

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21055

研究課題名(和文) 薬剤誘発性糖尿病におけるPXR/SGK2 シグナル経路の機能的役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of PXR-SGK2 signaling in drug-induced diabetes

研究代表者

齊藤 紗希(後藤紗希)(GOTOH-SAITO, Saki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：60756609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：異物応答性核内受容体 PXR は、肝臓でのエネルギー代謝制御における機能的役割が示唆されているが、ヒトにおいてその分子機構は明らかではない。本研究では、ヒト肝癌細胞において薬剤処置により活性化した PXR が細胞内シグナル因子 SGK2 と共に、脂肪酸の酸化関連酵素遺伝子 CPT1A および ACSL1 の発現量を増加させることを見出した。さらに、CPT1A 遺伝子上流領域に薬剤処置依存的な PXR および SGK2 の結合サイトを同定した。これらの成果より、PXR は SGK2 と協調的に作用して脂肪酸の酸化を制御する新たな可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PXR はこれまで薬物動態制御における機能に焦点が置かれてきた。本研究では PXR が SGK2 と協調して脂肪酸の酸化関連酵素遺伝子を制御することを明らかにした。肝臓での脂肪酸の酸化は糖新生の促進に寄与する。したがって、我々がこれまでに報告した PXR/SGK2 経路を介した糖新生制御と関連して、効率的に糖産生を増加させることが、薬剤誘発性糖尿病の発症原因となる可能性が示された。これらの成果は、糖尿病に対する安全性の高い創薬研究に有益な情報を提供するとともに、薬剤誘発性糖尿病の治療戦略に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Xenobiotic-sensing nuclear receptor, pregnane X receptor (PXR) may play a functional role in hepatic energy metabolism. However, the molecular mechanism remains unknown in humans. In this study, we demonstrated that drug-activated PXR increased mRNA expression of fatty acid -oxidation-related genes, including CPT1A and ACSL1 in human hepatocellular carcinoma cells. PXR required serum/glucocorticoid regulated kinase 2 (SGK2) in the regulation. Furthermore, we identified PXR/SGK2 binding site within the 5' upstream region of CPT1A gene in a drug-dependent manner. These results suggest the possibility that PXR utilizes SGK2 to regulate fatty acid -oxidation.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 核内受容体 脂肪酸の酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

核内受容体 pregnane X receptor (PXR) は肝臓に高発現し、多くの医薬品により活性化される転写因子であり、薬物代謝制御における機能的な重要性が広く知られている。PXR ノックアウトマウスを用いた研究から、PXR は糖代謝および脂質代謝などのエネルギー代謝の制御に関与していることが報告されている。エネルギー代謝における PXR の機能的役割を明らかにすることは、医薬品の副次的作用を理解することや、メタボリックシンドロームを代表とする代謝性疾患の治療学分野に有用な知見を与えると考えられる。しかしながら、PXR のリガンド応答性は、動物種間による相違のため、動物試験データをヒトに外挿することが困難であり、ヒトにおける PXR のエネルギー代謝制御の機能的役割は不明な点が残されている。

2012 年に米国食品医薬品局が、高脂血症治療薬スタチン剤の副作用として糖尿病発症リスクの増加を医薬品安全性情報に追記した。しかし、その発症機序は不明である。スタチンは溶解性の違いから水溶性と脂溶性に分類されるが、脂溶性スタチン服用患者の糖尿病の発症リスクが増加することが報告されている。PXR が脂溶性スタチンにより活性化する点に着目したところ、我々はヒト初代培養肝細胞において、スタチン誘導性の糖新生酵素遺伝子の発現亢進および糖産生増加を見出し、PXR と細胞内シグナル因子 serum/glucocorticoid regulated kinase 2 (SGK2) が制御する分子機序を明らかにした。さらに、スタチンに応答した PXR は、糖新生以外のエネルギー代謝にも影響を及ぼす可能性が示唆されたため、生体内における PXR/SGK2 経路の機能的な重要性をさらに明確化することが、スタチン誘発性糖尿病の発症機序の全容解明につながると捉えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、PXR/SGK2 経路依存的な肝臓でのエネルギー代謝関連遺伝子の転写制御機構を解明して、エネルギー代謝における PXR の機能的役割を明確にし、スタチンを代表とする薬剤誘発性糖尿病の発症メカニズムの解明にアプローチすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト PXR の安定発現 HepG2 細胞株 (ShP51 細胞) を用いて、脂溶性スタチンであるシンバスタチン処置後、脂質代謝関連遺伝子の発現に対する影響を検討した。また、PXR および SGK2 の siRNA を用いて、スタチン誘導性発現が認められた脂肪酸の  $\beta$  酸化関連酵素遺伝子 *carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A)* および *long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 (ACSL1)* の mRNA 発現への影響を qRT-PCR 解析により検討した。さらに、*CPT1A* 遺伝子上流に対する PXR および SGK2 のシンバスタチン処置依存的な結合サイトを *in silico* 解析 (転写因子結合領域予測ツール GCG seq) による予測およびクロマチン免疫沈降法により検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) β酸化関連酵素遺伝子の mRNA 発現量に対するスタチン処置の影響

