

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590166

 研究課題名（和文）薬物代謝酵素の構成的発現に対するアンドロゲンの抑制作用と
その機序の解析

 研究課題名（英文）Inhibitory effect of androgen on the constitutive gene expression of
hepatic drug metabolizing enzymes and its mechanism

研究代表者

小島 美咲（KOJIMA MISAKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・家畜ゲノム研究ユニット・上級研究員

研究者番号：80355742

研究成果の概要（和文）：

雄の血中アンドロゲン濃度(Ad)が顕著に異なる2品種のブタとその交配で得たF1を用いて、肝臓における薬物代謝酵素の構成的遺伝子発現の性差を調べるとともに、性差発現における血中Adの関与を追究した。その結果、構成的発現に性差が見られる肝薬物代謝酵素の遺伝子発現は、Adにより閾値をもって抑制的に制御されていること、また、Adの高発現形質は常染色体性に優性遺伝することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Sex differences in the constitutive expression of hepatic drug metabolizing enzymes, including cytochrome P4501A (CYP1A) subfamily enzymes, in the pig liver have been examined using 5-month-old Meishan, Landrace, and their F1 cross breeds, LM and ML pigs. The levels of serum androgen in all the pigs used were also examined, and the relationship between the serum androgen levels and the expression levels of hepatic metabolizing enzymes, which were observed to be expressed in a sex-dependent manner, were investigated. All the results indicated that serum androgen down-regulated the constitutive gene expression of several drug metabolizing enzymes including CYP1As with threshold. Furthermore, it was demonstrated for the first time that serum androgen level in male pigs was determined by autosomal dominant inheritance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アンドロゲン、薬物代謝酵素、肝臓、CYP、性差、系統差、優性遺伝、ブタ

1. 研究開始当初の背景

ブタは生理学的、解剖学的にヒトと類似していることから医学・薬学分野での利用が期待されている。研究代表者らは、医薬品の代謝と薬効・毒性発現に関する研究分野でのブ

タの有用性を検証するため、医薬品を含む外来性化学物質の解毒/活性化代謝に関わる種々のブタ肝シトクロム P450(CYP)をクローニングし(Kojima and Morozumi, J. Health Sci., 50, 518, 2004)、肝臓におけるそれら遺伝子の

発現量を調べてきた。この研究過程で、Meishan pig の肝臓では、医薬品や発癌剤の代謝/活性化を行う CYP1A1 や CYP1A2 の構成的発現に著しい性差(雄<雌)があることを見出した(Kojima et al., Biochem. Pharmacol. 75, 1076, 2008)。この性差は、雄を去勢することにより消失することから、アンドロゲンが CYP1A1/1A2 の発現に対して抑制的に働いていることが示唆された。また、Landrace pig では、Meishan pig で見られた性差が認められないことから、CYP1A 遺伝子の構成的発現は、閾値をもってアンドロゲンにより抑制されると推測された。

アンドロゲンにより構成的発現が抑制あるいは亢進される CYP 分子種として、それぞれマウス肝での Cyp2b (Honkakoski, et al. Biochem. J. 285, 979, 1992)あるいはマウス腎での Cyp4b1 (Imaoka, et al., Arch. Biochem. Biophys. 321, 255, 1995)が報告されている。また、構成的発現に性差が見られる肝 CYP 分子種として、ラットやマウスにおける CYP2A、CYP2C あるいは CYP3A、ヒトの CYP1A2 や CYP3A が報告され、これら性差は成長ホルモンの分泌パターンの相違で説明されている (Waxman and O' Connor, Mol. Endocrinol. 20, 2613, 2006)。しかし、CYP1A1/1A2 の構成的発現における顕著な性差は、Meishan pig で研究代表者らが最初に見出したものであり、他に例を見ない。

そこで、本研究はこれら知見を踏まえ、CYP1A1/1A2 の構成的発現に顕著な性差が認められる Meishan pig と性差が認められない Landrace pig、さらにそれらの交配 F1 を用いることにより、肝薬物代謝酵素、特に CYP1A 酵素の構成的発現に及ぼすアンドロゲンの影響、アンドロゲンと肝薬物代謝酵素発現との関連性や、さらには血中アンドロゲン量を規定する遺伝的要因の解明にまで繋がることを考え、計画・実施した。

