◇◇ミニレビュー◇◇ (平成 11 年度 日本薬物動態学会年会シンポジウムより)

薬物による CYP3A 誘導の分子機序とその種差

荻野 淳, 永田 清, 山添 康

Molecular Mechanisms of CYP3A Gene Transactivations by Chemicals and their Species Differences

Makoto OGINO, Kiyoshi NAGATA and Yasushi YAMAZOE

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Miyagi

Summary: P450s belonging to the CYP3A subfamily constitute major forms in livers and intestines of human and experimental animals. Expressions of CYP3A forms are induced by treatment with many chemicals, but their profiles differ among humans and experimental animals. Molecular mechanisms of CYP3A gene activation by chemicals had been little known until recently. A novel steroid hormone receptor, PXR (pregnane X receptor), has been isolated from mouse, rat, rabbit and human as a signal transduction molecule in CYP3A gene transactivation. Species differences observed on the induction profiles might be explained by the species specific response of their PXR to chemicals. However, the diverse induction profiles of CYP3A forms are possible to be caused by interaction of PXR with transcription factors other than RXR α . In support with this idea, we have found that rat CYP3A1 gene is transactivated by an orphan nuclear receptor, ARP-1 with PXR in the presence of inducers. To assess the induction potency of various chemicals for human CYP3A forms, further researches are necessary to clarify the transcriptional regulation of CYP3A forms.

はじめに

CYP3A サブファミリーに含まれる P450 分子種は、肝臓および消化管における主要な分子種であり、現在使用されている多数の医薬品の代謝に関与している。その活性は種々の薬物によって誘導あるいは阻害されることから、薬物が与える CYP3A 活性への影響を知ることは薬物相互作用の機序を理解するために非常に重要である。薬物のヒト CYP3A 活性への影響を評価するための系として、ヒト肝臓のスライスや初代培養細胞系がある。しかし、我が国においてそのような実験系を頻繁に利用することは現在のところ難しい。一方、実験動物を用いて薬物の影響を評価することは容易だが、CYP3A 分子種の発現調節、特に誘導現象には顕著な種差が存在し、実験動物で得られた結果をそのままヒトに外挿することは困難である。したがってヒト CYP3A 分子種の誘

導が予測可能な *in vitro* 試験系の構築が望まれる。つまり、CYP3A 分子種の誘導はその遺伝子の転写活性化によって引き起こされるため、CYP3A 遺伝子の転写制御機構が解明されれば、ヒト組織を用いなくともヒト CYP3A 分子種の誘導が予測できるのではないかと考えられる。そこで我々はヒト CYP3A 分子種の誘導機構を明らかにするためのモデルとして、ラット CYP3A1 および CYP3A2 に注目しその転写制御について解析してきた。またそれらの結果をもとに、ヒト CYP3A 分子種の発現調節機構の解析について検討し、両者の異同について明らかにしようと試みてきた。本稿では、現在までに明らかになっている CYP3A 分子種の誘導の分子機序について我々の研究結果も交えて述べてい

PXR の発見

ラット CYP3A1 および CYP3A2 はデキサメサゾン

おぎの まこと

荻野 淳：1995 年東京薬科大学薬学部卒業(臨床生化学教室、須賀哲弥教授)。現在、東北大学大学院薬学研究科博士課程後期 3 年(薬物動態学分野、山添 康教授)に在学し、永田 清助教授とともに CYP3A 遺伝子の転写制御の解析に従事している。

やそのアンタゴニストであるプレグネノロン 16 α -カルボニトリル(PCN)によって誘導されることから、グルココルチコイドレセプター(GR)を介さない別の因子(機構)によってその誘導が制御されているとされてきた。永らくその因子は不明であったが、1998年にプレグナン X レセプター(PXR)が単離され¹⁾、これがその因子の一つであると報告された。PXRは当初マウス(mPXR)¹⁾から単離され、続いてヒト(hPXR)²⁻⁴⁾、ラット(rPXR)⁵⁾およびウサギ⁶⁾からも単離された。またmPXRとhPXRの解析から、PXRの薬物への応答性には種差があることが明らかになった²⁾。このPXRの薬物応答性の種差は、CYP3A分子種の薬物による誘導性に認められる種差と一致していた。つまり、hPXRはリファンピシンに応答するがmPXRはこれに応答せず、一方、mPXRはPCNに応答するがhPXRはこれにほとんど応答しない。このようなPXRの薬物応答性の種差は、それぞれPXRのリガンドが結合すると思われる領域の推定アミノ酸配列の相同性から説明される(Fig. 1)。この領域におけるrPXRとmPXRのアミノ酸配列の相同性は97%と非常に高いのに対して、rPXRとhPXR、およびmPXRとhPXRの間では70数%を示すにすぎない。つまり、各動物種のPXRにおけるリガンド結合領域と思われる部位のアミノ酸配列の相同性の差、すなわちタンパクの立体構造の違いがもたらす薬物との親和性の差がPXRの薬物への応答性の種差をもたらしていると考えられる。それは丁度、酵素の基質特異性がその基質結合部位の立体構造によって規定されるのと似ている。

