を添加した場合に、発現が誘導され、allyl ITC 1  $\mu$ M, 100nM, methyl ITC 100  $\mu$ M, PE ITC 1  $\mu$ M, 100nM, buthyl ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, SB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, MP ITC 10  $\mu$ M, PY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, BY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M を添加した場合に、発現が抑制された。hexil ITC 10  $\mu$ M 添加時においては、変化率が 10%以下と低い値を示した。一方、CYP2C9 遺伝子において、ethyl ITC 10  $\mu$ M, hexil ITC 1  $\mu$ M, buthyl ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, SB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, MP ITC 10  $\mu$ M, PY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, BY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M を添加した際に、P450 遺伝子の発現誘導が観察された。しかしながら、methyl ITC 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, ethyl ITC 100  $\mu$ M, IP ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, PE ITC 1  $\mu$ M, 100nM, allyl ITC 1  $\mu$ M, 100nM, hexil ITC 10  $\mu$ M の添加時においては、変化率は 20%以下と低い値を示した。CYP3A4 遺伝子において、buthyl ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, SB ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M を添加した場合に、発現が誘導され、methyl ITC 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, ethyl ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IP ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, PE ITC 1  $\mu$ M, 100nM, allyl ITC 1  $\mu$ M, hexil ITC

10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, MP ITC 10  $\mu$ M, PY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, BY ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M を添加した場合に、発現が抑制された。allyl ITC 100nM 添加時に関しては、変化率は 30%以下と低い値を示した。

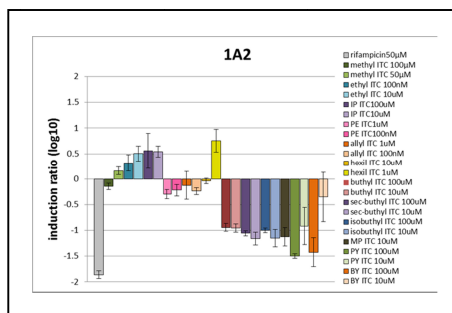


図 1 定量 PCR 解析結果の一例

HepG-2 細胞内の P450 遺伝子の発現量が変化することを示す本実験結果は、ITC が P450 遺伝子のプロモーター領域に対して何らかの分子メカニズムを介して、遺伝子発現調節に関与している可能性が示唆された。また、ITC による各 P450 遺伝子の発現量の変化が、各遺伝子の上流領域に存在するプロモーターのメチル化量が変化したに基づくかを解析する為に、各 ITC 類を添加後に、強力な脱メチル化剤である 5-aza-dC を添加し、各 P450 遺伝子の発現量がどのように変化するかを、定量 PCR を用いて解析した。5-aza-dC 非添加の培養細胞由来の P450cDNA の増幅倍率を基準とし、相対的な P450cDNA の増幅倍率を求めたところ、CYP1A2 遺伝子において、5-aza-dC 0.5  $\mu$ M を添加した場合、buthyl ITC 10  $\mu$ M 添加時の発現誘導が観察された。一方、MP ITC 10  $\mu$ M, PY ITC 10  $\mu$ M 添加時には CYP1A2 遺伝子の発現が抑制された。一方、上記以外の ITC を添加した際には、変化率は 20%以下と低い値を示した。5-aza-dC 5  $\mu$ M を添加した場合、PE ITC 1  $\mu$ M, 100nM, hexyl ITC 10  $\mu$ M 添加時には CYP1A2 遺伝子の発現が誘導された。一方、methyl ITC 100  $\mu$ M, ethyl ITC 100  $\mu$ M, IP ITC 10  $\mu$ M, MP ITC 10  $\mu$ M, PY ITC 10  $\mu$ M 添加時には、CYP1A2 遺伝子の発現が抑制された。また、上記以外の ITC 添加時には変化率は 20%以下と低い値を示した。CYP2C9 遺伝子において、5-aza-dC 0.5  $\mu$ M を添加した場合、SB ITC 100  $\mu$ M 添加時の発現抑制が観察された。また、上記以外の ITC の添加時には変化率は 20%以下と低い値を示した。さらに、5-aza-dC 5  $\mu$ M を添加した場合、buthyl ITC 10  $\mu$ M, SB ITC 100  $\mu$ M 添加時における CYP2C9 遺伝子の発現は抑制された。また、上記以外の ITC 添加時の変化率は 20%以下と低い値を示した。CYP3A4 遺伝子において、5-aza-dC 0.5  $\mu$ M を添加した場合、IP ITC 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, buthyl ITC 10  $\mu$ M, SB ITC 100  $\mu$ M 添加時の発現抑制が観察された。また、上記以外の ITC の添加時には変化率は 30%以下と低い値を示した。また、

5-aza-dC 5  $\mu$ M を添加した場合、allyl ITC 100nM, IB ITC 100  $\mu$ M, BY ITC 10  $\mu$ M 添加時には CYP3A4 遺伝子の発現が誘導された。また、上記以外の ITC 添加時には、変化率は 30%以下と低い値を示した。強力な脱メチル化剤である 5-aza-dC と ITC 類の共添加によって、各 P450 遺伝子の発現量は大きく変化しなかったことを示す本研究結果は、ITC による P450 遺伝子の発現量変化には、各遺伝子上流領域に含まれるプロモーター領域における、メチル化量の変化が関与起因しない可能性を示した。一方、CYP1A2 遺伝子において、5-aza-dC 添加によって、MP ITC 10  $\mu$ M 添加時の発現量が著しく抑制されているという結果が得られた。本結果は、CYP1A2 遺伝子の上流領域に、CYP1A2 遺伝子の発現を抑制する遺伝子配列が存在している可能性を示唆している。すなわち、CYP1A2 抑制遺伝子の上流領域にあるプロモーターが脱メチル化され、発現が誘導されることで、CYP1A2 遺伝子の発現が抑制された可能性が示唆された。また、CYP 遺伝子の発現には、CYP 遺伝子の上流領域にあるプロモーターのメチル化量変化以外にも、異なる発現調節機構が存在している可能性が示唆された。以上のことから、今後は、各 P450 遺伝子の上流領域に存在する転写因子のプロモーター領域において、DNA メチル化量の調査をする必要がある。

## 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 6 件)

Yajima, D., Ohkawa, T., Muroi, K., Imaishi, H., Predicting Toxicity of Food-Related Compounds Using Fuzzy Decision Trees, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 4(1), 33-38 2013 年,査読有

Uno, T., Obe, Y., Ogura, C., Goto, T., Yamamoto, K., Nakamura, M., Kanamaru, K., Yamagata, H., Imaishi, H., Metabolism of 7-ethoxycoumarin, safrole, flavanone and hydroxyflavanone by cytochrome P450 2A6 variants., Biopharm. Drug Dispos., 34 (2), 87-97 2012 年,査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

室井康平、森大気、後藤達志、澤田夏美、今石浩正、ヒト P450 発現大腸菌を用いた Umu-test による食品関連化合物の変異原性、P450, UGT, SALT 研究会、宮崎、2013-0606

今石浩正、P450 反応パターン解析を用いた食品関連化合物の毒性予測、P450, UGT, SALT 研究会、宮崎、2013-0606

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-n  
owstone/index.html](http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-n<br/>owstone/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今石 浩正 (IMAISHI Hiromasa)

神戸大学・遺伝子実験センター・教授

研究者番号：50223318