

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15308

研究課題名（和文）薬物代謝酵素と薬物トランスポーターにおける協奏的な遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory interplay between gene expression of 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） 3,600,000 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における協奏的な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MRP2の減少または欠損により硫酸転移酵素SULT1E1のmRNAおよびタンパク質発現が低下することを示唆した。また、MRP2欠損ラットの肝臓において転写因子であるFXRとLXRの活性化が示唆され、FXRのアゴニストである胆汁酸はSULT1E1の遺伝子発現を減少させることが明らかになった。以上より、MRP2の発現低下は内在性物質による転写因子の活性化を介して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SULT1E1の発現に影響を及ぼす可能性を示した。MRP2には遺伝子多型が存在することが知られており、MRP2の発現が低い人においてMRP2基質だけではない医薬品の体内動態の変動に注意する必要があると考えられる。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 interplay between gene expression of 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. The changes observed in downstream gene expression in the liver of MRP2-deficient rats suggested the activation of farnesoid X receptor (FXR) and liver X receptor (LXR), transcription factors. Bile acid, an agonist of FXR, decreased gene expression of SULT1E1 in human hepatocellular carcinoma cell line. These results suggest that decreased MRP2 expression may affect SULT1E1 expression via activation of transcription factors by 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。薬物動態を規定する因子として、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重要であり、これらが協奏的に働くことで効率的に代謝・排泄が行なわれている。

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 と胆汁酸関連薬物トランスポーターの発現が同時に変動することを明らかにした (Fujino et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 370:133-144, 2019)。また、排泄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 (Assem et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 22250-22257, 2004)。これらのことから、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター間には内在性物質を介した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という仮説を立てた。この仮説を基に実際にいくつか実験を行ったところ、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞において排泄トランスポーターMRP2 をノックダウンした際に、SULT1E1、SULT2A1 および取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 の mRNA 発現が減少し、グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A の mRNA 発現が増加傾向を示した。また、SULT1E1 のタンパク質発現も減少するという結果を得た。この現象は生理的に生じていると考えられるため、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がこの現象のメカニズムに関与すると考えた。つまり、MRP2 の減少により MRP2 によって排泄されるはずであった内在性物質(ビリルビン、胆汁酸、ホルモン類など)の量が変動し、その内在性物質により薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの転写が活性化または抑制されることで、発現量が代償的に変動する可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬物代謝酵素と薬物トランスポーターにおける内在性物質を介した協奏的な遺伝子発現調節の解明を行うことで、代謝・排泄の過程を統合的にとらえた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

HepG2 細胞を用いた実験から、SULT1E1 をはじめとする薬物代謝酵素および薬物トランスポーターと MRP2 との相互的な発現調節が生じている可能性が示唆された。本研究ではまず、MRP2 の発現・機能低下に着目し、*in vitro*実験と *in vivo*実験の両面から、現象の明確化とメカニズム解明に取り組んだ。具体的な方法を以下に述べる。

### (1) 生体における協奏的な発現調節現象の解明 (*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 rat) の肝臓および小腸における各薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの発現と機能を比較した。mRNA 発現を RT-qPCR により測定し、タンパク質発現をウェスタンブロッティングにより検討した。SULT1E1 の酵素活性について、プローブ基質である 17 $\beta$ -エストラジオールを肝臓サイトソルとインキュベーションし、生成した代謝物 17 $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸を LC-MS/MS により定量した。

### (2) 変動する内在性物質の探索 (*in vivo*実験)

EHBR とコントロールラットから血液を採取し、血漿を用いて委託によりビリルビン値や総胆汁酸値、総コレステロール値などの生化学パラメータを評価した。

### (3) 転写因子の下流遺伝子における発現変動解析 (*in vivo*実験)

異なる視点からメカニズム解明を行うため、薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの遺伝子発現を調節する機構に着目した。EHBR の肝臓から RNA を抽出し、RNA シーケンス(委託)により網羅的に mRNA の解析を行った。得られた結果からパスウェイ解析を行い、変動したシグナル伝達経路などを明らかにすることで関与する遺伝子発現調節機構を考察した。また、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現を調節することが知られる転写因子に着目し、下流遺伝子群の発現変動から調節機構を考察した。転写因子として、核内受容体である pregnane X receptor、constitutive androstane receptor、peroxisome proliferator-activated receptor、farnesoid X receptor (FXR)、liver X receptor (LXR) を検討した。

