

199900745A・B

厚生科学研究費研究報告書

**酵素誘導による医薬品相互作用の
発現予測試験法の開発研究**

1998年～1999年

横井 毅

(金沢大学薬学部)

199900745A

様式A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 12年4月10日

厚生大臣 宮下 創平 殿

住 所

ヨコイ ツヨシ

申請者 氏 名

横井 毅

(金沢大学薬学部)

平成 12 年度厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 酵素誘導による医薬品相互作用の発現予測試験法の開発研究
(H10-医薬-018)

国庫補助金精算所要額 : 金 3,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

本研究費に直接係わる研究成果は以下の2論文でありいずれも現在国際学術雑誌に投稿中である。

◎Chie Emoto, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Yamazaki, Noriaki Shimada, Miki Nakajima and
Tsuyoshi Yokoi; Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug
oxidations in mouse intestinal microsomes.

◎Chie Emoto, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Yamazaki, Noriaki Shimada, Miki Nakajima and
Tsuyoshi Yokoi; Use of everted sacs of mouse small intestine as enzyme sources for
the study of drug oxidation activities *in vitro*.

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

該当なし。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

酵素誘導による医薬品相互作用の発現予測試験法の開発研究
研究者 横井 毅 金沢大学薬学部教授

医薬品の代謝過程に起因する副作用発現の主原因である薬物代謝酵素チトクローム P4503A の活性には大きな個体差がある。個体差の原因は P4503A の発現が薬物等により誘導されることにある。P4503A の誘導により影響を受ける遺伝子を包括的に捉えることにより誘導機構を明らかにする事を目的とした。P4503A 誘導のモデル動物としてマウスを用いて検討した結果、肝と小腸にの CYP3A 酵素誘導時に変動する主な因子として Stat 1 を見出した。

山崎浩史（金沢大学薬学部助教授）

中嶋美紀（金沢大学薬学部助手）

A. 研究目的

医薬品の代謝と薬効および副作用を理解する目的で、P450 を介する薬物相互作用についての研究が急速に進展してきた。さらに CYP3A は、臨床で使用されている 50% 以上の医薬品を代謝することから同一 CYP3A での代謝の競合による阻害が問題となる。医薬品による CYP3A の阻害のメカニズムは、このほか CYP3A と代謝中間体との複合体形成、CYP3A のヘムへの配位など、ある程度そのメカニズムは解明されている。

CYP3A はヒト肝臓における全 P450 含量の約 30%を占める発現量という報告がなされており、CYP3A 誘導剤により CYP3A が 70%になる個体があることも報告されている。ヒト小腸においても主な CYP 分子種は CYP3A であると報告されている。ヒト

CYP3A ファミリーには CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 が存在する。ヒト CYP3A4 および CYP3A5 は成人に発現しており、CYP3A7 は胎児にのみ発現している。CYP3A5 は、約 1/4 のヒトに発現し、CYP3A4 より量的に少なく触媒活性も低い。CYP3A5 は肝臓だけでなく、小腸においても検出されている。一方、マウスの CYP3A ファミリーに関しては、CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 の分子種が報告されている。雄性マウス肝においては、主に CYP3A11 および CYP3A13 が存在していることが報告されている。また Sakuma らは、マウス肝において CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A41 は、出生直後に雌雄共に発現し、CYP3A16、CYP3A41 は成長するにつれて雄性でのみ発現が低下し、性差が存在することを報告している。マウス肝において主要な CYP3A 分子種である CYP3A11 およびヒトでの CYP3A4 および CYP3A7 の遺伝子を比較すると、エク

ソン数が同一でその配置もよく類似している。またそれぞれのエクソンサイズは、エクソン 2 からエクソン 12 において完全に一致していると報告されている。さらに CYP3A11 と CYP3A4 および CYP3A7 は、塩基配列ではそれぞれ 77.8 %、75.9 %、アミノ酸配列ではそれぞれ 72.6 %、70.0 % の相同性を有している。

CYP3A4 は、抗結核薬であるリファンピシンやステロイドホルモンであるデキサメタゾン、抗てんかん薬であるフェノバルビタールにより誘導されることが報告されているが、その誘導機序はいまだ明確に解明されていない。近年、誘導機序の一端として核内リセプターの存在が確認され、リセプター応答性の種差が CYP3A 誘導能の種