2. 研究の目的

医薬品や発癌性化学物質など、外来性化学物質の代謝を担う肝臓のシトクロム P450 (CYP) の多くは、異物で誘導されることが知られ、その誘導には異物に対応した核内受容体が関わっていることが知られている。しかし、それら CYP の構成的発現調節についてはほとんど知られていない。そこで本研究は、研究代表者らがブタの肝臓で見出した構成的 CYP1A1/1A2 発現における性差(雄<雌)に着目し、性ホルモンの関与(特にアンドロゲンの抑制効果)を明確にするとともに、その作用機序の解明を目指した。また同時に、多くの医薬品やステロイドホルモンの代謝を担う CYP2 および CYP3 サブファミリー酵素の構成的発現と血中アンドロゲン量との関連性を明確にすることを目指した。

3. 研究の方法

動物

生後 1 ヶ月齢～5 ヶ月齢の雌雄、Meishan pig および Landrace pig、またそれらの交配により得られた 5 ヶ月齢の雌雄 F1 pig、LM (L ♀ x M♂) および ML (M♀ x L♂) を使用した。去勢した雄ブタは、1 ヶ月齢で去勢し、5 ヶ月齢で使用した。屠畜は午前 10 時～12 時に行い、採取した肝臓は使用時まで -80 °C で保存した。

テストステロン投与

5 ヶ月齢の Meishan と Landrace の雌や去勢した雄にコーン油に溶解した Testosterone propionate (Sigma) を 1 日おきに 5 回筋肉内注射 (10 mg/kg bw/injection) し、最終投与の 24 時間後に屠畜した。

血中テストステロン濃度の測定

個体ごとに採血した血液を室温に静置し、1500g で 15 分間遠心 (4 °C) することにより血清を得た。血清は使用時まで -80 °C で保存した。血清中テストステロン濃度の測定は Correlate-EIA Testosterone Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs) を用いて行った。

CYP1A サブファミリー酵素の生化学的解析

常法により得た肝臓のミクロソーム画分を用いて、Burke らの方法 (Biochem. Pharmacol. 34, 3337, 1985; Biochem. Pharmacol. 48, 923, 1994) により ethoxyresorfin-*O*-deethylase (EROD) 活性および methoxyresorufin-*O*-demethylase (MROD) 活性を測定し、それぞれ CYP1A1 および CYP1A2 活性とした。また、肝 CYP1A の酵素タンパクレベルの測定は、ミクロソーム画分 (50 μg) を試料として、goat anti-rat CYP1A2 serum (Daiichi Pure Chemicals) を用いたウェスタンブロット法で行った。

遺伝子発現量の解析

TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて肝臓から total RNA を抽出した。Total RNA から Super-Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて cDNA を合成し、発現遺伝子の解析試料とした。遺伝子発現量の解析は、各遺伝子に特異的なプライマーと SYBR Green Master Mix (PE Applied Systems) を用いた Real time RT-PCR 法により行った。なお、内部標準として 18S を用いて遺伝子発現量を補正した。また、Amplicon Gold を用いて Semi-quantitative RT-PCR を行った場合には、PCR 産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイドにより目的とするバンドを検出した。

4. 研究成果

(1) Meishan および Landrace 両品種の肝臓における CYP1A 酵素の発現解析

5ヶ月齢(成熟)の Meishan, Landrace 両品種の肝臓における CYP1A1 および CYP1A2 の遺伝子発現量を解析した結果、Meishan の雄では雌に比較して 10%以下と著しく遺伝子発現量は低く、雄を去勢することにより雌と同程度に回復することが確かめられた。一方、Landrace では、そのような性差は認められず、雄の去勢効果も認められなかった(Fig. 1)。

