

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24年 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659028

研究課題名（和文）CYP3A4 誘導に伴う脂質代謝異常：新規な生活習慣関連疾患発症要因

研究課題名（英文）CYP3A4 induction-associated dyslipidemia: a new risk factor for lifestyle disease.

研究代表者

山添 康 (YAMAZOE YASUSHI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00112699

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝細胞におけるヒト CYP3A4 やマウス CYP3A11 の発現は細胞内コレステロールレベルにより制御されていること、コレステロールレベルの低下により活性化される SREBP-2 は CYP3A 遺伝子の発現を負に制御していること、オキシステロールにより活性化される LXR α は CYP3A 遺伝子を正に制御していることを明らかにした。また、マウス肝細胞にアデノウイルスを利用して CYP3A4 を高発現すると、脂質代謝関連遺伝子の発現プロファイルが変化することが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have obtained following findings: 1) the expressions of mouse *Cyp3a11* and human *CYP3A4* in hepatocytes are modulated by cellular cholesterol levels, 2) SREBP-2 activated by reduced cellular cholesterol levels down-regulates the expressions of CYP3A genes, 3) LXR α , which is activated by cholesterol metabolites oxysterols, transactivates the expression of CYP3A genes. Moreover, we demonstrated that the adenoviral overexpression of CYP3A4 changed the expression profile of genes associated with lipid metabolism in cultured mouse hepatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

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：CYP3A4、CYP3A11、コレステロール、オキシステロール、脂質代謝、アデノウイルス、転写調節、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

リファンピシンやシクロスポリンなど、ある種の医薬品による副作用として脂肪肝や高脂血症などの脂質代謝異常が知られている。この薬剤誘発性の脂質代謝異常の発症機構はよくわかっていないが、peroxisome

proliferator-activated receptor (PPAR) や liver X receptor (LXR) など脂質代謝に関連した核内受容体の関与が指摘されている。すなわち、薬物曝露によりこれら核内受容体の転写活性が変化すると、脂質代謝関連遺伝子の発現パターンが変化し、その結果細

胞内の脂質代謝の変動については代謝機能異常が生じるのではないかと考えられている。

チトクローム P450 (CYP) を始めとする薬物代謝酵素は、薬物などの外来性化合物だけでなく、ステロイドなどの生体内脂質の代謝反応も触媒する。例えば、ヒトの主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 は、コレステロールの 4β 水酸化反応 (J Biol Chem, 277:31534, 2002)、胆汁酸 (ムリコール酸や 3-デヒドロコール酸) の生合成反応 (Drug Metab Dispos, 36:1983, 2008) を触媒することが報告されている。興味深いことに、4β 水酸化コレステロールは強力な LXR 活性化物質として知られている (Nature 383:728, 1996)。また分担研究者の吉成らは、高脂肪食負荷によりマウス肝の Cyp3a レベルが低下することを報告している (Pharm Res, 23:1188, 2006)。これらのことは、CYP3A の脂質ホメオスタシスへの関与を示唆しており、CYP3A4 などの薬物代謝酵素レベルは薬物の曝露に応答して増加することを考え併せると、CYP3A の誘導は、薬物の解毒・排泄を亢進する一方で、脂質代謝の変化を引き起こす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

CYP3A4 誘導はこれまで薬物の解毒・排泄のための生体応答としか捉えられておらず、CYP3A4 誘導と脂質代謝異常を関連付けた研究はない。しかしながら、上記の理由から、CYP3A4 誘導は単に薬物動態学的な薬物相互作用の原因となるだけでなく、生体の脂質ホメオスタシス破綻という重大な医薬品副作用の原因となっている可能性がある。そこで本研究では、脂質代謝異常症の発症における CYP3A 誘導の寄与を明確に示すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 脂質代謝関連遺伝子発現に対する CYP3A4 過剰発現の影響 :

HepG2 細胞 (理研) に、当研究室で作製した CYP3A4 発現アデノウイルス (Ad3A4) を 20 moi で感染させ、3 日間培養した後、総 RNA を抽出した。4 ウェル分の RNA をプールして、PCR アレイ解析に用いた。PCR アレイ解析は、Human Lipoprotein Signaling & Cholesterol Metabolism (SABiosciences) を用いて行った。

AML12 細胞 (ATCC) に Ad3A4 を 40、80 または 120 moi で感染させた。その後 10 μg/mL cholesterol および 1 μg/mL 25-hydroxy-cholesterol (25HC) の存在下あるいは非存在

下で 3 日間培養した。100 μM の testosterone を含む培地に交換し、4 時間培養後の培養液を回収し、6β-testosterone 生成量を HPLC にて定量し、CYP3A 活性を測定した。一方で、培地を除いた細胞から総 RNA を抽出した。

HepG2 または AML12 細胞から抽出した RNA を用いて、cDNA を作製し、その後 SYBR Green を利用したリアルタイム PCR を行うことで、各遺伝子の mRNA レベルを測定した。