B. 研究方法

プローブ薬としてヒトにおいて多くの薬物相互作用が報告されている P4503A 誘導薬であるリファンピシンをマウスに投与することにより CYP3A の誘導以外に肝および小腸においてどのようなタンパク質および発現調節因子の発現が誘導や抑制されているかを解明するために、ディファレンシャルディスプレイ法を行った。リファンピシン投与により発現が変動している cDNA

C. 研究結果

【リファンピシンによる CYP3A の誘導】

リファンピシン投与による CYP3A の誘導をノーザンブロット分析、ウエスタンブロット分析、テストステロン 6 β -水酸化酵素活性を用いて確認した。ノーザンブロット

差を引き起こしていると考えられている。しかしながら、このような核内リセプターは基本転写装置と蛋白質-蛋白質の相互作用により会合する際、転写共役因子の存在が必須であるため、CYP3A 誘導においてはさらなる検討が必要とされているのが現状である。また CYP3A は、同じ分子種であるにもかかわらず、成長時期、性、誘導剤の投与などといった因子によってその発現に著しい差がある点からも、その発現調節機構も興味深いものがある。

以上の観点から、CYP3A 誘導剤であるリファンピシンによって変動する生体内因子の探求を目的として、ディファレンシャル・ディスプレイを用い、遺伝子レベルでリファンピシンによる変動因子を解明した。

のシーケンス解析を行った後、ホモロジー解析を行い、遺伝子の同定を行った。さらに、ディファレンシャルディスプレイ法は再現性の問題点が指摘されているため、得られた cDNA をプローブとして肝および小腸の RNA を用いてノーザンブロット分析により、発現の変動を確認した。ディファレンシャルディスプレイ法に用いたプライマーを Table 1 に示した。

分析より、リファンピシン投与によりマウス肝および小腸において CYP3A mRNA 発現量がそれぞれ 3.2 倍および 1.2 倍の誘導されていることが確認された(Fig.1)。またウ

エスタンプロット分析において、ヤギ抗ラット CYP3A2 抗体と交差反応する蛋白質は、肝および小腸ミクロソームいずれの場合にも 58.8 kDa および 56.0 kDa の蛋白質を確認した(Fig.2)。対照群マウス肝ミクロソームにおいて、58.8 kDa の蛋白質は 56.0 kDa の蛋白質の 3.2 倍発現しており、リファンピシン投与によりそれぞれ 1.7 倍および 1.9 倍誘導された。一方、マウス小腸ミクロソーム

において、58.8 kDa の蛋白質は 56.0 kDa の蛋白質の 1.7 倍発現しており、リファンピシン投与により 58.8 kDa の蛋白質は 1.4 倍誘導されていたが、56.0 kDa の量的な変化は認められなかった。さらに、テストステロン 6 β -水酸化酵素活性は、マウス肝および小腸ミクロソームにおいてリファンピシン投与によりそれぞれ 2.2 倍および 2.0 倍の増加が確認された(Table.2)。

Table 1. Arbitrary 10-mers used for the differential display.

No.	sequence (5' to 3')	No.	sequence (5' to 3')
1	TACAACGAGG	14	GTACAAGTCC
2	TGGATTGGTC	15	GTACCAGTAC
3	CTTTCTACCC	16	GATCACGTAC
4	TTTTGGCTCC	17	GATCTGACAC
5	GGAACCAATC	18	GATCTCAGAC
6	AAACTCCGTC	19	GATCATAGCC
7	TCGATACAGG	20	GATCAATCGC
8	TGGTAAAGGG	21	GATCTAACCG
9	TCGGTCATAG	22	GATCGCATTG
10	GGTACTAAGG	23	GATCTGACTG
11	TACCTAAGCG	24	GATCATGGTC
12	CTGCTTGATG	25	GATCATAGCG
13	GTTTTCGCAG		

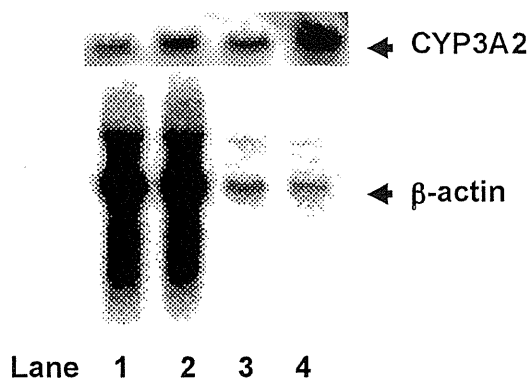


Fig.1. Effects of treatment of rifampicin on the expression of Cyp3a mRNA in mice.

