

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08390

研究課題名(和文) 生体要因による薬物動態の変動：サイトカインシグナルを介した調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanism for pharmacokinetic alteration caused by pro-inflammatory cytokines

研究代表者

児玉 進 (Kodama, Susumu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20621460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症を伴う病態時、薬物応答性を規定する薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現が著しく損なわれることが知られている。しかし、それらの発現抑制機構の詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、*in vitro*解析系を用いて、炎症性サイトカインIL-6に応答したヒトCYP1A2およびCARの発現抑制機構を解析した。その結果、これらの遺伝子プロモーター領域には、IL-6応答性転写因子DEC1が転写抑制に作用することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生体側の要因が薬物動態に影響与えることが知られている。本研究では、炎症を伴う病態時に炎症性サイトカインによって引き起こされる薬物動態の変動機構の一端を明らかにした。さらに近年、免疫系に作用するバイオ医薬品の開発・普及が進む中、それらの従来の低分子医薬品との相互作用リスク回避の観点において、有用な情報を提供すると考える。

研究成果の概要(英文)：Under pathological conditions associated with inflammation, the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters that regulate drug response is markedly down-regulated. However, details of the mechanism underlying their down-regulation are still unknown. In this study, we have investigated the molecular mechanisms by which pro-inflammatory cytokine IL-6 regulates human CYP1A2 and CAR expression, utilizing *in vitro* system. Our results show that the IL-6 responsive transcription factor DEC1 could act as a common repressor on their promoters.

研究分野：衛生薬学

キーワード：薬物動態 炎症性サイトカイン 遺伝子発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素や薬物トランスポーターなど薬物動態関連因子は、薬物の体内動態を左右する重要な役割を担う。よって、薬物動態関連因子の発現変動は、薬物応答性(薬効や副作用の発現、薬物間相互作用)と密接に関連する。薬物動態関連因子の発現は、体外からの薬物曝露のほか、生理学および病態生理学的な要因によって変動を受ける。特に、感染症や癌などの炎症を伴う病態ではそれらの発現が著しく損なわれて、薬物クリアランスが低下することが報告されている。これまでの関連研究から、免疫細胞や癌細胞が産生・分泌した炎症性サイトカインが、肝、腸管細胞に作用して薬物動態関連因子やそれらの発現調節を担う薬物応答性転写因子の発現を普遍的に抑制することなどの知見が集積されつつある。しかし、依然として、その抑制機構の詳細には不明な点が多い。さらに近年、バイオ医薬品の開発・普及が急速に進んでいる。臨床研究などから、これらの中で免疫機能に作用するものは、薬物代謝酵素の発現を変動させることが示されている。つまり、新たにバイオ医薬品と従来の低分子医薬品との間に相互作用が発現する可能性がある。したがって、薬物応答性を規定する薬物動態関連因子の炎症性サイトカインに応答した発現変動の調節メカニズムを明らかにすることは、薬物動態や薬物応答性のより的確な予測に繋がり、薬物療法の最適化へ向け有用な情報を提供すると考える。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト肝癌由来細胞株を用いた *in vitro* 解析モデルを確立して、炎症性サイトカインに応答した薬物動態関連因子および薬物応答性転写因子の発現を抑制する調節メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肝癌由来細胞株の培養と IL-6 刺激処理

HepaRG 細胞は、代謝試験用プロトコールに従い前培養した後、炎症性サイトカインを含む培地中で 24 時間刺激処理した。HepG2 細胞は、48 時間培養後、IL-6 を含む FBS 非含有培地中で 24 時間処理した。細胞から総 RNA を抽出して cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて目的遺伝子の mRNA 発現レベルを測定した。

### (2) ヒト CYP1A2 および CAR の遺伝子プロモーター領域の解析

#### レポーターコンストラクトの作製

ヒト *CAR* 遺伝子については、ヒトゲノム DNA を鋳型に用い、PCR 法によりプロモーター領域を単離してレポーターコンストラクトを構築した。ヒト *CYP1A2* 遺伝子については、静岡県立大学 吉成浩一博士から分与して頂いたヒト *CYP1A2* レポーターコンストラクトから PCR 法により該当する領域を単離して構築した。また、各種の変異型レポーターコンストラクトは部位特異的変異導入法で作製した。

#### ヒト DEC1 発現プラスミドの作製

IL-6 処理した HepG2 細胞の cDNA サンプルを鋳型に用い、PCR 法により DEC1 cDNA を単離して発現プラスミドを作製した。DNA 結合領域を欠失した DEC1 変異体は、部位特異的変異導入法で作製した。

#### レポーターアッセイ

適当な組み合わせのレポーターコンストラクトと発現プラスミドを HepG2 細胞に導入後、FBS 非含有培地中で 24 時間刺激処理し、レポーター活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) *in vitro* 解析モデルにおける IL-6 応答性

