

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13201  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790177  
 研究課題名（和文）個別化医療に繋がる成長ホルモンによる CYP1A2 の性特異的発現調節の分子の解明  
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of CYP1A2 gene expression in male regulated by growth hormone for personalized medicine  
 研究代表者  
 河崎 優希 (KAWASAKI YUKI)  
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教  
 研究者番号：30432107

研究成果の概要（和文）：男性において女性よりも発現量の高い薬物代謝酵素 CYP1A2 の性特異的発現調節機構を解明するために、成長ホルモンの性二形性分泌様式の *Cyp1a2* 遺伝子発現に与える影響を解析した。メス型分泌様式による成長ホルモンの添加は肝細胞において CYP1A2 mRNA の発現を減少させた。また、転写因子 C/EBP $\alpha$  と Fra1 が *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域に結合することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular mechanism regulating the CYP1A2 sex-specific expression, the effect of the growth hormone was examined. The continuous females specific growth hormone pattern treatment led the decreased CYP1A2 mRNA expression in the hepatocytes. The binding of Fra1 and C/EBP $\alpha$  to the *Cyp1a2* gene 5' -flanking region was revealed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：CYP1A2、遺伝子発現制御、性差

## 1. 研究開始当初の背景

代表的なシトクロム P450 酵素である CYP1A2 は、生体内で薬毒物の代謝反応の中心的な役割を担う酵素である。CYP1A2 は、テオフィリンやカフェインなどの多くの薬物の代謝に関与するのみならず、多種類の発がん物質の代謝的活性化やステロイドホルモンなどの内因性物質の代謝にも関与するなど生体恒常性維持においても重要な役割を果たす。CYP1A2 発現量の個人差は、薬効や副作用発現の個人差の原因になると考えられている。従って、CYP1A2 発現量の個人差の分子メカニズムの解明は、薬物の安全かつ効果的

な投与設計を目指した個別化医療の進展にとって重要な知見となる。

CYP1A2 の発現は女性よりも男性の方が高く、その性差が医薬品の薬効や副作用の発現や発がん物質への感受性に影響を与えると考えられている。しかし、CYP1A2 の性特異的発現調節機構の分子メカニズムの詳細はほとんど分かっていなかった。成長ホルモンの分泌を抑制させたマウスではオスメスともに CYP1A2 mRNA の発現が著しく減少することが見出された (Jarukamjorn *et al.*, 2006)。成長ホルモンは、げっ歯類のオスでは間欠的に分泌され、メスではほぼ一定量が持続的に

分泌されており、ヒトでも類似の性二形性の分泌がみられるホルモンである。

さらに、成長ホルモンをオスマウスにメス型成長ホルモン分泌様式で投与すると CYP1A2 発現が減少すること、雌マウスにオス成長ホルモン分泌様式で投与すると CYP1A2 発現が増加することが見出された (Jarukamjorn *et al.*)。オス型成長ホルモン投与によるメスマウスでの CYP1A2 発現増加は、男性において CYP1A2 発現量が高いという過去の報告と一致し、これらのことから、CYP1A2 の性特異的発現が成長ホルモンの性二形性分泌様式によって制御されている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでにマウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流領域-9.5 kbp を単離し、高い転写活性を有することを見出した (未発表)。データベース検索において、-9.5 kbp の領域には、STAT などの成長ホルモンにより活性化される転写因子の予想結合配列が複数箇所存在した。また、CYP1A2 はダイオキシンなどの芳香族化合物によって発現が誘導される酵素である。芳香族化合物によるマウス *Cyp1a2* 遺伝子の誘導的発現は-12 kbp から-14 kbp の領域に存在する外来異物応答領域が担っていること、さらに、-9.5 kbp までの領域は芳香族化合物による誘導的な発現調節には寄与せず、常在的な *Cyp1a2* 発現調節にのみ寄与する可能性が示唆された (Kawasaki *et al.*, 2010)。これらのことから *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域の-9.5 kbp 内に成長ホルモン応答に必要な領域を保持し、成長ホルモン依存的 *Cyp1a2* 遺伝子発現を制御する可能性が高いと考えられる。そこで本研究では、成長ホルモン分泌様式依存的な CYP1A2 性特異的発現調節機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 雄性 C57BL/6 マウスからコラゲナーゼ灌流法により初代培養肝細胞を調製した。初代培養肝細胞培養系において、成長ホルモンの性二形性分泌様式を、オス型 (パルス型) 成長ホルモン分泌様式は、「240 ng/ml 成長ホルモン存在下で 1 時間培養後、成長ホルモン未添加で 11 時間の培養を 4 回反復」により、また、メス型 (連続型) 成長ホルモン分泌様式は、「20 ng/ml 成長ホルモン存在下で 48 時間培養」(Sakuma *et al.*, 2007) により再現した。細胞からトータル RNA を抽出し、

