

氏名（本籍） 小嶋 浩 揮

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 薬博第403号

学位授与年月日 平成19年9月7日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学位論文題目

ヒト由来肝細胞におけるチトクロム P450 遺伝子転写活性化に
及ぼす PXR の役割

論文審査委員 (主査) 教授 山添 康
教授 永沼 章
准教授 守屋 孝洋

論文内容要旨

核内レセプターはリガンド依存性の転写因子であり、特異的リガンドと結合し、標的遺伝子のプロモーター上の応答配列を認識して結合することにより、その遺伝子の転写を促進する。核内レセプターは多くの遺伝子の発現に関与しており、個体発生や器官形成また成体での標的器官の機能維持など幅広い高次生命現象に極めて重要な役割を果たしている。

核内レセプターはアミノ酸配列から核内レセプタースーパーファミリーに分類されており、ヒトにおいて 48 種類の核内レセプターが確認されている。この中で、PXR, CAR, FXR, VDR, LXR, PPAP α は、薬物により活性化され、多くの薬物代謝酵素やトランスポーターの発現を誘導することが報告されている。薬物によって活性化された核内レセプターは RXR α とヘテロ二量体を形成し、ターゲット遺伝子上流のシスエレメントに結合することにより転写を活性化する。これらの核内レセプターを介した転写活性化の多くは、さらに HNF4 α によって促進され、逆に SHP によって抑制されることも知られている。一方、GR α は、PXR や CAR の発現量を増加させることにより、間接的に転写活性化に関与することが報告されている。このように、遺伝子発現は多くの核内レセプターにより複雑に制御されており、従って、P450 遺伝子転写活性化機構を解明するためには、各核内レセプターの詳細な役割を明確にする必要がある。

P450 遺伝子制御に関する多くの研究では、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞に核内レセプターを過剰発現させることにより、その影響をみるものが多い。しかしながら、過剰発現させることにより、細胞内の核内レセプターの発現割合が生理的な条件と大きく異なってしまふ。更に、HepG2 細胞では、核内レセプターの発現量および発現割合がヒト肝臓と大きく異なっており、中でも CAR の発現は、mRNA レベルにおいては認められておらず、外部より遺伝子を導入させて発現させても CAR の核内移行が肝実質細胞とは異なっているといった問題点があり、必ずしも肝で起こっている現象を反映していない可能性が考えられた。

ところで、PXR のリガンド結合能には大きな種差が存在することが知られている。例えば、ヒト PXR のリガンドであるリファンピシンは、ラット PXR のリガンドにはならず、逆に、ラット PXR のリガンドである PCN はヒト PXR のリガンドにはならない。そのため、ヒトの P450 遺伝子の転写活性化機構を解明するためには、ヒト肝由来の細胞を使うことが求められている。

ヒト初代培養肝細胞は、適切な条件で培養することにより *in vivo* に似た誘導プロファイル（強度および選択性）を示すことから、ヒト肝における P450 発現における PXR の役割を評価するためには、ヒト初代培養肝細胞を用いることが適切と考えられる。ヒト初代培養肝細胞および PXR リガンドを用いた誘導試験により、CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 および CYP3A5 遺伝子の転写活性化に PXR が関与していることが予想されるものの、リガンドの PXR 以外の核内レセプターへの作用や転写補助因子への作用も考えられ、PXR の関与を直接的に示すものではない。

そこで、本研究では、より生理的な条件でヒト肝における P450 遺伝子の転写活性化に及ぼす PXR の

寄与を明らかにすることを目的として、ヒト PXR のみの発現を選択的に阻害する siRNA を生じるアデノウイルス (Ad hPXR-siRNA) を作製し、ヒト PXR を特異的にノックダウンすることにより、ヒト由来肝細胞における個々の P450 分子種に及ぼす PXR の寄与について検討した。

まず、Ad hPXR-siRNA を感染させてからの効果持続について検討した。PXR mRNA 発現レベルは 4 MOI の Ad hPXR-siRNA 感染 3, 5 および 7 日でそれぞれコントロールの 22%, 28% および 28% まで低下し、ウイルス感染 3 日以降 7 日まで、その効果が確認された。しかしながら、ウイルス感染 3 日の時点では、PXR 以外の核内レセプターの発現レベルに変化が認められなかったのに対し、ウイルス感染 5 日目および 7 日目では、FXR, SHP および GR α mRNA の発現レベルに変化が認められた。そのため、PXR 以外の核内レセプターの発現レベルに影響を与えない条件である、ウイルス感染 3 日以内に実験を行うことにした。

