

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590139

研究課題名 (和文) P-糖タンパク質の小腸特異的な誘導機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of intestinal induction of P-glycoprotein

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

研究成果の概要 (和文)：リファンピシンによる小腸 P-糖タンパク (MDR1) の誘導には、核内受容体である pregnane X receptor (PXR) が重要な役割を果たしており、小腸には他の臓器と比較して PXR が多く発現していることが知られている。しかし、小腸よりも PXR が高発現している肝臓では MDR1 の誘導は認められない。それに対し、MDR1 と同様に PXR を介してリファンピシンにより誘導される CYP3A4 の場合、肝臓と小腸の両方で誘導が認められる。このような MDR1 の PXR を介した小腸特異的な誘導がどのようなメカニズムで起こっているのかは不明である。本研究では、リファンピシンによる MDR1 の誘導がヒト大腸がん由来細胞の LS180 で認められるのに対し、ヒト肝ガン由来細胞の HepG2 細胞では認められないことを明らかにした。この二つの細胞株にはともに PXR が発現しておりリファンピシンによる CYP3A4 の誘導は認められる。そこで、この二つの細胞株を比較することにより MDR1 の PXR を介した小腸特異的な誘導メカニズムの解明について検討を行った。まず、*MDR1* 遺伝子のレポーター遺伝子アッセイを行うことにより、転写開始点より上流-7970/-7011 の領域が LS180 細胞における *MDR1* 遺伝子のリファンピシンによる転写活性化に重要であることを明らかにした。さらに、cDNA サブトラクションにより LS180 細胞には腸管に発現している肝臓に発現していない転写因子 epithelial-specific ets factor (ESE-3) が多く発現していることを明らかにした。また、HepG2 細胞に ESE-3 を導入することにより、リファンピシンによる *MDR1* 遺伝子の転写活性化が認められることが明らかとなった。ESE-3 に対する siRNA を用いて LS180 細胞の ESE-3 をノックダウンしたところ、リファンピシンによる MDR1 mRNA 誘導の低下が認められた。これらの結果より、LS180 細胞において認められたリファンピシンによる MDR1 の誘導には、PXR に加え、ESE-3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、ESE-3 を発現している LS180 細胞を用いて、21 種の化合物による MDR1 mRNA の誘導と MDR1 レポーター活性の上昇との関係を調べたところ、有意な正の相関が得られた。これらの結果より、LS180 細胞は PXR と ESE-3 を共に発現しており、この細胞を用いた MDR1 mRNA の誘導と MDR1 レポーター活性の上昇は、小腸特異的な P-糖タンパクの誘導を予測し得る可能性が強く示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Induction of intestinal P-glycoprotein (gene name, *MDR1*) by rifampicin (RIF) is mediated by transcriptional activation of *MDR1* gene by pregnane X receptor (PXR). In this study, we found that endogenous MDR1 mRNA was highly induced by RIF in colon carcinoma cell line (LS180) but not in hepatocarcinoma cell line (HepG2),

although PXR is expressed in both cell lines. In addition, we identified *cis*- and *trans*-regulatory factors responsible for the intestine-specific induction of *MDR1* gene by using these cell lines. Reporter activities of a distal regulatory cluster (-7970/-7011) were markedly increased by RIF in only LS180 cells. The reporter activities in LS180 cells were decreased to the level observed in HepG2 cells by deletion or mutation of the DR4 motifs in the distal regulatory cluster. Moreover, we cloned epithelial-specific ets factor (ESE-3) that was highly expressed in LS180 cells but not in HepG2 cells. Exogenous expression of ESE-3 into HepG2 cells resulted in the transcriptional activation of *MDR1* gene by RIF. The reporter activities enhanced by ESE-3 were completely decreased by mutation of the DR4 motifs. A knock-down of ESE-3 by siRNA significantly attenuated the induction of endogenous *MDR1* mRNA by RIF in LS180 cells. These results suggest that ESE-3 is a novel *trans*-regulatory factor responsible for the intestinal induction of *MDR1* gene by RIF *via* the DR4 motifs of *MDR1* gene. Moreover, there was a significant correlation between the induction of mRNA and reporter activity for *MDR1* by 21 different compounds. Therefore, the induction of mRNA and reporter activity for *MDR1* by test compounds in LS180 cells will be possible to predict an intestinal induction of P-glycoprotein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬物動態・代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：P-糖タンパク質、誘導、転写調節、核内レセプター

1. 研究開始当初の背景

(1) P-糖タンパク質 (MDR1) は小腸の刷子縁膜側、肝臓の胆管側、血液脳関門の血液側等に発現し、生体内から薬物を排除する方向に働くトランスポーターである。最近、小腸 MDR1 の発現量が抗結核薬リファンピシンにより増加することが明らかとなり、チトクロム P450 3A4 (CYP3A4) の誘導に加え、小腸 MDR1 の誘導が临床上重要な薬物相互作用の原因となっていることが広く認識されるように