CYP1A2 の mRNA の発現量の変動を定量リアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(2) ①データベース検索において、マウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への結合が予測された転写因子 AP-1 (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) の肝細胞での発現を RT-PCR 法によって解析した。AP-1 および肝特異的転写因子 C/EBP $\alpha$  の *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への結合を各因子に対する特異的な抗体を用いて electrophoretic mobility shift assay (EMSA) およびクロマチン免疫沈降法により解析した。

②Fra1 の発現臓器特異性を調べるためにマウスから肝臓、腎臓、腸、胃、肺、筋肉、大脳、小脳、心臓、脾臓、精巣を摘出し、トータル RNA を抽出し、Fra1 mRNA 発現を定量リアルタイム RT-PCR 法によって解析した。

(3) マウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域-9.5 kbp を pGL3-basic レポーターベクターにサブクローニングし、レポーターコンストラクトを作製した。マウス初代培養肝細胞に一過性にレポーター遺伝子を導入し、成長ホルモン添加および転写因子の過剰発現によるレポーター活性の変動をレポーター遺伝子アッセイにより解析した。

## 4. 研究成果

(1) 成長ホルモン性二形性分泌様式による CYP1A2 mRNA 発現変動解析

オス由来初代培養肝細胞において、メス型 (連続型) 分泌様式によって成長ホルモンを添加し培養したところ、CYP1A2 mRNA 発現量は減少した。一方、オス型成長ホルモン分泌様式による添加によっては、肝細胞での CYP1A2 mRNA 発現量は変化しなかった。このことから、初代培養肝細胞系において成長ホルモン応答性を有することとメス型成長ホルモン分泌様式により CYP1A2 mRNA 発現が抑制されていることが考えられた。

(2) マウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への転写因子の結合解析

成長ホルモンの分泌様式により CYP1A2 mRNA の発現量に変動したことから、成長ホルモンの分泌様式により活性が調節される転写因子の *Cyp1a2* 遺伝子発現調節への関与が考えられた。*Cyp1a2* 遺伝子発現調節に関わる転写因子の解析を行った。

① *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域に 5' - TGACTCA -3' の配列が存在した。5' - TGACTCA -3' の配列は転写因子 AP-1 の結合配列であることから、AP-1 の *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への結合が予測された。AP-1 は Jun および Fos ファミリーで構成される。AP-1 構成因子である

c-Jun、JunB、JunD、c-Fos、FosB、Fra1、およびFra2の肝細胞でのmRNAの発現をRT-PCR法で調べた。いずれの因子も肝細胞での発現が検出された。

②①で発現が確認された AP-1 構成因子の *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への結合を EMSA で解析した。また、肝特異的転写因子の一つである C/EBP $\alpha$ は CCAAT ボックスに結合し転写を活性化させるが、c-Fos や c-Jun とヘテロダイマーを形成すると AP-1 結合部位に結合することが知られているから、C/EBP $\alpha$ の結合も同様に解析した。EMSA において、c-Jun、JunB、JunD、c-Fos、FosB、Fra1、Fra2 および C/EBP $\alpha$ に対する特異的抗体を用いてスーパーシフトを調べたが、抗体添加によるスーパーシフトは検出されなかった。そこで、クロマチン免疫沈降法により AP-1、C/EBP $\alpha$ の *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域への結合を解析した。その結果、Fra1 および C/EBP $\alpha$ の結合が検出された。Fra1、C/EBP $\alpha$ 以外の因子は結合が検出されなかった。

③C/EBP $\alpha$ は肝特異的転写因子であるが、Fra1の発現組織特異性の詳細はほとんど分かっていなかったことから、Fra1のmRNA発現の臓器特異性を定量リアルタイム RT-PCR法により解析した。その結果 Fra1の発現は肝臓以外にも胃、心臓、脳、精巣や肺で検出された。

### (3) 成長ホルモンおよび転写因子の *Cyp1a2* 遺伝子転写活性変動の解析

①マウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流-9.5 kbp を含むレポーターコンストラクト (m1a2-9.5/pGL3 basic) もしくは-4.8 kbp を含むレポーターコンストラクト (m1a2-4.8/pGL3 basic) を肝細胞に導入した。成長ホルモンをオス型もしくはメス型分泌様式で添加し、レポーター活性を測定した。メス型分泌様式によって m1a2-9.5/pGL3 basic のレポーター活性は減少した。一方、m1a2-4.8/pGL3 basic のレポーター活性は、オス型もしくはメス型のどちらの成長ホルモン分泌様式によっても変化しなかった。このことから、*Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域の-4.8 から-9.5 kbp の領域に成長ホルモン応答領域が存在し、CYP1A2 発現を制御していることが考えられた。

②肝細胞に C/EBP $\alpha$ と Fra1 を過剰発現させ CYP1A2 mRNA 発現を解析した。C/EBP $\alpha$ もしくは Fra1 単独の過剰発現では、CYP1A2 mRNA 発現は変化しなかった。C/EBP $\alpha$ と Fra1 の両者の過剰発現では CYP1A2 mRNA 発現量は減少した。C/EBP $\alpha$ と Fra1 の共発現発現下で成長ホルモンを添加したところ、CYP1A2 mRNA の発現量は変化しなかった。

