

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23814

研究課題名（和文）薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの遺伝子発現における相互調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory relationship in gene expression between drug-metabolizing enzymes and drug transporters

研究代表者

藤野 智恵里（Fujino, Chieri）

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：30844253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの相互間における遺伝子発現調節の関わりについて明らかにすることを目的とした。In vitroおよびin vivo実験から、排泄トランスポーターであるmultidrug resistance-associated protein (MRP) 2の減少または欠損により硫酸転移酵素（SULT）1E1のmRNAおよびタンパク質発現が低下する可能性を見出した。また、MRP2欠損により血中に増加する胆汁酸はSULT1E1の遺伝子発現を減少させることが示された。以上より、MRP2の発現低下は内在性物質の変動を介してSULT1E1の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの遺伝子発現が変動することで医薬品の体内動態が変動し、薬効や副作用発現に影響を与えることがある。本研究において、MRP2の発現低下が内在性物質の変動を介してSULT1E1の発現に影響を及ぼす可能性を示した。SULT1E1によって生成される代謝産物はMRP2によって排泄されることが多く、これらは協奏的に代謝・排泄を担っている。したがって、このような生理的な遺伝子発現の相互調節が明らかになることで、臨床現場や創薬段階での薬物投与における、薬物動態の変動要因や個人差の予測に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the regulatory relationship in gene expression between drug-metabolizing enzymes and drug transporters. In vitro and in vivo experiments revealed that decreased or deficient expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) 2, an ATP-binding cassette transporter, resulted in decreased mRNA and protein expression of sulfotransferase (SULT) 1E1. We also showed that bile acid, which is increased in blood of MRP2 deficient rats, decreases SULT1E1 mRNA and protein expression. These results suggest that decreased MRP2 expression may affect SULT1E1 expression via changes in endogenous substances.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物代謝酵素 薬物トランスポーター 遺伝子発現調節 薬物動態変動要因

1. 研究開始当初の背景

医薬品の有効性や安全性の観点から、薬物動態の個人差や変動要因の解明は重要である。薬物の体内動態において、代謝を担う薬物代謝酵素と取り込み・排泄を担う薬物トランスポーターが協奏的に働くことで、生体異物である医薬品の代謝・排泄を効率的に行っている。

これまでの研究で、マウスの肝切除時に薬物代謝酵素の一種であるシトクロム P450 (CYP) の遺伝子発現が変動し、それと同時に胆汁酸関連トランスポーターの発現も変動することが明らかになった。また、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの一つである Multidrug resistance-associated protein (MRP) 4 のノックアウトマウスでは硫酸転移酵素 (SULT) 2A1 の mRNA 発現が低下するという報告がなされていた。さらに、ABC トランスポーターの一つである bile salt export pump (BSEP) のノックアウトマウスでは CYP2B10 および CYP3A11 の mRNA 発現が上昇するという報告がある。以上のことから、薬物代謝酵素と薬物トランスポーター間には遺伝子発現を調整する機構が存在し、機能面における代謝・排泄のバランスを保っているのではないかと考えた。さらに、この相互調節機構が生理的に生じていると考え、薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの基質となる内在性物質 (胆汁酸、コレステロール、ホルモン類など) がこの現象に重要な役割を果たすと考えた。つまり、ある薬物代謝酵素 (または薬物トランスポーター) の発現や活性が低下した場合に、その薬物代謝酵素により代謝されるはずであった内在性物質の量が変動することで、その内在性物質を取り込むまたは排泄する薬物トランスポーターの発現量が変動する可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、薬物代謝酵素-薬物トランスポーター間における遺伝子発現調節の相互関係の解明および内在性物質に着目したメカニズム解明を行うことで、薬物動態変動要因への理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の足掛かりとして、まずは肝臓における MRP2 とグルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A に着目し、薬物代謝酵素-薬物トランスポーター間の発現の相互関係について明らかにすることとした。MRP の特異的基質として UGT や SULT により生成されるグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体が挙げられる。そのため、UGT・SULT と MRP 間において相互調節が働いている可能性を考えた。具体的な方法を *in vitro* 実験と *in vivo* 実験に分け、以下に述べる。

(1) *In vitro* 実験

ヒト血清を含む培地で培養したヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いて、siRNA をトランスフェクションすることにより MRP2 または UGT1A1 の発現をノックダウンした。一定時間後の薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの mRNA 発現量およびタンパク質発現を RT-qPCR 法およびウェスタンブロット法により検討した。一部の実験では、HepG2 細胞に MRP2 の基質であるビリルビン、ケノデオキシコール酸、エストラジオール、エストロンを処理し、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの mRNA 発現量を測定した。