HepaRG はヒト初代肝細胞に近い特徴を保持し、高い薬物代謝酵素活性を有することが知られている。HepaRG 細胞に IL-6 の刺激処理を行い、主要な薬物動態関連因子 (CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1、MDR1 を含む 11 種) の mRNA 発現変動を解析した。その結果、それらの間で応答性 (抑制強度、反応速度) が異なるものの、測定した全ての mRNA 発現量が著しく減少した。また、PXR や CAR など、これらの転写調節を担う 8 種の転写因子についても同様に減少していた。次いで、HepG2 細胞に同様の処理を行い、一連の薬物動態関連因子および転写因子の mRNA 発現

変動を解析した。その結果、それらの多くで IL-6 刺激に応答した mRNA 発現量の有意な減少が認められた中、薬物代謝酵素 CYP1A2 と薬物応答性転写因子 CAR の発現減弱の程度が大きかった。

### (2) CYP1A2 および CAR 遺伝子のプロモーター領域の IL-6 応答性

次に、IL-6 刺激に応答して、転写レベルで起こるヒト CYP1A2 および CAR 遺伝子の発現変動の調節メカニズムを明らかにするために、両遺伝子の転写開始点より上流のそれぞれ約 1 kb、5 kb のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、HepG2 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、両遺伝子のプロモーター領域の構成的な転写活性が、IL-6 刺激に応答して有意に減弱した。さらに、それぞれのプロモーター領域の 5' 上流側を段階的に欠失させたレポーターコンストラクトを複数作製し、IL-6 応答性領域の同定を行なった。その結果、CYP1A2 および CAR 遺伝子のプロモーター領域、何れも転写開始点の近傍約 300 bp 以内に IL-6 応答性に重要な配列が存在することが示唆された。

これまでに Zhao らにより、IL-6 刺激により発現誘導される転写因子 DEC1 が CYP3A4 遺伝子の転写を抑制することが報告されている。両遺伝子プロモーター領域の塩基配列を精査したところ、それぞれに複数の推定 DEC1 結合配列が見出された。また、HepG2 細胞では、IL-6 刺激後の早期に DEC1 mRNA 発現量が増加し、CYP1A2 と CAR の mRNA 発現量が経時的に減少することを確認した。これらのことから、CYP1A2 および CAR 遺伝子のプロモーター領域の構成的な転写活性の IL-6 刺激に応答した抑制に関わる転写因子として DEC1 に着目した。そこで次に、野生型 DEC1 とその変異体の発現コンストラクトを用いてレポーターアッセイを行なった。野生型 DEC1 を発現させた場合、両プロモーター領域の転写活性化が著しく抑制された。一方、DNA 結合領域を欠失した変異体を発現させた場合、抑制作用は、CYP1A2 プロモーター領域では完全に消失したが、CAR プロモーター領域では半減した。さらに、CYP1A2 の場合、特定の結合配列に変異を導入することで DEC1 応答性が消失した。これらのことから、転写抑制機構は両プロモーター領域で異なり、DEC1 は、CYP1A2 の場合には直接結合を介して、CAR の場合には直接結合と他の因子との相互作用を介して働いていると考えられた。

### (3) DEC1 による CYP1A2 の誘導発現に対する抑制作用

肝臓での CYP1A2 の発現は、薬物応答性転写因子 AhR により転写レベルで制御されることが知られている。そこで、HepG2 細胞に AhR 活性化物質 3MC を処理し、CYP1A2 誘導発現における IL-6 刺激の影響を検討した。その結果、3MC 処理で増加した CYP1A2 の mRNA 発現量が IL-6 刺激で有意に減少した。この場合、AhR の mRNA 発現量は約 2 倍に増加していた。そこで次に、DEC1 がこの誘導発現の抑制に関与するのかを明らかにするため、CYP1A2 の約 300 bp のプロモーター領域に AhR 結合配列を含んだエンハンサー領域を接続したレポーターコンストラクトを作製し、野生型 DEC1 と DNA 結合領域を欠失した変異体の発現コンストラクトを用いてレポーターアッセイを行なった。その結果、野生型 DEC1 のみがプロモーター領域の転写活性を抑制した。さらに、エンハンサー領域の塩基配列を精査した結果、2 つの推定 DEC1 結合配列が見出されたことから、これらとプロモーター領域に見出した推定 DEC1 結合配列の変異コンストラクトを作製して同様の実験を行なった。その結果、3 つ全ての推定 DEC1 結合配列に変異を導入したコンストラクトでのみ、DEC1 応答性が消失した。以上の結果から、DEC1 は、「構成的」な発現に加えて、転写開始点から離れたエンハンサー領域の標的配列への直接結合を介して「誘導的」な発現の抑制にも関与していると考えられた。今後、引き続き、DEC1 の抑制作用に関する詳細な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳田 翔太、吉井 奈穂、森 彩美、小野 敦、児玉 進
2. 発表標題 IL-6刺激に应答した薬物代謝酵素CYP1A2遺伝子の転写抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----