Total RNA was isolated from intestine of untreated (lane 1), rifampicin-treated mice (lane 2), liver of untreated (lane 3), and rifampicin-treated mice (lane 4). Total RNA (10 μ g) samples were analyzed by Northern blot analysis with the 32 P-labeled CYP3A2 cDNA (upper) or rat β -actin cDNA (lower) probes.

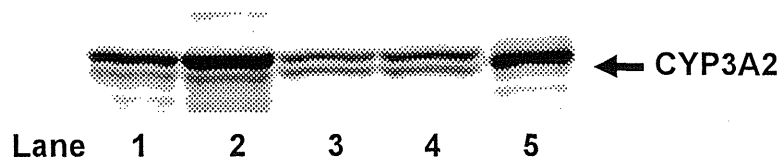


Fig. 2. Effects of treatment of rifampicin on the expression of Cyp3a protein in mice.

Microsomes (6 μ g for liver, 30 μ g for intestine) were analyzed by Western blot analysis with the anti-rat CYP3A2 antibody. lane 1, liver of untreated mice; lane 2, liver of rifampicin treated mice; lane 3, intestine of untreated mice; lane 4, intestine of rifampicin treated mice; lane 5, rat liver microsomes (corresponding to 0.45 pmol CYP3A2).

Table 2. Effects of rifampicin treatment on the testosterone 6 β -hydroxylase activities in mice.

Tissue	Testosterone 6 β -hydroxylation	
	Control	Rifampicin
	<i>nmol/min/mg protein</i>	
Liver	12.6	27.1
Intestine	0.17	0.34

Data were expressed as the mean of triplicate determinations.

【リファンピシン投与により変動する生体内因子の解明】

ディファレンシャルディスプレイ法において、電気泳動を行ったゲルの代表例を Fig. IV-3 に示す。リファンピシン投与により up-regulation または down-regulation されたクローンは、それぞれ 39 個および 13 個存在した。コロニー PCR により、インサートの長さが切り出した時と同一であるか確認した後、これらクローンのシークエンスを解析し、BLAST search によりホモロジー検索した。Up-regulation されたクローン 39 個のうち、34 個は nr データベースにおいて相同性のあるものが検索できたが、残り 5 個については検索できなかったためマウス EST データベースを用いてホモロジー検索を行った。nr データベースおよびマウス EST データベースを用いたホモロジー検索の結果をそれぞれ Table 3 および Table 4 に示した。Down-regulation されたクローン 13 個のうち、10 個は nr データベースにおいて検索できたが、残り 3 個は同様にマウス EST データベースを用いてホモロジー検索

を行った。結果をそれぞれ Table IV-5 および Table 6 に示す。次に、ディファレンシャルディスプレイ法は再現性に問題点がある点で指摘されているため、得られた cDNA クローン 52 個をプローブとして肝および小腸の RNA を用いたノーザンブロット分析により、リファンピシンによる発現の変動を確認した。52 個のクローンのうち、mRNA 発現の変化が認められたものを Table 7 に示した。#11/C-2 および #13/A-1 は、ディファレンシャルディスプレイにおいては down-regulation が確認されたがノーザンブロット分析においては up-regulation が確認された。これら 2 つのクローンはいずれも mouse Stat 1 とホモロジーが認められた。さらにこれら 2 つのクローンの塩基配列は、お互い相補的な関係であった。#5/G-1 および #21/A-4 は、ディファレンシャルディスプレイおよびノーザンブロット分析のいずれにおいても Up-regulation が確認された。#13/A-1 をプローブとして肝および小腸 total RNA においてノーザンブロット分析を行った結果を Fig. 4 に示す。

