

## ヒト *CYP1A1* 遺伝子の新規な発現制御機構に関する研究

### 学位論文内容の要旨

チトクローム P450 (CYP) 1A1 は多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の解毒および代謝的活性化に関与する CYP 分子種である。PAHs はタバコの煙中、ディーゼル排気、食物中などに普遍的に存在するがん原物質であるため、これらの毒性に対する CYP1A1 の役割は重要である。実際、CYP1A1 の誘導能の個人差は発がんリスクの個人差に影響を与えることが示唆されている。CYP1A1 は誘導型の酵素であり、PAHs やダイオキシン類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介した誘導機構が知られている。しかしながら、AhR および CYP1A1 の遺伝子多型では CYP1A1 の誘導能の個人差の違いを完全に説明できないことから、他の転写制御機構が CYP1A1 の発現に関与しているものと考えられた。また、我々は PAHs やダイオキシン類だけではなく多様な外来性または内因性物質に絶えず曝露されているため、他の転写因子が CYP1A1 の誘導に与える影響を検討することは非常に重要であると考えられた。そこで、本研究では AhR 以外の転写因子による CYP1A1 の転写制御機構を解明することを目的とした。

#### (1) Pregnane X receptor (PXR) および constitutive androstane receptor (CAR) により活性化される新規エンハンサーの同定

CYP1A1 はリファンピシン (RIF) およびフェノバルビタール (PB) により誘導されることが知られている。RIF および PB はそれぞれ核内受容体 PXR および CAR のアゴニストであることから PXR および CAR が CYP1A1 の発現制御に関与していることが考えられた。ヒト初代培養肝細胞において PXR および CAR のリガンドの処置により CYP1A1 mRNA が誘導されることを確認した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの結果より PXR に応答する領域は *CYP1A1* 遺伝子の 5'-上流 -614 から -430 bp に存在することを明らかにした。この領域には、核内受容体の推定結合配列 NR1 (Everted repeat 8: ER8), NR2 (ER8), NR3 (Direct repeat 4: DR4) および AhR が結合しうる xenobiotic response element が存在した。この領域は種々の異物に応答し CYP1A1 の異物代謝に重要な役割を果たすと考えられることから CYP1A1 xenobiotic-responsive enhancer module (1A1 XREM) と命名し

た。ゲルシフトアッセイおよびルシフェラーゼアッセイを行い NR1, NR2 および NR3 には PXR および CAR が結合し, PXR および CAR による CYP1A1 のプロモーター活性の誘導に関与することを見出した。さらに, ヒト肝試料を用いた検討では, PXR および CAR の発現量が CYP1A1 の発現量と有意に相関することを見出し, これら転写因子がヒトの肝臓中においても CYP1A1 の発現変動に寄与していることを示唆した。

## (2) Liver X receptor $\alpha$ (LXR $\alpha$ ) による CYP1A1 の発現制御機構

高コレステロール食は喫煙者における発がんリスクを増大することが報告されている。この原因として, コレステロールにより CYP1A1 が誘導され, PAHs などの活性代謝物が増加することが発がんリスクの増大に関与することが考えられた。コレステロールの代謝物であるオキシステロールは核内受容体 LXR $\alpha$  を活性化し標的遺伝子の発現を制御する。そこで, LXR $\alpha$  による CYP1A1 遺伝子の発現制御機構を検討した。HepG2 細胞において LXR $\alpha$  のアゴニストである TO-901317 は, CYP1A1 遺伝子の発現を濃度依存的に誘導した。LXR $\alpha$  は DR4 に結合することより, 第 1 章で見出した 1A1 XREM 内の NR3 が LXR $\alpha$  応答配列であると仮定した。ゲルシフトアッセイおよびルシフェラーゼアッセイを行い NR3 に LXR $\alpha$  が結合し CYP1A1 のプロモーター活性の誘導に関与することを明らかにした。さらに, AhR と LXR $\alpha$  のリガンドの共処置により CYP1A1 が相乗的に誘導されたことより, 高コレステロール食を摂取している喫煙者では CYP1A1 が相乗的に誘導され発がんリスクに寄与していると考えられた。

## (3) がん抑制遺伝子 p53 による CYP1A1 の発現制御機構

PAHs は AhR, PXR, CAR および LXR $\alpha$  などの活性化剤により誘導された CYP1A1 により代謝的活性化を受ける。PAHs の活性代謝物は, がん抑制遺伝子 p53 を誘導することから, p53 は PAHs による発がん機構に深く関与していることが示唆されている。しかしながら, p53 が CYP1A1 の発現に与える影響はこれまでほとんど不明であった。そこで, p53 が CYP1A1 の発現に関与するか否か検討した。野生型 p53 を発現するヒト肺がん由来 A549 細胞では p53 の活性化剤であるドキシソルビシン処置により CYP1A1 が濃度依存的に誘導されることを明らかにした。一方, p53 を欠失している H1299 細胞では p53 の強制発現により CYP1A1 の誘導が認められた。p53 の応答領域を *in silico* にて検討したところ CYP1A1 遺伝子の 3'-非翻訳領域に p53 の推定結合配列がクラスター状に存在しており この領域を p53 RE と命名した。p53 に対する siRNA を用いた検討から p53 RE は p53 依存的に働くエンハンサーであることを明らかにした。さらに, クロマチン免疫沈降法により p53 が p53 RE に結合することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 関 健  
副 査 教 授 鎌 滝 哲 也 (高崎健康福祉大学)  
副 査 教 授 有 賀 寛 芳  
副 査 助 教 授 松 本 健 一