次に、試験に用いる Ad hPXR-siRNA の選択性を明らかにすることを目的として、ヒト初代培養肝細胞に Ad hPXR-siRNA を 0.04 から 4 MOI で 3 日間感染させ、PXR および CAR, FXR, VDR, GR α , SHP, HNF4 α , RXR α の発現レベルを real-time PCR にて測定した。PXR mRNA の発現レベルは、Ad hPXR-siRNA の濃度依存的に減少したのに対し、CAR, FXR, RXR α , HNF4 α , SHP および GR α の発現レベルに有意な変化は認められなかった。

PXR の発現レベルの減少に伴い、調べた 9 つの P450 遺伝子のうち、7 つの発現レベルが変化した。PXR のターゲット遺伝子としてよく知られている CYP3A4 mRNA 発現レベルは Ad hPXR-siRNA の濃度依存的に減少し、4 MOI でコントロールの 18% まで低下した。同様に、CYP2A6 mRNA 発現レベルは Ad hPXR-siRNA の濃度依存的に減少し、4 MOI でコントロールの 16% まで低下し、PXR ノックダウンの影響を大きく受けた。

また、CYP2C8, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C9 および CYP2C19 mRNA 発現レベルは 4 MOI の Ad hPXR-siRNA を感染させることにより、コントロールのそれぞれ 29%, 31%, 58%, 63% および 45% に減少したものの、PXR ノックダウンの影響は CYP3A4 に比べ、相対的に小さかった。一方、CYP1A2 および CYP2D6 の発現レベルは Ad hPXR-siRNA の導入により変化しなかった。

更に、PXR の ligand 存在時の P450 遺伝子転写活性化に及ぼす PXR ノックダウンの影響も検討したが、CYP2B6 遺伝子以外では、ligand の有無による、PXR ノックダウンの大きな違いは確認されなかった。Ad hPXR-siRNA はリガンド非存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化をわずかにしか抑制しなかった一方で、ligand 存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化を大きく抑制した。PXR は ligand 存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化には不可欠であるものの、リガンド非存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化には必須ではない可能性が示された。

これまでに報告されている P450 遺伝子上流に存在する PXR 結合領域の数は、CYP3A4 および CYP2A6 では 3 つ、CYP2C8, CYP2B6 および CYP2C9 には 2 つ、CYP2C19, CYP3A5 では 1 つあるのに対し、CYP1A2 および CYP2D6 では現在まで報告されていない。P450 分子種間における PXR の影響の受け方が異なる原因は明確ではなく、更なる研究が必要であるものの、これらの遺伝子のシスエレメ

ントにおける複数の PXR 結合領域が相加・相乗的に遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

なお、本試験により得られた P450 遺伝子の転写活性化における PXR の関与の程度とヒト *in vivo* における誘導の強さは比較的よく一致していた。本研究により P450 遺伝子の転写活性化に PXR が大きく関与していると推定された CYP3A4 は臨床試験においても PXR の ligand により強く誘導されることが報告されている。また、P450 遺伝子の転写活性化に PXR が中程度に関与していると推定された CYP2C8 および CYP2C9 に関しては、臨床試験においても PXR の ligand により中程度（1.3 ～ 3.7 倍）の誘導が報告されている。一方、P450 遺伝子の転写活性化に PXR が関与していないことが推定された CYP1A2 および CYP2D6 においては、臨床において PXR リガンドによる誘導の報告はない。なお、本研究により P450 遺伝子の転写活性化に PXR が大きく関与していると推定された CYP2A6 および CYP2B6 に関しては、*in vivo* での誘導に関する報告が少ないものの、本試験結果から、*in vivo* においても強く誘導を受ける可能性が示唆された。

本試験において、P450 遺伝子の安定性が CYP 分子種間で異なっている可能性もあるため、PXR の寄与の程度を CYP 分子種間で厳密に比較することはできないものの、少なくとも、PXR の寄与が大きいと推定された CYP3A4、CYP2A6 および CYP2B6 (ligand 存在時) においては、遺伝子の転写活性化に PXR が大きく関与していることが示された。ヒト肝において、PXR は CYP3A4 だけではなく、その程度は異なるものの、他の P450 遺伝子 (CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A5) の転写活性化においても主要な役割を果たしていることが示された。