なった。

(2) リファンピシンによる小腸 MDR1 の誘導には、核内受容体である pregnane X receptor (PXR) が重要な役割を果たしており、小腸には他の臓器と比較して PXR が多く発現していることが知られている。しかし、小腸よりも PXR が高発現している肝臓では、興味あることに、MDR1 の誘導は認められない。それに対し、MDR1 と同様に PXR を介してリファンピシンにより誘導される CYP3A4 の場合、肝臓と

小腸の両方で誘導が認められる。このような MDR1 の PXR を介した小腸特異的な誘導がどのようなメカニズムで起こっているのかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

リファンピシンによる MDR1 の小腸特異的な誘導には PXR と相互作用する小腸特異的な関連因子が存在するか、あるいは単独で MDR1 の誘導に関与する何らかの小腸特異的な因子が存在するという作業仮説に基づき、MDR1 の小腸特異的な誘導に関与する因子を、リファンピシンに対する誘導反応が異なる細胞株を比較することにより同定し、小腸特異的な MDR1 誘導機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) リファンピシンによる MDR1 誘導を再現する細胞株の探索：ヒト大腸がん由来細胞 (Caco-2, LS174T, LS180) およびヒト肝ガン由来細胞 (HepG2, FLC7, Huh-7) を用いて、リファンピシン曝露による MDR1 mRNA 量への影響を調べた。リファンピシンによる誘導には、PXR が関与すると考えられるので、PXR mRNA 量の比較を行った。mRNA 量は RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により定量した。
- (2) MDR1 レポーター遺伝子アッセイ系の構築：MDR1 遺伝子の PXR 応答領域を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築するため、MDR1 遺伝子のプロモーター領域にある PXR 応答領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターに組み込んだ。作成したレポーターベクターと PXR 発現ベクターを細胞に導入し、リファンピシン曝露によるレポーター活性への影響を検討した。
- (3) 小腸 MDR1 誘導に関与する因子の同定：MDR1 mRNA がリファンピシン曝露により誘導

された細胞と誘導されない細胞で発現レベルの大きく異なる遺伝子を探索するため cDNA サブトラクションを行った。MDR1 mRNA がリファンピシン曝露により誘導されなかった細胞に cDNA サブトラクション法により得られた因子を導入し、MDR1 遺伝子に関するレポーターベクターを用いてリファンピシン応答性への影響を検討した。

- (4) ゲルシフトアッセイ：MDR1 誘導に関与する候補因子についてゲルシフトアッセイにより MDR1 遺伝子への結合領域を検討した。
- (5) RNA 干渉：リファンピシン応答性を示した細胞に対し、siRNA を用いた RNAi 実験を行い、リファンピシン応答性が消失するかどうかを検討した。
- (6) リファンピシン以外の MDR1 誘導作用を示す化合物による影響：ベラパミル、ハイパーフォリン、クロトリマゾール、スピロノラクトン、ニフェジピン、SR12813、ニトレンジピン、リトナビル、アミオダロン、ミフェプリストン、レセルピン、パクリタキセル、コルチコステロン、ミダゾラム、プロゲステロン、カルバマゼピン、エリスロマイシン、エストラジオール、シスプラチンについて、培養細胞への曝露を行い、MDR1 mRNA 量への影響を調べた。また、これらの化合物について MDR1 遺伝子に関するレポーター遺伝子アッセイを行い、レポーター活性への影響を調べ、MDR1 mRNA 量の変化率との相関性を調べた。

4. 研究成果

- (1) リファンピシンによる MDR1 誘導を再現する細胞株の探索：リファンピシン曝露により、ヒト大腸がん由来細胞である LS174T および LS180 細胞において MDR1 mRNA の顕著な増加が認められたが、Caco-2 細胞およびヒト肝ガン由来細胞である HepG2, FLC7, Huh-7

においては発現量の変化は認められなかった。一方、PXR を介して誘導される CYP3A4 については、Caco-2 細胞以外のすべての細胞でリファンピシンによる誘導が認められた。PXR mRNA の発現量は、LS174T, LS180 および HepG2 細胞において高く、FLC7 および Huh-7 細胞においては、それらの 1/3~1/4 程度であった。Caco-2 細胞においては、PXR mRNA の発現は認められなかった。これらの結果より、リファンピシンによる MDR1 の誘導には PXR が必要であるが、CYP3A4 の誘導とは異なる PXR 以外の因子も必要であることが示唆された。

(2) *MDR1* 遺伝子レポーター活性に対するリファンピシンの影響: *MDR1* 遺伝子の転写開始点より上流-7970/-7011 bp の領域をプロモーターベクターに組み込み、*MDR1* 遺伝子レポーターベクターを作製した。リファンピシンにより MDR1 が誘導された LS180 細胞と誘導されなかった HepG2 細胞に *MDR1* 遺伝子レポーターベクターと PXR 発現ベクターを導入し、レポーターアッセイをおこなった。リファンピシンによるレポーター活性の上昇は LS180 細胞においてのみ認められ、HepG2 細胞では認められなかった。一方、*CYP3A4* 遺伝子のレポーター活性は、いずれの細胞においてもリファンピシンによる上昇が認められた。これらの結果より、LS180 細胞はリファンピシンによる *MDR1* 遺伝子転写活性化能を有しており、HepG2 細胞と比較検討することにより、小腸特異的なリファンピシンによる MDR1 誘導機構の解明が可能であると考えられた。そこで、小腸および肝臓のモデル細胞としてそれぞれ LS180 細胞および HepG2 細胞を用いることとした。