AP-1 は、TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) により活性化される転写因子であることから、C/EBP $\alpha$ および Fra1 過剰発現

下で TPA を添加し、CYP1A2 mRNA 発現を解析した。C/EBP $\alpha$ 過剰発現下で TPA を添加すると、CYP1A2 mRNA 発現は減少した。C/EBP $\alpha$ と Fra1 過剰発現下において成長ホルモンと TPA を添加しても同程度の CYP1A2 mRNA 発現を示した。

### (4) 総括

本研究では、CYP1A2 の性特異的発現調節機構を明らかとするために、成長ホルモンの性二形性分泌様式および転写因子の解析を行った。オス由来肝細胞においてメス型成長ホルモン分泌様式による成長ホルモンの添加により CYP1A2 mRNA 発現が減少したことから、-9.5 kbp を含むレポーターコンストラクトを用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、メス型成長ホルモン分泌様式により、レポーター活性が減少したことから、-9.5 kbp の領域内に成長ホルモンに応答する領域が存在する可能性が考えられた。成長ホルモンによって、活性が変動する転写因子による発現調節が考えられることから、-9.5 kbp に結合する転写因子を探索したところ、AP-1 結合配列が存在した。クロマチン免疫沈降法により AP-1 構成因子のひとつである Fra1 と肝特異的転写因子である C/EBP $\alpha$ が *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域に結合することが明らかとなった。さらに、C/EBP $\alpha$ の過剰発現と TPA 処理および C/EBP $\alpha$ と Fra1 の過剰発現により CYP1A2 の mRNA 発現が減少したことから、C/EBP $\alpha$ と Fra1 が *Cyp1a2* 遺伝子 5' 上流域に結合し、*Cyp1a2* 遺伝子発現を抑制的に制御している可能性が示唆された。Fra1 と C/EBP $\alpha$ はいずれもパートナーとなる因子とヘテロダイマーを形成する転写因子であるが、Fra1 と C/EBP $\alpha$ のダイマー形成はこれまでに報告されておらず、今後さらに免疫沈降法や re-ChIP などによる詳細な解析が必要である。また、レポーター遺伝子アッセイにおいて Fra1 と C/EBP $\alpha$ の影響の解析には至らなかったため、Fra1 と C/EBP $\alpha$ 過剰発現下でレポーター遺伝子アッセイを行うことで、Fra1 と C/EBP $\alpha$ がレポーター活性に与える影響を解析することが今後の課題の一つである。また、メス型成長ホルモン分泌様式、Fra1 および C/EBP $\alpha$ が *Cyp1a2* 遺伝子発現が負に制御することが示されたが、それぞれの関連性を解析することが重要である。さらに、Fra1 と C/EBP $\alpha$ 過剰発現下において成長ホルモンを添加しても CYP1A2 mRNA 発現量に変化はなかったことから、Fra1 と C/EBP $\alpha$ の活性が成長ホルモンにより制御されない可能性も考えられ、Fra1 と C/EBP $\alpha$ 以外の転写因子による成長ホルモンを介した制御も解析する必要がある。

### 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 1 件)

- ① Udomsuk L., Jarukamjorn K., Putalun W., Sakuma T., Kawasaki Y., Nemoto N.: Modified expression of aryl hydrocarbon receptor-related genes by deoxymiroestrol, a phytoestrogen, in mouse hepatocytes in primary culture. *J. Ethnopharmacol.*, 137: 902-908, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 河崎優希, 古野幸美, 後藤雄真, 佐久間 勉, 櫻井宏明, 根本信雄: Constitutive androstane receptor リガンド誘導性発現調節を担うマウス *Cyp1a2* 遺伝子の 5' -上流域, 日本薬学会第 133 年会, 2013, 3, 28-30, 横浜.
- ② Kawasaki Y., Furuno Y., Goto Y., Sakuma T., Sakurai H., Nemoto N.: Regulatory Elements for Transcriptional Activation of the mouse *Cyp1a2* gene by Constitutive Androstane Receptor-Ligand, 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka, 2012, 12, 2-3, 福岡.
- ③ 古野幸美, 河崎優希, 後藤雄真, 佐久間 勉, 櫻井宏明, 根本信雄: Constitutive androstane receptor アクチベーターによる誘導性発現調節を担うマウス *Cyp1a2* 遺伝子 5' -上流域, 日本薬学会第 132 年会, 2012, 3, 29-31, 札幌.
- ④ Kawasaki Y., Goto Y., Furuno Y., Sakuma T., Sakurai H., Nemoto N.: Constitutive androstane receptor responsive region in the 5' -flanking region of the mouse *Cyp1a2* gene, 第 26 回日本薬物動態学会年会, 2011, 11, 16-18, 広島.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河崎 優希 (KAWASAKI YUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教

研究者番号: 30432107