ヒト肝癌由来細胞において、β酸化関連酵素遺伝子である CPT1A および ACSL1 mRNA の発現量がシンバスタチン処置によって増加することを見出した (図 1)。発現誘導率は、PXR 高発現細胞株 ShP51 細胞で大きく、PXR の標的遺伝子 *CYP3A4* および糖新生律速酵素遺伝子 *G6Pase* と同様のパターンを示したことから、この制御に PXR が関与している可能性が示された。

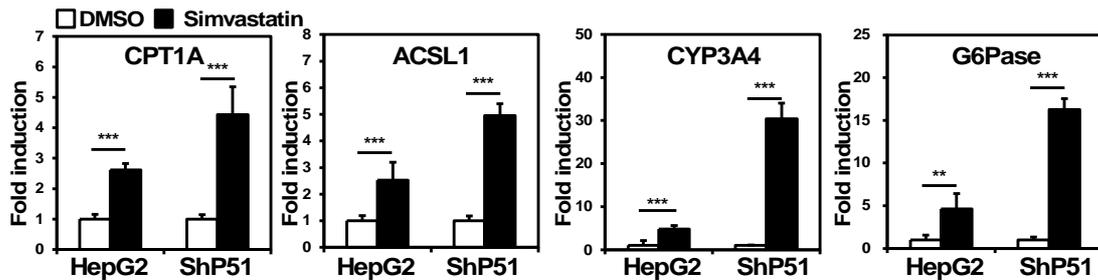


図 1 CPT1A および ACSL1 の mRNA 発現量に対するスタチン処置の影響

##### (2) CPT1A および ACSL1 mRNA のスタチン誘導性発現に対する PXR および SGK2 の関与

PXR siRNA を用いたノックダウンによって CPT1A および ACSL1 mRNA のシンバスタチン誘導性発現の低下が有意に認められた。また、SGK2 siRNA を用いたノックダウンによっても同様に、スタチン誘導性発現が低下したことから、PXR および SGK2 を介した制御であることを明らかにした (図 2)。

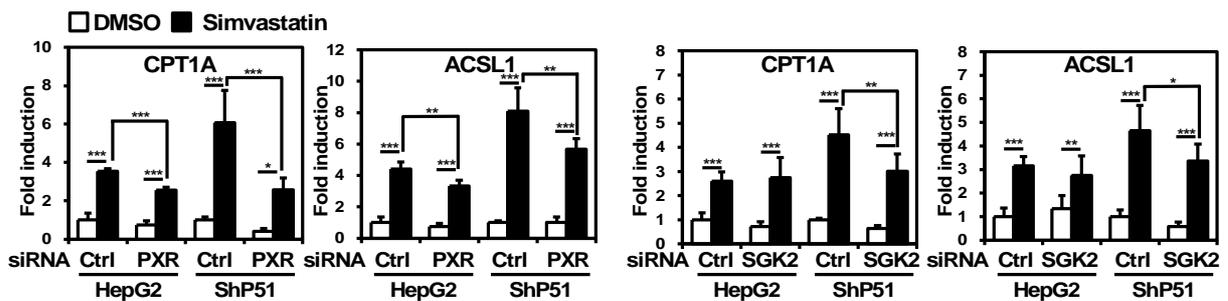


図 2 CPT1A および ACSL1 の mRNA 発現量に対する遺伝子ノックダウンの影響

##### (3) CPT1A 遺伝子上流領域に対するスタチン依存的な PXR および SGK2 の結合に関する検討

*In silico* 解析により *CPT1A* 遺伝子の 10 kb 上流領域に 4 か所の推定上の PXR 結合部位 (DR-1 ~IV) を見出した。さらに、クロマチン免疫沈降法により実際に PXR がシンバスタチン依存的に結合している領域 DR4-I を同定した。また、SGK2 も DR4-I にシンバスタチン依存的に結合していることを示した。以上より、スタチンにより活性化された PXR および SGK2 が *CPT1A* 遺伝子上流に結合して、*CPT1A* の発現量を増加させることを明らかにした ((図 3)。