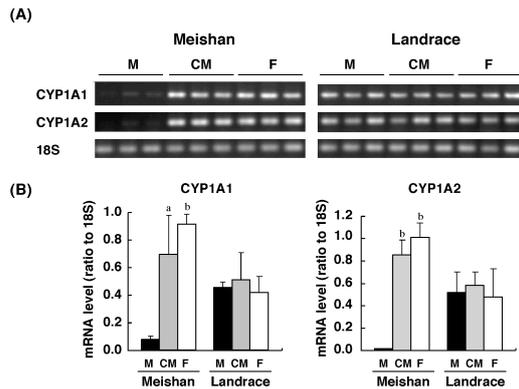


Fig. 1 (発表論文④). Hepatic gene expression of CYP1A1 and CYP1A2 in 5-month-old male (M), castrated male (CM), and intact female (F) Meishan and Landrace pigs. (A)

Expression patterns for the CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in individual pigs. (B) Expression levels of CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs were determined by real time RT-PCR. ^{a,b}Significantly different from the corresponding intact male pigs: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$. ^{c,d}Significantly different from sex-matched intact Meishan pigs: ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$.

また、CYP1A1 の酵素活性の指標として EROD 活性を、CYP1A2 の酵素活性の指標として MROD 活性を測定したところ、遺伝子発現量で見られた性差と同様の結果が得られた(Fig. 2)。さらに、ウェスタンブロットでも同様の結果が得られた(Fig. 3)。

以上から、雄性 Meishan で見られる CYP1A 発現の抑制は、転写レベルで起きていることが明らかになった。また、Meishan の雄を去勢すると雌と同程度の発現量に回復することから、男性ホルモンが CYP1A 酵素の発現を抑制していることが示唆された。

(2) CYP1A 発現に及ぼすテストステロン投与の影響

CYP1A 酵素の発現に Meishan では性差が認められ Landrace では認められないことから、5ヶ月齢の両品種の雌と去勢した雄にテストステロンを投与して、CYP1A 発現に及ぼす影

響を解析した。

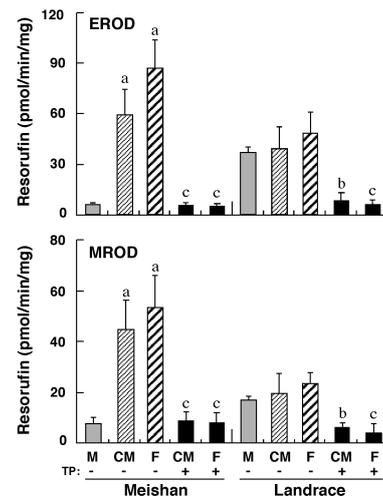


Fig. 2 (発表論文④). Microsomal activities for EROD and MROD in 5-month-old male(M), castrated male (CM) and Female (F) Meishan and Landrace pigs. ^aSignificantly different from the breed-matched intact male pigs: ^a $P < 0.01$. ^bSignificantly different from the corresponding TP-untreated pigs: ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$. ^{d,c}Significant difference between sex-matched intact Meishan and Landrace pigs: ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$. TP; Testosterone propionate.



Fig. 3 (発表論文④). Western blot analyses of hepatic CYP1A apoproteins in 5-month-old male(M), castrated male (CM), and intact female (F) pigs. TP; Testosterone propionate.

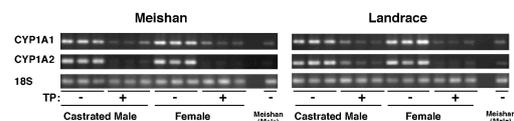


Fig. 4 (発表論文④). Effect of TP-treatment on the expression levels of hepatic CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in 5-month-old castrated male and female pigs. TP; Testosterone propionate.

テストステロンを投与することにより、CYP1A1 および CYP1A2 の遺伝子発現量は、両品種ともに Meishan の雄レベルまでに低下した (Fig. 4)。同様の結果は、EROD や MROD の酵素活性レベル(Fig. 2)やウェスタンブロット法で測定した蛋白質レベル(Fig. 3)でも確認された。これらの結果より、血中アンドロ

ゲン濃度の上昇は、CYP1A の発現低下をもたらすことが明らかになった。

(3) ブタ品種間での血中アンドロゲン濃度の比較

CYP1A 発現に性差が認められない Landrace にテストステロンを投与すると、その発現量は雄の Meishan と同程度にまで低下することから、両品種間雄での CYP1A 発現の相違は生理的な血中テストステロン濃度の差に起因している可能性が推測された。