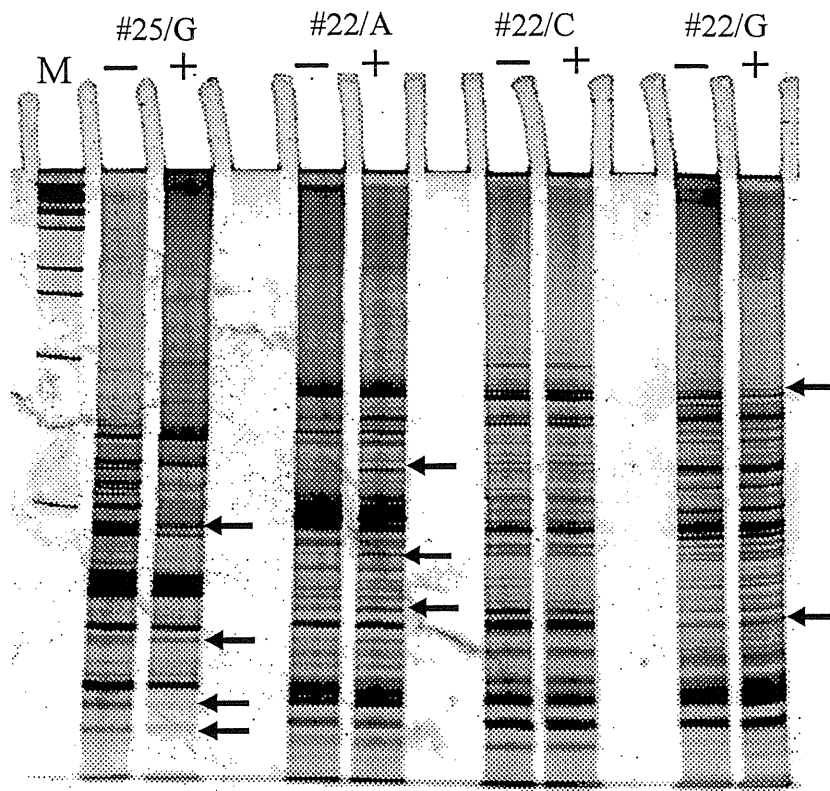


Fig.3. Expression pattern of mRNA in rifampicin-treated mice by differential display.

Total RNA from control (-) and rifampicin-treated (+) mouse livers were reverse transcribed and amplified by PCR with different primer pairs. PCR products were resolved on a 9.5 % polyacrylamide gel and stained by SYBR Green I. The numbers and characters up-side of each lane were the numbers of arbitrary primers shown in Table 1, and the last nucleotides of anchor primers, respectively. Arrows indicated the fragments that were significantly changed by rifampicin treatment. M, λ -Hind III marker.

Table 3. Identities of cDNA fragments up-regulated by rifampicin treatment in mice.

Sample			Information		
Arbitrary ¹⁾	Anquor ²⁾	No.	Identity ³⁾	Name	Length (bp)
1	C	3	19/19	GLUT4 vesicle protein mRNA	2508
2	A	4	125/145	mbac6	119865
2	A	4'	21/21	(129SV) DNA, unmapped BAC 10817	157684
2	G	3	103/103	translation repressor NAT1 mRNA	3789
3	A	5	78/80	mitochondrial genome	16295
3	A	6	79/79	cytochrome P3-450 mRNA	1893
			79/79	mRNA encoding cytochrome P3-450 protein	1894
			79/79	cytochrome P-3-450 gene	8865
			79/79	gene for cytochrome P3-450	6715
			79/79	mRNA for cytochrome P2-450	1847
3	C	2	275/275	mitochondrial genome	16295
5	G	1	183/191	mitochondrial genome	16295
6	A	4	75/75	mRNA for monoglyceride lipase	912
6	A	5	240/258	methylmalonyl CoA mutase mRNA	3246
7	A	6	25/26	RNase L inhibitor mRNA	3509
			22/22	tumor necrosis factor I receptor (TNFR-1) mRNA	3796
8	A	1	279/283	L28 mRNA for ribosomal protein L28	555
10	G	1	65/69	chromosome 16 BAC clone	128147
11	C	3	31/33	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	2277
12	A	3	232/253	mRNA for methylmalonyl CoA mutase	3246
12	A	7	28/31	A-myb protein (A-myb) gene	5889
13	A	3	30/31	LCR/Swiss glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene	11462
15	G	1	120/122	mitochondrion genome	16303
			120/122	mitochondrial genome	16295
16	A	5	42/47	DNA-binding protein mRNA	2768
16	C	7	126/135	genomic sequence encoding Tsx gene	94459
16	C	9	134/147	mitochondrial genome	16295
			134/147	mitochondrion genome	16303
			134/147	mitochondrion genome	16303
17	A	1	18/18	MHC sex-limited protein (Slp) mRNA	5362
			18/18	Cyp21 and Slp genes for steroid 21-hydroxylase and sex-limited protein	17251
			18/18	mRNA for C4 complement protein C4 (w7) alpha- and gamma chain	3555
			18/18	major histocompatibility locus class III region: complement C4 (C4) and	149886
			18/18	complement component C4 mRNA	5372
			18/18	MHC class III H2-C4 complement component gene	180
			18/18	sex-limited protein (SlpA9) gene, exons 24-41, and cytochrome P-450	12544
			18/18	nonfunctional sex-limited protein, and cytochrome P-450 (Cyp21) gene	26307
			18/18	mRNA for sex-limited protein Slp (w7) alpha-gamma chain	1893
			18/18	fourth complement component (C4) gene	5858
18/18	MHC (H-2) S region complement component C4 gene	17522			
20	A	2	139/168	Wm protein (wrn)ene	97348
21	A	3	27/29	Delta-like 3 (DII3) gene, alternative splice products, exons 1 through 17	20000
			27/29	chromosome 7, clone 19K5	159515
21	A	4	65/72	DNA for virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1	5447
			65/72	virus-like (VL30) retro-element	4834
			65/72	TCR beta locus from bases 250554 to 501917 (section 2of3) of complete	251364
			65/72	R.norvegicus hybrid sequence for RVL-3 VL30 element	1362
22	A	5	31/35	mRNA for serine/threonine protein kinase	3163
22	A	6	284/292	mitochondrion genome	16303
			284/292	mitochondrial genome	16295
22	G	3	115/119	cytochrome c pseudogene MC4.	1349
22	G	5	126/146	mbac6	119865
23	A	1	448/455	glutathione transferase GT41a mRNA	849
23	A	8	18/18	amyloid beta-peptide binding protein (ERAB) mRNA	1029
24	A	4	18/18	fat facets homolog (Fam) mRNA	10323
24	A	7	160/160	cell adhesion molecule (CAM) uvomorulin mRNA	440
24	C	2	187/193	CYP4A10 mRNA	2077