2) ステロール関連転写因子による CYP3A 遺伝子の発現調節機序の解析 :

AML12 細胞における mRNA レベルの測定は、上述の通り行った。

レポーターアッセイは HepG2 細胞を用いて行った。Cyp3a11 または CYP3A4 のプロモーター領域を含む野生型または変異コンストラクト、ならびに各種転写因子の発現プラスミドは、PCR を利用して当研究室で作製した。レポーター活性は Promega 社のキットを利用して測定した。

PCR を利用して pGEX-4T-1 (GE Healthcare) 由来の発現プラスミドを作製し、これらを大腸菌に導入した後、IPTG で発現を誘導し、GSH-Sepharose レジン (GE Healthcare) を用いて各種 GST 融合タンパク質を調製した。これらと、TNT Quick Coupled Transcription/ Translation System (Promega) で作製したタンパク質を反応させ、GSH-Sepharose レジンを用いて結合タンパク質を回収した後、ウェスタンブロットにより結合量を解析した。

免疫沈降法には、コレステロール欠乏精製飼料で飼育したマウスの肝から調製した核画分を用いた。抗 SREBP-2 抗体と核画分を 4 度で反応させ、Protein G-coupled Dynabeads (Life Technologies) で IgG を回収した。その後ウェスタンブロットにより沈降物を解析した。

クロマチン免疫沈降法には、精製飼料または一般飼料 (CE-2 : 日本クレア) で飼育したマウスの肝を用いた。これら肝をミンストした後、ホルムアルデヒドでクロスリンクを行ない、超音波処理により DNA を断片化した。その後、各抗体で免疫沈降を行い、上述の方法で免疫沈降物を回収した。さらに、脱クロスリンク、RNase/proteinase 処理を行った後、DNA を精製した。得られた DNA 断片を鋳型として、PCR により、DNA 量を解析した。

ゲルシフトアッセイは、TNT Quick Coupled Transcription/ Translation System で作製したタンパク質と ³²P 標識した DNA プローブを用いて行った。

4. 研究成果

1) 脂質代謝関連遺伝子発現に対する CYP3A4 過剰発現の影響

ヒト肝癌由来の HepG2 細胞に CYP3A4 をアデノウイルスを用いて過剰発現し、脂質代謝に関わる遺伝子の発現変動プロファイルの変化を PCR アレイ法により解析した。その結果、複数の遺伝子の発現変動が示唆された。しかしながら、RT-PCR による詳細な解析の結果、再現よく顕著な変動が認められる遺伝子を見出すことはできなかった。

次に、より肝機能が維持されている細胞として不死化マウス肝細胞 AML12 細胞を用いた解析を行なった。AML12 細胞に CYP3A4 を過剰発現させ、脂質代謝関連遺伝子の発現変動を解析した。その際に、cholesterol/25HC の添加の影響を併せて解析した。なお、40 moi および 80 moi において感染量依存的に CYP3A 活性が増加することを確認した。

LXR α の標的遺伝子である *Srebf1* と *Scd1* の mRNA レベルは、cholesterol/25HC 非存在下においてのみ、CYP3A4 の発現量依存的に減少した。一方、同じく LXR α の標的遺伝子である *Fasn* については、cholesterol/25HC 非存在下では CYP3A4 発現の影響は認められなかったが、cholesterol/25HC 存在下では CYP3A4 の発現により mRNA レベルは増加した。また、CYP3A4 を発現させると、cholesterol/25HC の有無に関わらず、内因性の *Cyp3a11* mRNA レベルは著しく低下した。

以上の結果から、CYP3A4 の過剰発現により、脂質代謝に関連する遺伝子や *Cyp3a11* の発現が変動することが示され、CYP3A4 誘導はこれら遺伝子の発現制御に関わる細胞内低分子化合物の代謝パターンを変える可能性を示すことができた。

2) ステロール関連転写因子による CYP3A 遺伝子の発現調節機序の解析

当研究室で見出した、コレステロール欠乏飼料摂取に伴う肝 *Cyp3a11* の発現低下の機構を解明するため、まず、各種 *Cyp3a11* レポーターコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った。その結果、SREBP-2 は、*Cyp3a11* の -1.6 k の位置に存在する HNF-4 α 結合モチーフを介して、*Cyp3a11* の転写を抑制することが明らかとなった。*CYP3A4* コンストラクトを用いた同様の解析を行なったところ、SREBP-2 による CYP3A4 発現抑制には、-10 k に存在し、既知の HNF-4 α 結合モチーフを 2ヶ所含む XREM と呼ばれる領域が重要であることが示された。

次に、SREBP-2 による *Cyp3a11* の転写抑制機構の詳細な解析を行なった。まず、GST プルダウンアッセイおよび DNA アフィニティアッセイにより、SREBP-2、HNF-4 α および HNF-4 α の代表的なコアクチベーターである PGC-1 α の相互作用を調べた。その結果、SREBP-2 は溶液中で HNF-4 α と結合するが、DNA (DR1 モチーフ) に結合した HNF-4 α とは結合でき