そこでまず、両品種の雄の性成熟に伴う血中テストステロン濃度の変動を検討した。Meishan では 2 ヶ月齢以降、血中アンドロゲン濃度が急速に上昇し、4~5 ヶ月齢では 50 ng/ml 程度になるが、Landrace では 5 ヶ月齢でも 18 ng/ml 程度で、2 ヶ月齢の Meishan と同レベルだった (Fig. 6 参照)。なお、雌の血中アンドロゲン濃度に品種間差は認められなかった。また、5 ヶ月齢の両品種の雄を去勢すると雌と同レベルまで血中テストステロン濃度は低下した。

以上、性成熟に達した雄の Meishan と Landrace では、血中アンドロゲン濃度に著しい違いがあることが明らかになった。

(4) 血中テストステロン濃度と CYP1A 遺伝子発現量との関連性

性成熟に達した雄の血中アンドロゲン濃度は Meishan の方が Landrace に比較して著しく高いこと、雄性 Meishan では CYP1A 発現が雌に比較して抑制されているのに対し、雄性 Landrace では雌と同レベルであること、Meishan の雄を去勢すると CYP1A 発現は雌と同レベルまでに回復すること、Landrace にテストステロンを投与すると CYP1A 発現は雄の Meishan と同レベルに抑制されることから、血中アンドロゲン濃度と CYP1A 発現量には負の相関性があり、血中アンドロゲン濃度が閾値を超えた場合に CYP1A 発現の抑制が起きることが示唆された。

そこで、1 ヶ月齢~5 ヶ月齢までの雄から経時的に血液と肝臓を採取し、血中テストステロン濃度と CYP1A 遺伝子発現量との関連性を解析した。血中アンドロゲン濃度と CYP1A1 あるいは CYP1A2 遺伝子発現量には負の相関性があり、約 33 ng/ml の血中アンドロゲン濃度を超えた場合に、CYP1A1/2 の構成的遺伝子発現が抑制されることが明らかになった (Fig. 5)。また、CYP1A1 mRNA 量と CYP1A2 mRNA 量との間には正の相関性が認められ ($r = 0.8090$, $P < 0.001$)、両遺伝子は同じ制御下にあることが示唆された。

(5) Meishan, Landrace およびそれらの F1 を用いた解析

雄の血中テストステロン濃度が異なる

Meishan と Landrace の交配により F1 (LM および ML) を作成し、血中テストステロン濃度を 1 ヶ月齢から 5 ヶ月齢まで経時的に測定した。LM、ML のいずれの F1 でも、雄は Meishan と同様の血中テストステロン濃度を示した (Fig. 6)。これらの結果より、血中テストステロンの高濃度発現形質は、常染色体性に優性遺伝することが明らかとなった。

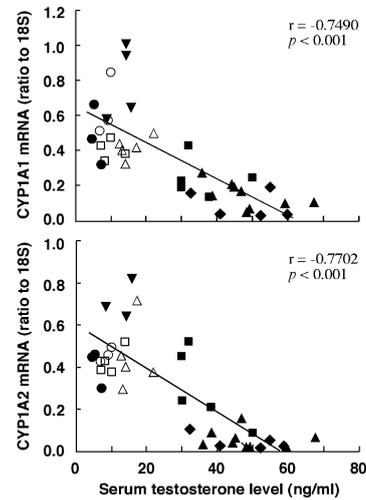


Fig. 5 (発表論文④). Correlations between serum testosterone level and the gene expression level of *CYP1A1* or *CYP1A2* in male pigs. Closed and open symbols show Meishan pigs and Landrace pigs, respectively. ○, ●; 1-month-old, ▼; 2-month-old, ■, □; 3-month-old, ◆, 4-month-old, ▲, △; 5-month-old. The correlation was assessed by regression analysis. *r*, correlation coefficient.