1) Number of arbitrary primers shown in Table. .1.

2) The last nucleotides of anchor primers.

3) The number of matched nucleotides/ the number of sequenced nucleotides. The identity was determined by using nr database of BLAST search.

Table 4. Identities of cDNA fragments up-regulated by rifampicin treatment in mice.

Sample			Information		
Arbitrary ¹⁾	Anquor ²⁾	No.	Identity ³⁾	Name	Length (bp)
2	A	3	210/212	kidney Mus musculus cDNA clone 0610013C23	371
			210/212	kidney Mus musculus cDNA clone 0610016H08	474
3	G	1	115/122	lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone 764993 5'	484
			115/122	3NbMS Mus musculus cDNA clone 618232 5'	318
12	A	3'	141/143	NML Mus musculus cDNA clone 720583 5' similar to WP: B0334. 3A CE02934	446
13	G	5	18/18	liver mlia Mus musculus cDNA clone 1450253 5'	404
			18/18	kidney mkia Mus musculus cDNA clone 1431937 5'	513
			18/18	kidney mkia Mus musculus cDNA clone 1432155 5' similar to HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR	517
18	A	1	18/18	liver mlia Mus musculus cDNA clone 1499706 3' similar to mouse MHC class I H2-related gene for secreted antigen, clone (MOUSE), mRNA sequence	640

1) Number of arbitrary primers shown in Table. 1.

2) The last nucleotides of anchor primers.

3) The number of matched nucleotides/ the number of sequenced nucleotides. The identity was determined by using mouse EST database of BLAST search.

Table 5. Identities of cDNA fragments down-regulated by rifampicin treatment in mice.

Sample			Information		
Arbitrary ¹⁾	Anquor ²⁾	No.	Identity ³⁾	Name	Length (bp)
1	A	1	135/138	S-adenoyl homocysteine hydrolase (ahcy) mRNA	2057
2	C	4	165/167	mitochondrial genome	16295
			165/167	mitochondrial 12S ribosomal RNA	956
			165/167	mitocodrion genome	16303
			165/167	mitocodrion genome	16303
2	G	10	135/147	mRNA for alpha-enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase)	1720
3	C	1	273/275	mitocondrion genome	16303
			273/275	mitocondrion genome	16303
			273/275	mitochondrial genoe	16295
5	G	4	30/34	gblAC005816LAC005816	136687
			30/34	chromosome 19, clone CIT282B21	186314
			30/34	Chromosome 16 Region Syntenic to DGCR BAC Clone b264n1	89743
6	G	2	19/19	P311 mRNA	2031
11	A	2	21/22	odorant receptor S46 gene	1120
11	G	2	50/50	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	2277
13	A	1	50/50	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	2277
25	G	9	194/194	Genomic sequence from Mouse 9	140554

1) Number of arbitrary primers shown in Table. 1.