ところが、PXRによる転写制御の報告にはいくつかの矛盾を含んでいる。たとえば、hPXRのデキサメサゾンへの応答性については、まったく応答しないという報告³⁾とある程度応答するという報告²⁾がある。このような結果が生じる原因としては、1) 使用している培養細胞が異なる、2) 酵母の転写因子であるGAL4と

hPXRの融合タンパクを使用している、3) レポーター遺伝子にウイルスのチミジンキナーゼ(tk)プロモーターを連結させたりPXRの結合サイトを複数連結させた人工プロモーターを使用している等があげられる。これらはいずれも転写制御研究においていわば常套手段として用いられるため、こういった手段が選択されること自体は決して誤りではないが、その結果を解釈するときには注意が必要であろう。

このようなことから我々は、CYP3A遺伝子のプロモーターを改変せず構築したレポーター遺伝子を用いてその転写制御を検討できないかと考えた。

CYP3A1 遺伝子の薬物による転写活性化の分子機序

我々のこれまでの解析から、CYP3A1遺伝子およびCYP3A2遺伝子はともに肝臓特異的な転写因子であるHNF-4(Hepatocyte Nuclear Factor-4)により転写活性化されることが明らかとなった⁷⁾。実際、内在的にHNF-4を発現しているヒト肝癌由来細胞であるHepG2細胞にCYP3A1遺伝子のプロモーター領域を連結したレポーター遺伝子を導入すると、それだけでもある程度の転写活性化が認められる。このことは、tkプロモーターなどの外来性プロモーターに頼ることなくCYP3A1遺伝子本来のプロモーターが利用できることを意味する。自動車を例にしてたとえると、他社製のエンジン(tkプロモーター)をわざわざ積まなくとも自社製のエンジン(CYP3A1遺伝子のプロモーター)で十分走れるということになる。*In vivo*では当然他社製のエンジンで走ることはないの、こちらのほうがより“自然”なカタチである。さらに、CYP3A1遺伝子のHNF-4による転写活性化を調べていくなかで、ARP-1(Apolipoprotein A1 Regulatory Protein 1)およびEAR-3(ν -ErbA-Related Protein 3)といった転写因子がHNF-4と相互作用しているらしいことが解ってきた⁷⁾。

Fig. 1 Comparison of amino acid sequences and activation profiles between human, mouse, rat and rabbit PXR. PCN; pregnenolone 16 α -carbonitrile.

この ARP-1 および EAR-3 の結合部位は PXR の結合部位と一致していたことから、ARP-1 および EAR-3 と PXR による複合的な転写制御が予想された。そこでこの点について、CYP3A1 遺伝子のプロモーター領域を連結したレポーター遺伝子と ARP-1, hPXR および RXR α (retinoid X receptor α) を種々の組み合わせで強制発現させた HepG2 細胞を用いて検討した。その結果、hPXR の活性化薬物であるリファンピシンにもっともよく応答して転写活性化が認められたのは ARP-1 と hPXR を発現させた時であった(投稿準備中)。PXR は RXR α とヘテロダイマーを形成して DNA に結合し転写を活性化すると考えられているが、我々の検討では PXR と RXR α の組み合わせでは CYP3A1 遺伝子は薬物に応答しなかった。最近報告された rPXR を用いた場合はどうなのかについて、および ARP-1 と PXR がヘテロダイマーを形成するのか否かについては現在検討中であるが、少なくとも以上のような結果は、CYP3A1 遺伝子の薬物による転写活性化が PXR のみによって説明することはできないことを示唆している。なぜ ARP-1 と PXR の組み合わせと RXR α と PXR の組み合わせで応答性が異なるのかその原因は不明であるが、本来のプロモーターを用いた実験が人工プロモーターで得られた結果とは異なる結果をもたらしたことは興味深い。そもそも、ARP-1 はそれ自身リガンド不明のオーファンレセプターであり、様々な臓器にその発現が認められ、その機能には不明な点が多い。しかし、ARP-1 のノッ