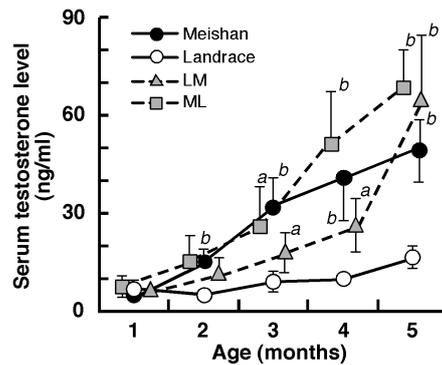


Fig. 6 (発表論文①). Age-dependent changes in the levels of serum testosterone in the male Meishan pigs, Landrace pigs and their F1 (ML and LM) pigs. ^{a,b}Significant differences from the age-matched male Landrace pigs: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

5 ヶ月齢の Meishan, Landrace およびその F1 である LM および ML の肝臓における CYP1A1, CYP1A2, CYP2A19 および CYP2E1 の遺伝子発現

量を測定した結果、血中テストステロン濃度が高い LM および ML では、雄の遺伝子発現が雌に比較して著しく抑制され、Meishan の雄と同レベルであること、また一方、Landrace では CYP2A19 除いてそれら発現に性差は認められなかった (Fig. 7)。これらの結果から、高濃度の血中テストステロンは、種々 CYP 遺伝子の発現を抑制的に制御していることを強く示唆している。

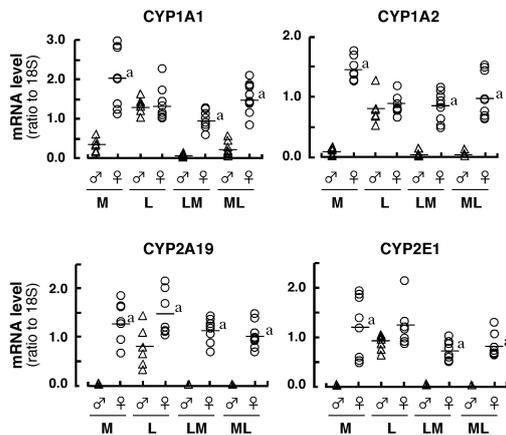


Fig. 7 (発表論文①). Expression levels of hepatic CYP mRNAs in 5-month-old Meishan (M) pigs, Landrace (L) pigs, and their F1 (ML and LM) pigs. Bar indicates the average in each group. Significant difference between males and females in each breed: $^aP < 0.01$.

そこで、血中アンドロゲン濃度と CYP2A19 および CYP2E1 の遺伝子発現量との関連性をさらに解析した。その結果、血中アンドロゲン濃度が 30 ng/ml を越えると、これら遺伝子発現が顕著に抑制されることが明らかとなった (Fig. 8)。

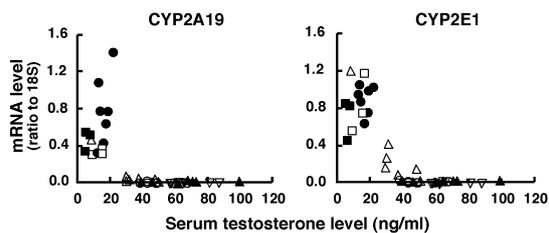


Fig. 8 (発表論文①). Relationships between the serum testosterone level and the gene expression level of CYP2A19 and CYP2E1 in male pigs. ■; 1-month-old Meishan pigs (n = 3), □; 2-month-old Meishan pigs (n = 3), △; 3-month-old Meishan pigs (n = 7), ○; 5-month-old Meishan pigs (n = 8), ●; 5-month-old Landrace pigs (n = 7), ▲; 5-month-old LM pigs (n = 7), ▽; 5-month-old ML pigs (n = 7).

さらに、Meishan および Landrace の 5 ヶ月

齢の雌と去勢した雄にテストステロンを投与した動物の場合には、両品種ともに CYP2A19 および CYP2E1 の遺伝子発現は Meishan の雄レベルまで低下することから、高濃度のテストステロンが CYP2A19 および CYP2E1 の遺伝子発現が抑制することが証明された。

さらに、CYP2B22, CYP3A22, CYP3A29, CYP3A46, CYP2C49 や CYP2C33、また、第 II 相薬物代謝酵素について、5 ヶ月齢の雌雄 Meishan, Landrace およびそれらの F1 (LM および ML) を用いて肝臓における遺伝子発現量を解析した結果、CYP1A と同様にテストステロン濃度に依存して発現量が低下する遺伝子として、硫酸抱合酵素遺伝子の SULT1A1 および SULT2A1 が新たに見出された。