2) The last nucleotides of anchor primers.

3) The number of matched nucleotides/ the number of sequenced nucleotides. The identity was determined by using nr database of BLAST search.

Table6. Identities of cDNA fragments down-regulated by rifampicin treatment in mice.

Sample			Information		
Arbitrary ¹⁾	Anquor ²⁾	No.	Identity ³⁾	Name	Length (bp)
5	C	7	20/21	embryonic region Mus musculus cDNA clone 538155 5' similar to Mus musculus	567
			20/21	mouse embryonic region Mus musculus cDNA clone 540242 5' similar to Mus musculus Y-box binding protein mRNA, 3' end	645
8	C	1	17/17	embryo NbME 13. 5 14. 5 Mus musculus cDNA clone similar to Mus musculus	451
			17/17	mammary gland NbMMG Mus musculus cDNA clone IMAGE : 863172	317
			17/17	mammary gland NbMMG Mus musculus cDNA clone 863172 5'	422
			17/17	r1 Life Tech mouse emmbryo 15 5 dpc 10667012 Mus musculus cDNA clone	461
12	C	1	170/170	mammary gland NMLMG Mus musculus cDNA clone IMAGE : 1400780 3'	347
			170/170	2NbMT Mus musculus cDNA clone 1265115 5'	435

1) Number of arbitrary primers shown in Table. (註)-1.

2) The last nucleotides of anchor primers.

3) The number of matched nucleotides/ the number of sequenced nucleotides. The identity was determined by using mouse EST database of BLAST search.

Table7. Summary of results for differentially regulated mRNA of mouse liver treated with rifampicin.

Sample			Identity ³⁾	Regulation ⁴⁾	
Arbitrary ¹⁾	Anquor ²⁾	No.		D.D.	Northern
5	G	1	mitochondrial genome	Up	Up
11	C	2	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	Down	Up
13	A	1	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	Down	Up
21	A	4	DNA for virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1	Up	Up
			virus-like (VL30) retro-element		
			TCR beta locus from bases 250554 to 501917 (section 2 of 3)		
			R. norvegicus hybrid sequence for RVL-3 VL30 elements		

1) Number of arbitrary primers shown in Table.

(註)-1.

2) The last nucleotides of anchor primers.

3) The number of matched nucleotides/ the number of sequenced nucleotides. The identity was determined by using mouse EST database of BLAST search.

4) Results for regulation of mRNA expression using differential display (D. D.) and northern blotting analysis (Northern). Northern blotting analysis was performed using the subcloned fragments obtained from D. D. as probes.

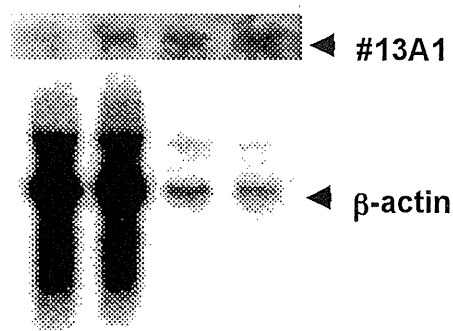


Fig. 4. Effects of treatment of rifampicin on the mRNA expression in mice.

Total RNA was isolated from intestine of untreated (lane 1), rifampicin-treated mice (lane 2), liver of untreated (lane 3), and rifampicin-treated mice (lane 4). Total RNA (10 μ g) samples were analyzed by Northern blot analysis with 32 P-labeled #13A1 cDNA (upper) or rat β -actin cDNA (lower) probes.

D. 考察

リファンピシンは、マウス、ウサギ、イヌおよびヒトの肝 CYP3A 酵素を誘導することが現在までに多く報告されているが、ラットでは、その誘導は認められていない。マウス肝においては mRNA レベルにおいて CYP3A11 および CYP3A13 はともにリファンピシンの誘導されるが、その程度は CYP3A11の方が大きいと報告されている。ヒト小腸においても、リファンピシンの投与による CYP3A 酵素の誘導が報告されている。本研究においても、肝臓および小腸において CYP3A は RNA およびタンパク質いずれのレベルにおいてもその誘導が確認された。

CYP3A の転写に関し、現在までに様々な報告がなされている。CYP3A の転写に関与しているといわれている核内リセプターである PXR は、最初に Kliewer ら(1998)によってマウスより単離された(mPXR)後、ヒト、