クアウトマウスは循環器の形成不全を引き起こして胎性致死になると最近報告され⁸⁾、ARP-1 は生体内で特に循環器に対して重要な役割を担っているのではないかと考えられている。

CYP3A4 遺伝子の転写制御の分子機序

CYP3A1 遺伝子での結果をふまえて、次に我々は CYP3A4 遺伝子の転写制御について検討を行った。やはり CYP3A4 遺伝子のプロモーター領域を改変せずに構築したレポーター遺伝子を HepG2 細胞に導入してみた。ところが、CYP3A1 遺伝子の場合とは異なり、CYP3A4 遺伝子はそのままでまったく転写活性化されず、HNF-4 を共発現させてもその転写活性化は認められなかった。このことから、CYP3A1 遺伝子と CYP3A4 遺伝子ではプロモーター領域における転写活性化のメカニズムが異なることが示唆された。しかし、5' 上流域の構造自体が CYP3A1 遺伝子と CYP3A4 遺伝子では相同性が低いため(Fig. 2)、両者の転写制御が異なっても不思議ではない。もともと HepG2 細胞において CYP3A4 の発現はほとんど認められないことから、CYP3A4 遺伝子のプロモーターに構成的に働く因子が欠落しているか、あるいは強い発現抑制機構が働いているのではないかと考えられる。さらに我々が検討を進めた結果、CYP3A4 遺伝子は ARP-1 および EAR-3 によって強く転写活性化されることが示唆された。このことから、CYP3A1 遺伝子同様に ARP-1 と PXR に

Fig. 2 Alignment of sequences of CYP3A gene 5'-flanking regions. Nuclear protein binding sites of CYP3A1 gene were shown by A, B and C.

よるリファンピシンに応答した転写活性化についても検討したが、強い転写活性化は認められなかった。詳細については検討中であるが、CYP3A4 遺伝子と CYP3A1 遺伝子の薬物による誘導機構の違いは、PXR の応答性の差だけではなく、それぞれのプロモーターにおける転写制御機構の根本的な違いにもよるのではないかと考えられる。一方、CYP3A4 のフェノバルビタールによる誘導には CAR (constitutively activated receptor) とよばれるステロイドホルモンレセプターが関与していることが報告された⁹⁾。このように、PXR 以外の転写因子を作用点にして CYP3A を誘導する薬物は他にも存在するのではないかとと思われる。たとえば、ヒト CYP3A を誘導すると報告されているトログリタゾン¹⁰⁾は PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) のリガンドとなることが知られている¹¹⁾。今のところ PPAR γ による CYP3A4 の転写制御に関する報告はないがその可能性は否定できない。

ヒト大腸癌由来細胞である LS180 細胞には常在的に CYP3A4 が発現しており、リファンピシン等による誘導も認められる¹²⁾。また同じくヒト大腸癌由来細胞である Caco-2 細胞では 1 α , 25-デヒドロキシビタミン D₃ によって内在性の CYP3A4 が誘導されてくるという¹³⁾。したがってこれらの細胞はヒト消化管モデルとしてだけではなく、CYP3A4 遺伝子の転写制御を解析するためにも有用であると考えられる。その詳細な分子機序については不明であるが、このようなことからすれば、CYP3A4 の発現調節機構が肝臓と消化管では異なっている可能性が考えられる。また、HepG2 細胞とこれらヒト大腸癌由来細胞の違いに CYP3A4 を構成的に発現させる因子(機構)が含まれているのではないかと考えられ、新たな展開が期待される。

その他の CYP3A 遺伝子における 転写制御の分子機序

遺伝子構造が明らかとなっている CYP3A 遺伝子は他に CYP3A5, 3A6, 3A7, 3A10, 3A11 および 3A16 遺伝子がある。しかし残念ながらその転写制御機序に関する報告は少ない。CYP3A5 遺伝子は GR を介してデキサメサゾンによって転写活性化されると報告されている¹⁴⁾。一方、PXR が CYP3A5 遺伝子の転写制御に関与している可能性は低いということが示唆されている⁴⁾。CYP3A7 遺伝子も当初 PXR による転写制御の可能性に否定的な報告⁴⁾がされたが、CYP3A7 遺伝子の塩基配列に違いが見つかり、PXR によって薬物に反応して転写活性化されることが示唆された¹⁵⁾。もっとも、CYP3A4, 3A5 および 3A7 はいずれもヒト CYP3A 分子種であるが、それぞれが三者様の発現パターンを示すためにその転写調節機序が異なっている可能性があ