(3) 小腸 MDR1 誘導に関与する因子の同定: LS180 細胞を tester、HepG2 細胞を driver として、LS180 細胞に特異的に発現する遺伝子

を cDNA サブトラクション法によりスクリーニングしたところ、LS180 細胞に多く発現する 43 種のクローンが得られた。それらの中に腸管粘膜上皮細胞に発現するが肝細胞には発現しない転写因子 epithelial specific factor 3 (ESE-3) が含まれていた。ESE-3 をクローニングし、HepG2 細胞に *MDR1* 遺伝子レポーターベクターとともに導入したところ、リファンピシンによるレポーター活性の上昇が認められた。一方、ESE-3 の導入は *CYP3A4* 遺伝子のレポーター活性に対して影響を与えなかった。これらの結果から、LS180 細胞において認められた *MDR1* 遺伝子の転写活性化には、PXR に加え、ESE-3 が関与していることが示唆された。

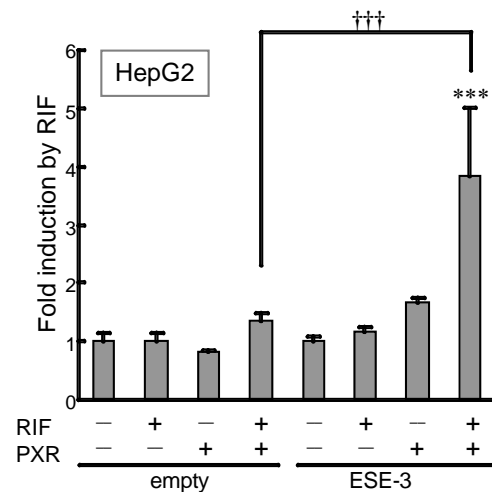


図 1. HepG2 細胞における MDR1 レポーター活性。PXR と ESE-3 を共発現させたときにリファンピシンによるレポーター活性の上昇が認められた。

(4) *MDR1* 遺伝子への ESE-3 の結合: ESE-3 結合配列を標識プローブとして *in vitro* 合成した ESE-3 タンパクとインキュベートし、ゲルシフトアッセイを行ったところ、シフトバンドが検出された。このバンドは、*MDR1* 遺伝子の転写開始点より上流-7868/-7813 bp の配列をコンペティターとしたときに消失し

たことから。この領域に ESE-3 が結合し得ることが示唆された。

(5) ESE-3 ノックダウンによるリファンピシンによる MDR1 誘導への影響：ESE-3 の siRNA を LS180 細胞に導入し、リファンピシンによる MDR1 mRNA 増加への影響を検討したところ、コントロールにおける mRNA 増加を 100%としたときと比較して約 50%の低下が示された。この結果より、ESE-3 が LS180 細胞におけるリファンピシンによる MDR1 の誘導に関与している可能性が示唆された。

(6) リファンピシン以外の MDR1 誘導作用を示す化合物による影響：リファンピシンを含む 21 種の MDR1 誘導作用が報告されている化合物について、これらの化合物を LS180 細胞に曝露した場合の MDR1 mRNA 増加率と *MDR1* 遺伝子のレポーター活性の上昇率との関係を調べたところ、有意な正の相関 ($r = 0.758$, $p < 0.001$) が得られた。また、PXR 活性化剤であるハイパーフォリンと SR12813 についてはリファンピシンと同様に、HepG2 細胞に ESE-3 を導入したときにのみ *MDR1* 遺伝子レポーター活性のリファンピシンによる上昇が認められた。これらの結果より、LS180 細胞は ESE-3 と PXR をともに発現しており、この細胞を用いて被験化合物による MDR1 mRNA 量の増加および MDR1 レポーター活性の上昇を調べることが、リファンピシンを含む PXR 活性化剤による MDR1 の誘導の予測に有用であると考えられた。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 小林カオル、亀山直哉、清水晶子、山崎由貴、遠藤美佳、降幡知巳、千葉 寛：MDR1 遺

伝子の小腸特異的誘導に関する新規メカニズム、第 25 回日本薬物動態学会年会、2010/10/7~9、大宮。

② 亀山直哉、清水晶子、山崎由貴、小林カオル、千葉 寛：PXR を介したヒト MDR1 の腸管特異的誘導に関する研究、第 24 回日本薬物動態学会年会、2009/11/27-29、京都。

③ 清水晶子、亀山直哉、小林カオル、千葉 寛：MDR1 および CYP3A4 遺伝子の誘導に関する mRNA 発現量とレポーター活性の相関、日本薬学会第 129 年会、2009/3/26-28、京都。

[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