(2) *In vivo* 実験

MRP2 が先天的に欠損している Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) とコントロールラット (SD ラット) または UGT1A が先天的に欠損している Gunn rat とコントロールラット (Wistar ラット) を用いて、肝臓における薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの mRNA 発現量およびタンパク質発現を同様に検討した。また、発現の変動が認められた SULT1E1 の機能評価として、基質であるエストラジオールと肝臓サイトソルを用いて代謝実験を行い、代謝物であるエストラジオール 3-硫酸の生成量を LC-MS/MS により測定した。

4. 研究成果

(1) MRP2 の発現低下が薬物代謝酵素や薬物トランスポーター発現へ及ぼす影響の解析

HepG2 細胞における MRP2 のノックダウンにより、SULT1E1、SULT2A1、OATP2B1 の mRNA 発現量が減少した。SULT1E1 のタンパク質発現は減少したが、SULT2A1 のタンパク質発現は変動しなかった。一方、UGT1A および UGT2B の mRNA 発現量には有意な変化が認められなかった。これらの結果から、MRP2 の発現低下が SULT の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。MRP2 の減少により MRP2 の基質であるビリルビンや胆汁酸、エストロゲンホルモン等の内在性物質が細胞内に蓄積することで、SULT の発現を低下させた可能性が考えられる。そこで、これらの内在性物質が SULT 発現に及ぼす影響を検討したところ、胆汁酸の一種であるケノデオキシコール酸を HepG2 細胞に処理することにより、SULT1E1 の mRNA 発現量が減少した。

EHBR の肝臓において、SULT1E1 の mRNA 発現量およびタンパク質発現が SD ラットと比較して顕著に低かった。EHBR の肝臓サイトソルにおける SULT1E1 の酵素活性も SD ラットと比較して低

かった。また、EHBR の肝臓において CYP2B1/2 および CYP2C11 の mRNA 発現量が SD ラットと比較して低く、CYP1A2、CYP3A1、MRP3 の mRNA 発現量は高かった。一方、EHBR の血漿を用いて生化学パラメータを評価したところ、間接/直接ビリルビン、総胆汁酸、総コレステロール値が有意に高かった。

以上より、MRP2 の発現低下は内在性物質を介して SULT1E1 の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が考えられ、薬物動態変動の一因となり得ることが示唆された。

(2) UGT1A の発現低下が薬物トランスポーターや薬物代謝酵素発現へ及ぼす影響の解析

HepG2 細胞における UGT1A1 のノックダウンにより、薬物トランスポーターや薬物代謝酵素の mRNA 発現量は有意に変動しなかった。

Gunn ラットの肝臓では、コントロールの Wistar ラットと比較して、UGT2B2 の mRNA 発現量が顕著に高かった。また、BSEP と organic cation transporter (OCT) 1 の mRNA 発現量は低く、MRP3 の mRNA 発現量は高かった。一方、BSEP および OCT1 のタンパク質発現は変動しなかった。

以上の結果から、UGT1A の発現低下が薬物トランスポーターや他の薬物代謝酵素の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

以上(1)(2)より、複数の薬物代謝酵素および薬物トランスポーター間において、遺伝子発現の相互調節がなされている可能性が示唆された。

これらの研究成果は一部学会で発表しており、現在論文投稿準備中である。今後、MRP2 または UGT1A の発現低下に伴う内在性物質の変動解析から薬物代謝酵素-薬物トランスポーター間における相互調節を規定する主因子の同定に取り組む。本研究成果は、臨床現場や創薬段階での薬物投与における、薬物動態の変動要因や個人差の予測に役立つ基礎的知見となり得ると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 藤野 智恵里、上島 智、桂 敏也
2 . 発表標題 排泄トランスポーターMRP2の発現低下が薬物代謝酵素の遺伝子発現に与える影響
3 . 学会等名 日本薬学会第141年会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 藤野 智恵里、荒井 理佐子、上島 智、桂 敏也
2 . 発表標題 薬物代謝酵素UGT1Aの発現低下が薬物トランスポーターの遺伝子発現に及ぼす影響
3 . 学会等名 日本薬学会第142年会
4 . 発表年 2022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
研究協力者	桂 敏也 (Katsura Toshiya)		
研究協力者	上島 智 (Satoshi Ueshima)		

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------