ラットおよびウサギにおいても発見された。一方、hPXR (human PXR)のヒトホモログである SXR (steroid and xenobiotic receptor)および PAR (pregnane activator receptor)も報告されている。いずれのリセプターもリガンド結合後、RXR (retinoid X receptor)とヘテロダイマーを形成して、CYP3A 酵素の上流領域に存在するシス領域に結合し、CYP3A の転写を活性化していることが推定されている。リガンドに対する応答性には、種差が存在している。例えば、リファンピシンに対して mPXR は応答せず、hPXR は応答して転写を活性化することが報告されている。この薬物に対するこれらリセプター応答性の種差が CYP3A 誘導能の種差を引き起こしていると考えられている。しかし CYP3A 酵素の誘導をすべてこの PXR によるものと考えると、リファンピシンの投与はマウス CYP3A を誘導するため、矛盾が生

じる。したがって CYP3A 酵素の誘導には、この PXR による転写活性化以外の機序が考えられる。さらに、このような核内リセプターは基本転写装置と蛋白質-蛋白質の相互作用により会合する際、転写共役因子の存在が必須であるため、CYP3A 誘導においてはさらなる検討が必要とされているのが現状である。

本研究においては、リファンピシン投与によってマウス生体内で変動する因子の探求をディファレンシャルディスプレイ法によって行った。その結果、その因子の 1 つとして Stat 1 が確認された。Stat 1 と相同性の高い #11C-2 および #13/A-1 は、ディファレンシャルディスプレイ法においては down-regulation が確認されたが、ノーザンプロット分析では up-regulation が確認された。一般的に指摘されているディファレンシャルディスプレイ法の再現性の問題が本研究においても示された。

Stat はサイトカインレセプターに対するシグナル伝達を担う因子として注目されてきた。サイトカインによる刺激を受けたサ

イトカインレセプターは、JAK (Janus tyrosine kinase) を活性化することで、細胞質中の Stat をリン酸化する。リン酸化された Stat は、核内に移行したのちダイマーを形成し、サイトカインによって刺激を受ける遺伝子の転写を担っていると考えられている。Stat はスーパーファミリーを形成しており、現在までに Stat 1、Stat 2、Stat 3、Stat 4、Stat 5a、Stat 5b および Stat 6 が発見されている。このうち、本研究で確認された Stat 1 は、インターフェロン γ による JAK1 を介したシグナル伝達に関与しており、そのシス領域として GAS (interferon- γ activation site) モチーフ TTC $\times\times\times$ GGA が報告されている。また、この GAS モチーフは Table IV-8 に示すようにマウスおよびヒトの CYP3A の上流領域に確認された。したがって、Stat 1 による CYP3A の転写調節の可能性が示唆されるが、タンパク質レベルにおける Stat 1 誘導の検討および CYP3A の上流領域における GAS モチーフとの結合などの詳細な検討は今後の課題である。

Table 8 Alignment of 5'-flanking regions of GAS in CYP3A genes

Isoform	Specis		Sequense		Ref.
<i>Cyp3a11</i>	mouse	-1226	TTC aga GAA	-1218	Toide et al., 1997
<i>Cyp3a16</i>	mouse	-1166	TTC tat GAA	-1158	Itoh et al., 1997
<i>CYP3A1</i>	rat	-366	TTC agt GAA	-358	Burger et al., 1992
<i>CYP3A4</i>	human	-579	TTC agg GAA	-571	Hashimoto et al., 1993

一方、P450 酵素は炎症や感染によって著しく、その量や活性が影響を受けることが知られている。インターフェロン γ は P450 酵素活性や量を低下させることが報告されている。Calleja ら(1998)はリファンピシン処置による誘導状態にてインターフェロン γ がウサギ肝細胞における CYP3A6 タンパク質を 70 %の低下させているのに対し、mRNA レベルにおいてはその影響が認められなかったと報告している。つまり、インターフェロン γ による発現抑制は転写後の調節であると考えられている。本研究においてリファンピシン投与による Stat 1

mRNA の増加が確認されているため、インターフェロン γ によるシグナル伝達とは別の機序の CYP3A 酵素発現に対する Stat 1 の関与が考えられる。雌性ラットにおいて肝特異的な CYP2C12 の発現は、成長ホルモンの分泌によって調節されているが、さらに成長ホルモン応答配列を介して Stat 5 が HNF-4 (hepatocyte nuclear factor)および HNF-6 と協調して制御することが最近明らかとなった。したがって、Stat 1 も Stat 5 同様、他の因子と協調して P450 酵素の発現調節に関与しているかどうかは興味深いところである。

E. 結論

本研究より CYP3A 酵素誘導剤であるリファンピシン投与により、マウス肝および小

腸における Stat 1 mRNA の発現増加が確認された。しかし、Stat 1 の CYP3A 転写調節への関与の解明にはさらなる検討を要する

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yukota J and Kamataki T (1999) Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 90: 899-902.