### (4) 内在性物質による SULT1E1 の発現変動評価 (*in vitro*実験)

EHBR の血漿において変動が認められたビリルビン、胆汁酸（代表としてケノデオキシコール酸）、コレステロールを HepG2 細胞およびラット肝初代細胞に処理し、SULT1E1 の mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。

#### (5) 協奏的な発現調節現象の解明 (*in vitro*実験)

MRP2 と SULT1E1 における遺伝子発現調節の相互関係について理解を深めるべく、反対に SULT1E1 の発現低下による MRP2 発現への影響について検討した。HepG2 細胞に siRNA をトランスフェクションして SULT1E1 をノックダウンし、各薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの mRNA 発現を RT-qPCR により測定し、タンパク質発現をウェスタンブロットングにより検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 生体における協奏的な発現調節現象の解明

HepG2 細胞を用いた検討結果と異なり、EHBR の肝臓では、SULT2A1 および OATP2B1 の mRNA 発現は減少しておらず、UGT1A1 の mRNA 発現も増加していなかった。一方、EHBR の肝臓では、コントロールラットと比較して、SULT1E1 の mRNA 発現およびタンパク質発現が顕著に低かった。また、SULT1E1 の酵素活性も顕著に低かった。以上より、MRP2 の減少や欠損に伴い SULT1E1 の発現や機能が低下し、MRP2 と SULT1E1 との間に遺伝子発現調節の関係性の存在が示唆された。

#### (2) 変動する内在性物質の探索

EHBR の血漿では、コントロールラットと比較して、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いことが明らかとなった。以上より、MRP2 の発現低下によりこれらの内在性物質が細胞内に蓄積することで、SULT1E1 の発現を変動させる可能性が考えられた。

#### (3) 転写因子の下流遺伝子における発現変動解析

EHBR の肝臓から抽出した RNA を用いて RNA シーケンス解析を行った結果、脂質代謝およびステロイド代謝に関与する遺伝子群が変動していた。また、胆汁酸や脂質のホメオスタシスを制御する核内受容体である FXR および LXR が活性化されている傾向が認められた。以上より、内在性物質の変動と関係のある転写因子の活性化が、SULT1E1 の発現変動に寄与する可能性が考えられた。

#### (4) 内在性物質による SULT1E1 の発現変動評価

胆汁酸の一種であるケノデオキシコール酸を HepG2 細胞およびラット肝初代細胞に処理したところ、SULT1E1 の mRNA 発現が減少する傾向が認められた。ケノデオキシコール酸は FXR を活性化させることが知られており、以上の結果から、MRP2 の欠損により胆汁酸が増加し、FXR の活性化を介して SULT1E1 の発現を低下させた可能性が考えられた。

#### (5) 協奏的な発現調節現象の解明

HepG2 細胞において SULT1E1 をノックダウンしたところ、MRP2 の mRNA およびタンパク質発現に増加傾向が認められた。MRP2 は FXR の活性化により発現が増加し、SULT1E1 は FXR の活性化により発現が減少することが報告されている。従って、MRP2 と SULT1E1 の間には FXR の活性化を介した相互的な遺伝子発現調節が生じている可能性が考えられた。

以上より、MRP2 の発現低下は内在性物質による転写因子の活性化を介して SULT1E1 の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。このような薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの相互的な発現調節は、薬物動態変動要因の一つになり得ると考えられる。

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、他の薬物代謝酵素や薬物トランスポーターにも着目し、それらの機能や分類ごとに現象を整理し、薬物代謝酵素と薬物トランスポーター間における遺伝子発現調節の関係性を統合的に明らかにしたいと考えている。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4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の発現低下に伴う薬物動態関連遺伝子の発現変動機構の解明
3．学会等名 日本薬学会第144年会
4．発表年 2024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 薬物トランスポーターと薬物代謝酵素における遺伝子発現調節の相互関係
3．学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4．発表年 2022年

1．発表者名 藤野 智恵里、上島 智、桂 敏也
2．発表標題 MRP2の発現低下に伴う第II相薬物代謝酵素の遺伝子発現と機能変動
3．学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4．発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------