第二章では、同様の手法により、P450 以外の薬物代謝関連タンパク質の遺伝子転写活性化に及ぼす PXR の寄与について検討した。PXR mRNA の減少に伴い、CYP3A4 の場合よりも程度は低いですが、UGT1A6、ABCB1、ABCB11、ABCC2、ABCC3、ABCC4 および SLCO1B1 の mRNA が減少したことから、これらの遺伝子転写活性化に PXR が関与していることが示唆された。

本研究では、PXR が関与する一部の薬物代謝関連タンパク質についてしか検討することができなかったものの、本手法をジーンチップによる網羅的解析へ応用することにより、PXR が関与する多くの遺伝子の全貌が明らかになるものと思われた。

このように、ヒト初代培養肝細胞と核内レセプターをターゲットとした siRNA 発現アデノウイルスを組み合わせる手法は、他の核内レセプターへ応用すること、あるいはジーンチップによる網羅的解析へ応用することにより、薬物代謝関連タンパク質のみならず、多くの遺伝子発現における核内レセプターの役割を明らかにするために高選択的な情報を提供できるものと思われた。

審査結果の要旨

核内レセプターは、標的遺伝子のプロモーター上の応答配列を認識して結合することにより、遺伝子の転写を促進する。PXR, CAR, FXR, VDR, LXR, および PPAP α は、薬物により活性化され、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現を誘導する。このように、遺伝子発現は多くの核内レセプターにより複雑に制御されており、P450 遺伝子転写活性化機構を解明するためには、各核内レセプター個々の詳細な役割を明確にする必要がある。

ヒト初代培養肝細胞は、適切な条件で培養することにより *in vivo* に似た誘導プロファイル（強度および選択性）を示すことから、ヒト肝における P450 発現における PXR の役割を評価するために、適している。ヒト初代培養肝細胞および PXR リガンドを用いた誘導試験により、CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 および CYP3A5 遺伝子の転写活性化に PXR が関与することが示唆されているものの、リガンドの PXR 以外の核内レセプターへの作用や転写補助因子への作用も考えられ、PXR の関与を直接的に示すものではない。

そこで、本研究では、より生理的な条件でヒト肝における P450 遺伝子の転写活性化に及ぼす PXR の寄与を明らかにすることを目的として、ヒト PXR のみの発現を選択的に阻害する siRNA を生じるアデノウイルス (Ad hPXR-siRNA) を作製し、ヒト PXR を特異的にノックダウンすることにより、ヒト由来肝細胞における個々の P450 分子種に及ぼす PXR の寄与について検討した。

PXR の発現レベルの減少に伴い、調べた 9 つの P450 遺伝子のうち、7 つの発現レベルが変化した。PXR のターゲット遺伝子としてよく知られている CYP3A4 mRNA 発現レベルは Ad hPXR-siRNA の濃度依存的に減少し、4 MOI でコントロールの 18% まで低下した。更に、PXR の ligand 存在時の P450 遺伝子転写活性化に及ぼす PXR ノックダウンの影響も検討したが、CYP2B6 遺伝子以外では、ligand の有無による、PXR ノックダウンの大きな違いは確認されなかった。Ad hPXR-siRNA はリガンド非存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化をわずかにしか抑制しなかったが、ligand 存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化を大きく抑制した。PXR は ligand 存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化には不可欠であるものの、リガンド非存在時の CYP2B6 遺伝子の転写活性化には必須ではない可能性が示された。

これまでに報告されている P450 遺伝子上流に存在する PXR 結合領域の数は、CYP3A4 および CYP2A6 では 3 つ、CYP2C8, CYP2B6 および CYP2C9 には 2 つ、CYP2C19, CYP3A5 では 1 つあるのに対し、CYP1A2 および CYP2D6 では現在まで報告されていない。P450 分子種間における PXR の影響の受け方が異なる原因は明確ではなく、更なる研究が必要であるものの、これらの遺伝子のシスエレメントにおける複数の PXR 結合領域が相加・相乗的に遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

本研究内容は PXR を中心とする核内受容体の P450 発現における役割を明確にしたものであり、博士論文に値すると判断した。