2. Chida M, Yokoi T, Nemoto N, Inaba M, Kinoshita M and Kamataki T (1999) A new variant CYP2D6 allele (CYP2D6*21) with a single base insertion in exon 5 in a Japanese population associated with a poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 9: 287-293.

3. Chida M, Yokoi T, Kosaka Y, Chiba K,

Nakamura H, Ishizaki T, Yokota J, Kinoshita M, Sato K, Inaba M, Aoki Y, Gonzalez FJ and Kamataki T (1999) Genetic polymorphism of CYP2D6 in the Japanese population. *Pharmacogenetics* 9: 601-605.

4. Kashiwama E, Yokoi T, Odomi M and Kamataki T (1999) Stereoselective S-oxidation and reduction of flosequinan in rat. *Xenobiotica* 29: 815-826.

5. Kobayashi K, Nakajima M, Oshima K, Shimada N, Yokoi T and Chiba K (1999) Involvement of CYP2E1 as a low-affinity enzyme in phenacetin O-deethylation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 27: 860-865.

6. Kobayashi K, Nakajima M, Oshima K, Shimada N, Yokoi T and Chiba K (1999) CYP2C9 is a principal low-affinity phenacetin O-deethylase: Fluvoxamine is not a specific CYP1A2 inhibitor. Response. *Drug Metab Dispos* 27: 1521-1522.

7. Mushiroda T, Yokoi T, Takahara E, Nagata O, Kato H and Kamataki T (1999) Sensitive assay of trimethylamine N-oxide in liver microsomes by headspace gas chromatography with flame thermionic detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 734: 319-323.

8. Muto S, Yokoi T, Gondo Y, Katsuki M, Shioyama Y, Fujita K and Kamataki T (1999) Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the lung of rpsL transgenic mice. *Carcinogenesis* 20: 421-424.

9. Nakajima M, Suzuki T, Sasaki T, Yokoi T, Hosoyamada A, Yamamoto T and Kuroiwa Y (1999) Effects of chronic administration of glucocorticoid on midazolam pharmacokinetics in humans. *Ther Drug Monit* 21: 507-513.

10. Nakajima M, Suzuki M, Yamaji R, Takashina H, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (1999) Isoform selective inhibition and inactivation of human cytochrome P450s by methylenedioxyphenyl compounds. *Xenobiotica* 29: 1191-1202.

11. Nakajima M, Nakamura S, Tokudome S, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (1999) Azelastine N-demethylation by cytochrome P-450 (CYP)3A4, CYP2D6, and CYP1A2 in

human liver microsomes: Evaluation of approach to predict the contribution of multiple CYPs. *Drug Metab Dispos* 27: 1381-1391.

12. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M and Kamataki T (1999) Genetic polymorphism in the 5' flanking region of human CYP1A2 gene: Effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)* 125: 803-808.

13. Nakajima M, Ohyama K, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (1999) Inhibitory effects of azelastine and its metabolites on drug oxidation catalyzed by human cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 27: 792-797.

14. Nakajima M, Kobayashi K, Oshima K, Shimada N, Tokudome S, Chiba K and Yokoi T (1999) Activation of phenacetin O-deethylase activity by α -naphthoflavone in human liver microsomes. *Xenobiotica* 29: 885-898.

15. Nunoya K, Yokoi T, Kimura K, Kainuma T, Satoh K, Kinoshita M and Kamataki T (1999) A new CYP2A6 gene deletion responsible for the in vivo polymorphic metabolism of (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 437-442.

16. Nunoya K, Yokoi T, Takahashi Y, Kimura K, Kinoshita M and Kamataki T (1999) Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype. *J Biochem (Tokyo)* 126: 402-407.

17. Nunoya KI, Yokoi T, Kimura K, Kainuma T, Satoh K, Kinoshita M and Kamataki T (1999) A new CYP2A6 gene deletion responsible for the in vivo polymorphic metabolism of (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 437-442.

18. