S1-10

デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 D H E A S によるペルオキシゾーム酵素の誘導

東京薬科大学薬学部臨床生化学教室
○山田純司、佐久間充弘、杉山浩通、須賀哲弥

INDUCTION OF PEROXISOMAL β -OXIDATION ENZYMES BY DEHYDROEPIANDROSTERONE SULFATE

Junji Yamada, Mitsuhiro Sakuma, Hiroyuki Sugiyama and Tetsuya Suga
Department of Clinical Biochemistry, Tokyo College of Pharmacy

【目的】デヒドロエピアンドロステロン (D H E A) は哺乳動物の副腎皮質から分泌される C19ステロイドである。その生理作用は十分に解明されていないが、ラットやマウスに投与すると様々な薬理効果を引き起こす。これまでに我々は D H E A がペルオキシゾーム増殖薬としての作用を持つことを明らかにしてきた。すなわち、D H E A をラットに投与すると肝肥大、肝ペルオキシゾームの増殖、ペルオキシゾーム β 酸化系酵素および脂肪酸代謝関連酵素の誘導などペルオキシゾーム増殖薬に特徴的な現象が現れる¹⁻³⁾。さらに1年から1年半に及ぶ長期間投与の後にはほぼ全例で肝癌の発生が認められる⁴⁾。ペルオキシゾーム増殖薬の化学構造は多様であり構造上の共通点を見出すことは困難であるが、分子内に疎水性部分と陰イオン性の親水基を合わせ持つことが1つの特徴である (Fig.1)。これに対して D H E A は、疎水性ではあるがアニオンとしての性質を欠く。投与後に細胞内で加水分解や酸化を受けてこのような性質 (Hydrophobic anion) を獲得するものも知られているが、D H E A の場合には当てはまらない。そこで我々は作業仮説として、D H E A は細胞内で硫酸抱合を受け D H E A S となることによりペルオキシゾーム増殖薬としての性質を獲得すると考えた。本研究では、この仮説についてラット初代培養肝細胞を用いて検討した。

Fig. 1. Chemical structures of peroxisome proliferators

【実験方法】Wistar系雄性ラット (約200 g) を用いた。コラゲナーゼ灌流法により遊離肝細胞を調製し、コラーゲンコートしたディッシュ上で5%ウシ胎児血清を含む Leibovitz medium L-15を用いて培養した。プレーティング24時間後から薬物処理を開始し、24時間毎に培養液を交換した。薬物はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、DMSOの終濃度が0.4%になるように培養液に添加した。アセトアミノフェンや塩硫酸塩の影響を調べた実験では、硫酸塩を除いたL-15培養液を用いDMSOの代わりにジメチルホルムアミド (終濃度0.2%) を用いた。薬物処理終了

後、細胞をディッシュからかきとりホモジネートを調製し、ペルオキシゾーム β 酸化活性およびカルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性を測定した。またWestern blottingにより酵素タンパク量の変化を調べた。

【結果・考察】

1. DHEAおよびDHEASによる酵素誘導⁵⁾

初代培養肝細胞をDHEAあるいはDHEASで5日間まで処理すると経時的かつ用量依存的にペルオキシゾーム β 酸化活性が上昇した (Fig. 2)。いずれの場合でも β 酸化活性の上昇と相関してカルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性の上昇が認められた。このとき両酵素活性の上昇は酵素タンパク量の増加とよく一致した。Western blottingの結果、脂肪酸 ω 水酸化酵素 (P4504A) の増加も確認されたが、カタラーゼの増加は認められなかった。この様なペルオキシゾーム β 酸化系酵素と他の脂肪酸代謝関連酵素の選択的な誘導 (coordinated and preferential induction) は、DHEA処置ラット肝における *in vivo* の酵素誘導とよく一致する。したがってDHEAによる酵素誘導は培養肝細胞系で再現できることが示された。このことからDHEA (S) は肝細胞に直接的に作用してペルオキシゾーム酵素の誘導を引き起こすことが明らかになった。Fig. 2から明らかなようにDHEASはペルオキシゾーム酵素のよい誘導薬であり、その作用はDHEAのそれと良く相関し、しかもより著しい。このことは硫酸抱合体DHEASが活性代謝産物であるとする我々の仮説と矛盾しない。

Fig. 2. Induction of peroxisomal β -oxidation in cultured rat hepatocytes treated with DHEA and DHEAS. (A) time course: 50 μ M DHEA/DHEAS; (B) dose response: 5-day treatment.

2. ペルオキシゾーム酵素誘導におけるDHEAの構造-活性相関⁶⁾

DHEAと類似の構造を持つ種々のステロイドを用いてペルオキシゾーム β 酸化系酵素に対する誘導活性を調べた (Fig. 3)。DHEAの3位および17位置換体、5位還元体、C18芳香化ステロイドについて検討した。調べたステロイドのうちDHEAおよびDHEAS以外にデヒドロアンドロステロン硫酸、アンドロステジオール3-硫酸、エピアンドロステロン硫酸、アンドロステロン硫酸に誘導活性が認められた。これら硫酸化ステロイドは対応するそれぞれの遊離型よりも3-5倍高い活性を有していた。酵素誘導の用量依存性を調べた結果、DHEASが最も強い誘導薬であった。その構造上の特徴を次のようにまとめることができる。すなわち、3位の硫酸基は高い誘導活性には不可欠である。しかしその立体配置 (β 配置) は必ずしも重要ではない。硫酸基をカルボキシル基で代用することはできない。17位のカルボニル基もまた重要であり、コレステロール側鎖のようなかさ高い置換基の導入は誘導活性の消失につながる。17位の更なる硫酸化もまた誘導活性を著しく減弱させる。5位の二重結合は必ずしも重要ではないが、還元される際には5位が α 配置で水素化 (A/B環トラ

ンス) されなければならない。ステロイド骨格が延びた構造をとり、比較的平面的な立体構造をつくるのが重要と考えられる。A環の芳香化は酵素誘導活性を消失させる。このようにDHEAによるペルオキシゾーム酵素の誘導には厳密な構造上の必要条件が認められ、細胞内に特異的な認識部位の存在することが示唆される。16 α -ヒドロキシDHEA、アンドロステンジオン、DHEAグルクロニドなどのDHEA代謝産物にも酵素誘導活性が認められたが、その強さはDHEASの1/4以下であった。したがってDHEASはペルオキシゾーム酵素誘導におけるDHEA活性代謝産物として最も有力な候補と言える。

(A) 3-Substituted analogues

3-Substituents - R1	Enzyme activity (-fold increase over the control)			
	1	5	10	15
-OH (β)	DHEA			
-OSO ₃ H (β)	DHEAS			
-H				
-Cl (β)				
-OH (α)				
-OSO ₃ H (α)				
-COOH (β)				

(B) 17-Substituted analogues

17-Substituents - R2 (β)	Enzyme activity (-fold increase over the control)			
	1	5	10	15
-H				
-OH				
-OSO ₃ H				
-COCH ₃				
-C ₈ H ₁₇				

(C) 5-Hydrogenated analogues

Configuration		Enzyme activity (-fold increase over the control)			
		1	5	10	15
3-OSO ₃ H	5-H				
β	α				
α	α				
β	β				
α	β				

Fig. 3. Induction of peroxisomal β -oxidation in cultured rat hepatocytes treated with structural analogues of DHEA: structure-activity relationships (5-day treatment with 50 μ M analogues).

3. DHEAによるペルオキシゾーム酵素誘導に及ぼすアセトアミノフェンおよび塩素酸塩の影響

硫酸抱合反応を抑制した条件下でDHEAによるペルオキシゾーム β 酸化系酵素の誘導を調べた (Fig. 4)。培養液から硫酸塩を除くと酵素誘導の程度はやや低下し、硫酸塩存在下での誘導の約70%になった。そこでさらにアセトアミノフェンを培養液に添加して細胞内の活性硫酸PAPSを消費させ、DHEAに対する硫酸抱合反応を競合的に阻害した。その結果、 β 酸化系酵素の誘導はほぼ完全に抑制された (Fig. 4A)。このとき対照に用いたDHEASおよびCPIBによる酵素誘導には有意な変化は認められなかった。次に硫酸塩非存在下で塩素酸塩を添加し、ATPスルフィラーゼ反応を阻害してPAPSの合成を抑制した。その結果、

Fig. 4. Effects of acetaminophen (A) and chlorate (B) on DHEA induction of peroxisomal β -oxidation in cultured rat hepatocytes (5-day treatment with 50 μ M DHEA).

■ normal; □ - SO₄²⁻; ▨ - SO₄²⁻ + 1 mM acetaminophen.

酵素誘導には有意な変化は認められなかった。次に硫酸塩非存在下で塩素酸塩を添加し、ATPスルフィラーゼ反応を阻害してPAPSの合成を抑制した。その結果、

DHEA 未処理細胞で β 酸化活性の上昇が認められたが、DHEA による酵素誘導は抑制された (Fig. 4B)。この場合でもやはり DHEAS や CP1B による酵素誘導は何ら影響されなかった。これらの結果は DHEA によるペルオキシゾーム酵素の誘導に硫酸抱合反応が重要な役割を果たすことを示している。

以上の知見は、DHEA は投与後細胞内で硫酸抱合を受けて DHEAS になることによりペルオキシゾーム増殖薬としての性質を獲得するという考え方を強く支持している。すでに我々は *in vitro* 実験から肝可溶性画分中に DHEAS に対する特異的な結合活性を検出している⁷⁾。今後、この結合活性のペルオキシゾーム酵素誘導機構への関与を注意深く検討してゆくことが、我々の作業仮説に更なる傍証を与えるものと考えられる。本研究の成果は新たにペルオキシゾーム増殖薬の作用機構として『第2相薬物代謝酵素による代謝的活性化』という概念を導入するものである。

ABSTRACT: Induction of peroxisomal β -oxidation enzymes by dehydroepiandrosterone (DHEA) was studied in primary cultures of rat hepatocytes. Treatment of cultured hepatocytes with DHEA and its sulfate (DHEAS) for up to 5 days resulted in a progress increase in peroxisomal β -oxidation and carnitine acetyltransferase activity, the magnitude of which was dose-related. Western blot analyses confirmed the induction of acyl-CoA oxidase, enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme and carnitine acetyltransferase in the treated cells. Induction of fatty acid ω -hydroxylase proteins (P4504As) was also revealed. DHEAS was a good inducer of these enzymes, and its effects correlated well with those of DHEA; moreover, DHEAS was more potent than DHEA. Studies with structural analogues of DHEA revealed strict structural requirements for DHEA induction of peroxisomal β -oxidation. Of the steroids examined, dehydroandrosterone sulfate, androstenediol 3-sulfate, epiandrosterone sulfate and androsterone sulfate, besides DHEA and DHEAS, significantly induced the enzyme. All of the sulfated steroids were more potent than the corresponding unsulfated forms. DHEAS was the most potent inducer. The 3-sulfuric group was required for the marked induction of peroxisomal β -oxidation, and the 17-carbonyl group was also important. The presence of a double bond at position C5 was not a primary determinant for the action of DHEAS, but the relatively planar conformation of the steroidal hydrophobic backbone was crucial for inducing the enzyme. Certain metabolites, such as 16 α -hydroxyDHEA, androstenedione and DHEA glucuronide, also caused enzyme induction, however the magnitude of which was lower than that seen with DHEA and DHEAS. When hepatocytes were co-treated with acetaminophen, a potent sulfate scavenger, or chlorate, an inhibitor of PAPS formation, the DHEA induction of peroxisomal β -oxidation was suppressed, whereas induction by DHEAS and clofibrate was not affected. These findings support the idea that DHEA, after administration, undergoes sulfate-conjugation in the cell to gain peroxisome proliferator activity.

REFERENCES: 1) J. Yamada *et al.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 233-243. 2) J. Yamada *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 199, 132-136. 3) M. Sakuma *et al.* (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43, 1269-1273. 4) H. Tamura *et al.* (1992) *J. Toxicol. Sci.* 17, 315. 5) J. Yamada *et al.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1137, 231-236. 6) M. Sakuma *et al.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, in press. 7) J. Yamada *et al.*, submitted.