(6) まとめ

本研究により、高濃度のテストステロンにより肝臓の構成的遺伝子発現が抑制される薬物代謝酵素遺伝子として、CYP1A1, CYP1A2, CYP2A19, CYP2E1 および SULT1A1, SULT2A1 を同定した。さらに、テストステロンによるこれら遺伝子の発現抑制作用には閾値が見られることを明らかにした。薬物代謝酵素の発現における性差の要因として成長ホルモンの分泌パターンが知られているが、本研究により、少なくともブタではテストステロンが CYPs や SULT 遺伝子の発現を制御する主要な生理的因子になっていることが示された。

テストステロンにより発現抑制がみられた上記遺伝子の転写調節領域にはアンドロゲン受容体の結合配列は見当たらず、テストステロンによるこれら遺伝子発現抑制はアンドロゲン受容体を介した間接的な作用によると考えられる。その機序の解析は今後の大きな課題と捉えている。なお、CYPs の転写調節因子として知られる AhR, ARNT, CAR, PXR, HNF4 α , HNF1 α の肝臓における遺伝子発現量に Meishan, Landrace 両品種ともに性差は認められなかった。

また、本研究により、血中アンドロゲンの高濃度発現形質は常染色体性に優性遺伝し、CYPs や SULT の発現レベルに影響することが明らかになったことから、血中のアンドロゲン濃度のレベルを規定する遺伝子を明らかにすることは、特に、アンドロゲン依存的な薬物代謝酵素遺伝子発現における個体差を解明する一助になるとともに、医薬品や有害物質に対する個別感受性を理解する上で重要であると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① M. Kojima and M. Degawa (2013) Serum androgen level is determined by autosomal dominant inheritance and regulates sex-related *CYP* genes in pigs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 833-838 (doi: 10.1016/j.bbrc. 2012.11.060). 査読有
- ② M. Kojima, T. Ashino, T. Takemi, Y. Iwakura and M. Degawa (2012) Involvement of interleukin-1 in lead nitrate-induced hypercholesterolemia in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 246-250 (doi:10.1248/bpb. 35. 246). 査読有
- ③ M. Kojima, T. Ashino, T. Takemi, Y. Iwakura and M. Degawa (2011) Interleukin-1 controls the constitutive expression of the *Cyp7a1* gene by regulating the expression of *Cyp7a1* transcriptional regulators in the mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1644-1647 (doi:10.1248/bpb.34.1644). 査読有
- ④ M. Kojima, M. Sekimoto and M. Degawa (2010) Androgen-mediated down-regulation of *CYP1A* subfamily genes in the pig liver. *J. Endocrinol.* **207**, 203-211 (doi: 10.1677/JDE-10-0160). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Misaki Kojima, Masashi Sekimoto, Masakuni Degawa : Sex-differences in the constitutive gene expression levels of CYPs in the pig liver: Androgen-mediated downregulation. 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka, 2012年12月3日、福岡
- ② 小島美咲、芦野隆、吉田武美、岩倉洋一郎、関本征史、出川雅邦 : マウス肝での cholesterol 7 α -hydroxylase およびその転写因子の構成的遺伝子発現における Interleukin-1 の寄与. フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012年10月25日、名古屋
- ③ 小島美咲、出川雅邦 : ブタにおける血清中アンドロゲン濃度は遺伝的に規定され、肝 CYP1A 酵素遺伝子の発現に影響を与える. 第84回日本生化学会、2011年9月22日、京都
- ④ 小島美咲、出川雅邦 : ブタの肝臓における構成的 CYP2 および CYP3 ファミリー酵素の遺伝子発現に及ぼすアンドロゲンの影響. 日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 美咲 (KOJIMA MISAKI)
独立行政法人農業生物資源研究所・
家畜ゲノム研究ユニット・上級研究員
研究者番号 : 80355742

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

出川 雅邦 (DEGAWA MASAKUNI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号 : 50134002