## 学位論文題名

### ヒト *CYP1A1* 遺伝子の新規な発現制御機構に関する研究

チトクローム P450 (CYP) 1A1 は多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の代謝的活性化に関与する CYP 分子種である。PAHs はタバコの煙中, ディーゼル排気, 食物中などに普遍的に存在するがん原物質であるため, これらの毒性に対する CYP1A1 の役割は重要である。実際, CYP1A1 の誘導能の個人差は発がんリスクの個人差に影響を与えることが示唆されている。CYP1A1 は誘導型の酵素であり, PAHs やダイオキシン類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介した誘導機構が知られている。しかしながら, AhR および CYP1A1 の遺伝子多型では CYP1A1 の誘導能の個人差の違いを完全に説明できないことから他の転写制御機構が CYP1A1 の発現に関与しているものと考えられた。また, 我々は, PAHs やダイオキシン類だけではなく多様な外来性または内因性物質に絶えず曝露されているため, 他の転写因子が CYP1A1 の誘導に与える影響を検討することは非常に重要であると考えられた。そこで, 本研究では AhR 以外の転写因子による CYP1A1 の転写制御機構を解明することを目的とした。

#### (1) PXR および CAR による *CYP1A1* 遺伝子の新規発現制御領域の同定

CYP1A1 はリファンピシン (RIF) およびフェノバルビタール (PB) により誘導されることが知られている。RIF および PB はそれぞれ核内受容体 pregnane X receptor (PXR) および constitutive androstane receptor (CAR) のアゴニストであることから PXR および CAR が CYP1A1 の発現制御に関与していることが考えられた。ヒト初代培養肝細胞において RIF およびヒト CAR の特異的リガンドである 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazole-5-carbaldehyde *O*-(3,4-dichlorobenzyl)oxime は, CYP1A1 mRNA を誘導しうることを見出した。CYP1A1 遺伝子の 5'-上流領域を段階的に欠失させたレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果, PXR に応答する領域は CYP1A1 遺伝子の 5'-上流 -614 から -430 bp に存在することを明らかにした。この領域は, 核内受容体の推定結合配列 NR1 (Everted repeat: ER8), NR2 (ER8), NR3 (Direct repeat: DR4) および AhR が結合しうる xenobiotic responsive element (XRE) が存在した。この領

域は種々の異物に応答し CYP1A1 の異物代謝に重要な役割を果たすと考えられることから CYP1A1 xenobiotic-responsive enhancer module (1A1 XREM) と命名した。また, 1A1 XREM は PXR, CAR および AhR の種々のリガンドにより活性化される領域であることを確認し, 1A1 XREM 内の NR1 および NR2 に PXR または CAR が結合することを明らかにした。さらに, ヒトの肝試料を用いた相関解析より, ヒトの肝臓においても PXR および CAR は CYP1A1 の発現に関与していることが示唆された。

## (2) LXR $\alpha$ による CYP1A1 遺伝子の発現制御機構

高コレステロール食は喫煙者における発がんリスクを増大することが疫学調査で報告されている。この原因として, コレステロールにより CYP1A1 が誘導され, PAHs などの活性代謝物が増加することが発がんリスクの増大に関与することが考えられた。コレステロールの代謝物であるオキシステロールは核内受容体 liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) を活性化し retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) とヘテロ二量体を形成し標的遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで, LXR $\alpha$  による CYP1A1 遺伝子の発現制御機構を検討した。HepG2 細胞において LXR $\alpha$  のアゴニストである TO-901317 は, CYP1A1 遺伝子の発現を濃度依存的に誘導することを明らかにした。次に, LXR $\alpha$  は 第 I 章で見出した NR3 に結合することを証明した。さらに, AhR と LXR $\alpha$  の共処置は CYP1A1 を相乗的に誘導することから 高コレステロール食を摂取している喫煙者では CYP1A1 が相乗的に誘導されるために発がんリスクが高くなるものと考えられた。

## (3) がん抑制遺伝子 p53 による CYP1A1 遺伝子の発現制御機構

がん抑制遺伝子 p53 は PAHs による発がん発症機構に深く関与していることが示唆されている。また, p53 および CYP1A1 の変異を共に有する患者では発がんリスクが増大することが知られている。しかしながらこの二つの遺伝子は PAHs の毒性に深く関与するのにも関わらず, p53 が CYP1A1 の発現に与える影響はこれまでほとんど不明であった。そこで, p53 が CYP1A1 の発現に関与するか否か検討した。野生型 p53 を発現するヒト肺がん由来 A549 細胞ではドキソルビシン (Dox) 処置により CYP1A1 が濃度依存的に誘導されることを明らかにした。一方, p53 を欠失している H1299 細胞では p53 の強制発現により CYP1A1 の誘導が認められた。p53 の応答領域を同定するため, 転写因子結合領域検索ソフト TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) を用いて検討したところ CYP1A1 遺伝子の 3'-非翻訳領域に p53 の推定結合配列がクラスター状に存在していた。この領域を p53 RE とし, p53 RE を CYP1A1 遺伝子のプロモーター領域に連結させたレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果から, p53 RE が p53 による CYP1A1 のプロモーター活性の誘導に重要な働きをしていることが明らかになった。さらに, p53 RE には 内因性の p53 が結合することをクロマチン免疫沈降法にて確認した。

以上, ヒト CYP1A1 の発現に関与する 3 つの新規制御機構を明らかにした。これらの知見は PAHs の毒性発現機構の解明および PAHs による毒性を予防する上で重要な情報

である。また、CYP1A1 はグラニセトロンなどの薬物代謝にも関与しており、これら薬物の相互作用を予測する上で臨床学的にも重要な知見となるであろう。以上の点で本論文『ヒト CYP1A1 遺伝子の新規な発現制御機構に関する研究』に含まれる研究成果は優れており、博士 (薬学) の学位を受けるに十分値するものと認めた。