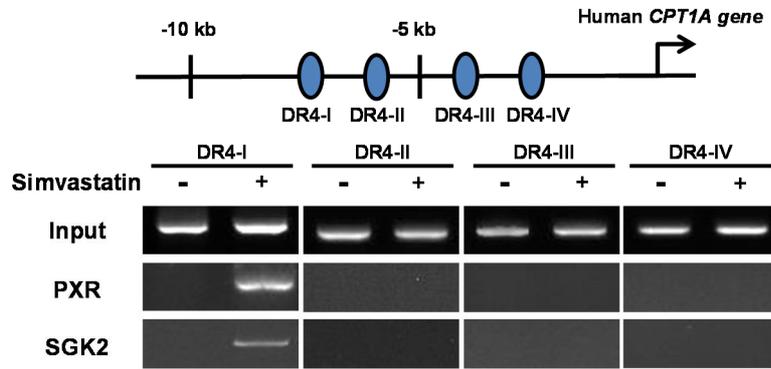


図 3 *CPT1A* 遺伝子上流領域に対する PXR および SGK2 の結合に関する検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Masataka, Fukami Tatsuki, Gotoh Saki, Nakajima Miki	4. 巻 292
2. 論文標題 A-to-I RNA Editing Up-regulates Human Dihydrofolate Reductase in Breast Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4873 ~ 4884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.775684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Konishi Keigo, Fukami Tatsuki, Gotoh Saki, Nakajima Miki	4. 巻 140
2. 論文標題 Identification of enzymes responsible for nitrazepam metabolism and toxicity in human	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 150 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2017.06.114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida Tomohiro, Fukami Tatsuki, Kurokawa Takaya, Gotoh Saki, Oda Akifumi, Nakajima Miki	4. 巻 111
2. 論文標題 Difference in substrate specificity of carboxylesterase and arylacetamide deacetylase between dogs and humans	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 167 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejps.2017.09.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Gotoh Saki, Miyauchi Yuu, Moore Rick, Negishi Masahiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Glucose elicits serine/threonine kinase VRK1 to phosphorylate nuclear pregnane X receptor as a novel hepatic gluconeogenic signal	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 200 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2017.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kutsukake Takaya, Furukawa Yoichi, Ondo Kyoko, Gotoh Saki, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 47
2. 論文標題 Quantitative Analysis of UDP-Glucuronosyltransferase Ugt1a and Ugt2b mRNA Expression in the Rat Liver and Small Intestine: Sex and Strain Differences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 38 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.118.083287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sadato Daichi, Ono Tomio, Gotoh Saito Saki, Kajiwara Naoki, Nomura Namiko, Ukaji Masako, Yang Liying, Sakimura Kenji, Tajima Youichi, Oboki Keisuke, Shibasaki Futoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit e is essential for embryonic development and cell proliferation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1188 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/2211-5463.12482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gotoh-Saito Saki, Abe Takayuki, Furukawa Yoichi, Oda Shingo, Yokoi Tsuyoshi, Finel Moshe, Hatakeyama Masahiko, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 34
2. 論文標題 Characterization of human UGT2A3 expression using a prepared specific antibody against UGT2A3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 280 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.dmpk.2019.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 後藤紗希, Rick Moore, Masahiko Negishi
2. 発表標題 肝糖新生における核内受容体 PXR のグルコースセンサーとしての新機能解明
3. 学会等名 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤 紗希, 宮内 優, Rick Moore, 根岸 正彦
2. 発表標題 核内受容体 PXR によるグルコースシグナル伝達の肝糖新生制御の解明
3. 学会等名 H28内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 後藤 紗希, 沓掛 貴矢, 中島 美紀
2. 発表標題 スタチン誘導性脂質代謝におけるPXR-SGK2シグナル経路の役割
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016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