る。ハムスター CYP3A10 遺伝子の転写制御には STAT 5 (signal transducers and activators of transcription 5) と呼ばれる転写因子が関与しているという報告¹⁶⁾があるものの、薬物による誘導の機序に関する報告はない。ウサギ CYP3A6, マウス Cyp3a11 および Cyp3a16 遺伝子の薬物による誘導の機序に関する詳細な報告も今のところはない。Cyp3a11 および Cyp3a16 遺伝子のプロモーター領域は CYP3A1 や CYP3A2 遺伝子と比較的相同性が高いことから (Fig. 2), これらと類似した転写制御を受けている可能性が考えられる。

おわりに

CYP3A 分子種の発現調節の種差、特にラットとヒトにおける差は、PXR の応答性の差だけではなくプロモーター領域での転写制御機構の違いにもよると考えられる。PXR は一見 CYP3A 分子種の誘導をすべて説明したかにみえるが、*in vivo* における誘導機序はそれほど単純ではないようである。近年では、転写因子に結合するタンパク因子 (co-factor) による転写制御の解析が進んできており、もはや一つや二つの転写因子だけで遺伝子の転写制御が理解される時代ではなくなりつつある。実際、PXR は SRC-1 (steroid receptor coactivator 1) と呼ばれる co-factor と相互作用していることがすでに明らかになっている^{1,2)}。したがって *in vivo* を完全に反映した *in vitro* 評価系を完成させるには、まだまだ解明しなければならない多くの問題を抱えている、というのが現状である。しかし、部分的にあるいは予備的な評価をするための系として *in vitro* 評価系を利用することは可能となりつつある。特に最近ではレポーター遺伝子アッセイのハイスループット化が可能になってきたために、このような試験系を用いれば創薬の早い段階から大量の候補化合物のヒト CYP3A 誘導能について検討することもできるであろう。実用面での検討も含めて、この分野における研究のさらなる進展が期待され、我々も精力的に解析を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) Kliewer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A., McKee, D. D., Oliver, B. B., Willson, T. M., Zetterstrom, R. H., Perlmann, T. and Lehmann, J. M.: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, **92**: 73-82 (1998).
- 2) Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. and Kliewer, S. A.: The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**: 1016-23 (1998).
- 3) Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jen-deberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind,

- H., Blomquist, P. and Berkenstam, A.: Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12208-13 (1998).
- 4) Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., van Meter, C. M., Ong, E. S. and Evans, R. M.: SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* **12**: 3195-205 (1998).
- 5) Zhang, H., LeCulyse, E., Liu, L., Hu, M., Matoney, L., Zhu, W. and Yan, B.: Rat pregnane X receptor: Molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**: 14-22 (1999).
- 6) Savas, U., Wester, M. R., Griffin, K. J. and Johnson, E. F.: The rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin but not by pregnenolone 16 α -carbonitrile. *FASEB J.* **13**: 1013 (1999).
- 7) Ogino, M., Nagata, K., Miyata, M. and Yamazoe, Y.: Hepatocyte nuclear factor 4-mediated activation of rat CYP3A1 gene and its modes of modulation by apolipoprotein AI regulatory protein I and v-ErbA-related protein 3. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**: 32-7 (1999).
- 8) Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M. J. and Tsai, S. Y.: The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev.* **13**: 1037-49 (1999).
- 9) Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M.: The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* **274**: 6043-6 (1999).
- 10) Koup, J. R., Anderson, G. D. and Loi, C. M.: Effect of troglitazone on urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol. *J. Clin. Pharmacol.* **38**: 815-8 (1998).
- 11) Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Willson, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, S. A.: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **270**: 12953-6 (1995).
- 12) Schuetz, E. G., Beck, W. T. and Schuetz, J. D.: Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **49**: 311-8 (1996).
- 13) Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Paine, M. F., Lown, K. S. and Watkins, P. B.: Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Pharmacol.* **51**: 741-54 (1997).
- 14) Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Thottassery, J. V., Guzelian, P. S., Strom, S. and Sun, D.: Identification of a novel dexamethasone responsive enhancer in the human CYP3A5 gene and its activation in human and rat liver cells. *Mol. Pharmacol.* **49**: 63-72 (1996).
- 15) Pascucci, J. M., Jounaidi, Y., Drocourt, L., Domergue, J., Balabaud, C., Maurel, P. and Vilarem, M. J.: Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**: 377-81 (1999).
- 16) Subramanian, A., Teixeira, J., Wang, J. and Gil, G. A.: STAT factor mediates the sexually dimorphic regulation of hepatic cytochrome P450 3A10/lithocholic acid 6 β -hydroxylase gene expression by growth hormone. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4672-82 (1995).