ないこと、SREBP-2 はその転写活性化ドメインを介して PGC-1 α と結合することが明らかになった。さらに、マウス肝の核画分を用いた共免疫沈降法により、活性型 SREBP-2 と PGC-1 α が核内で複合体を形成している可能性が示された。これらの結果から、活性化した SREBP-2 は、PGC-1 α と直接結合し、DR1 に結合した HNF-4 α への PGC-1 α のリクルートを抑制することが示唆された。最後に、通常食とコレステロール欠乏食を与えたマウスの肝を用いてクロマチン免疫沈降法を行ったところ、コレステロール摂取量の低下に伴い、DR1 上へリクルートされる PGC-1 α 量が減少することが明らかとなった。

マウス AML12 細胞やヒト初代培養肝細胞を LXR α リガンドである GW3965 で処置すると、*Cyp3a11* や *CYP3A4* の mRNA レベルが上昇することを見出した。このことから、SREBP-2 は CYP3A 遺伝子発現の負の制御因子であるのに対して、LXR α は CYP3A 遺伝子を正に制御している可能性が示された。そこで、LXR α による *CYP3A4* 発現制御機構について詳細な解析を進めた。

まず、当研究室で以前に作製した *CYP3A4* レポーターコンストラクトを用いて、レポーターアッセイを行ったところ、LXR α の強制発現および LXR α リガンドの処置により、レポーター活性が上昇したことから、LXR α は *CYP3A4* の転写活性化作用を有することが示された。次に欠失および変異コンストラクトを用いたレポーターアッセイにより、LXR α 応答配列の同定を試みた。その結果、異物応答性の核内受容体である PXR および CAR の応答配列として知られている 2つのモチーフ (dNR1 および eNR3A4) を欠損すると、LXR α による *CYP3A4* の転写活性化は起こらなくなることが分かった。実際にゲルシフトアッセイにおいて、LXR α と RXR α のヘテロダイマーはこれらモチーフを含む DNA に結合した。

LXR α が PXR 応答配列に結合することから、*CYP3A4* 転写活性化における LXR α と PXR の相互作用について解析した。その結果、LXR α の *CYP3A4* 転写活性化作用は PXR に比べて弱いこと、LXR α と PXR を同時に活性化した場合には、*CYP3A4* の転写は、PXR 単独活性化時より弱く、LXR α 単独活性化時より強くなること、レポーターアッセイにより示された。したがって、LXR α は *CYP3A4* の転写において PXR と競合する可能性が示された。

以上の結果から、コレステロール欠乏により活性化する転写因子 SREBP-2 ならびにコレステロール代謝物により活性化する LXR α と PXR は、CYP3A 遺伝子の転写において、それぞれ負および正の調節因子として働くことが示された。したがって、CYP3A 遺伝子の発現は、他のステロール代謝関連遺伝子と同様に、細胞内コレステロールレベルによって厳

密に調節されている可能性が考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Shin-ichi Inoue, Kouichi Yoshinari, Mika Sugawara, Yasushi Yamazoe: Activated sterol regulatory element-binding protein-2 suppresses hepatocyte nuclear factor-4-mediated *Cyp3a11* expression in mouse liver. *Molecular Pharmacology*, (査読有) 79 巻、2011 年、148-156、DOI: 10.1124/mol.110.068577

[学会発表] (計 5 件)

1. 櫻井香織、吉成浩一、渡邊圭祐、榎谷友里、山添康：核内受容体 LXR α による CYP3A4 遺伝子の転写活性化。日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌

2. 渡邊圭祐、吉成浩一、櫻井香織、山添康：PXR 依存的な CYP3A4 遺伝子の転写活性化は LXR α により抑制される。日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌

3. 吉成浩一：Dietary cholesterol-associated regulation of hepatic *CYP3A* gene expression. 日本薬物動態学会 第 26 年会 (招待講演) 2011 年 11 月 18 日、広島

4. Kouichi Yoshinari: Mechanisms for the xenobiotic-induced and physiological/nutritional condition-associated changes in the gene expression of drug-metabolizing enzymes. 第 4 回 Asia-Pacific 国際薬物動態学会 (AP-ISSX) (招待講演) 2011 年 4 月 23 日、台南 (台湾)

5. Shin-ichi Inoue, Kouichi Yoshinari, Yasushi Yamazoe: Activated sterol regulatory element-binding protein-2 suppresses hepatocyte nuclear factor-4-mediated *Cyp3a11* expression in mouse liver. 第 9 回国際薬物動態学会

(ISSX) 国際会議、2010 年 9 月 5 日、イスタンブール (トルコ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山添 康 (YAMAZOE YASUSHI)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00112699

(2) 研究分担者

吉成 浩一 (YOSHINARI KOUICHI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60343399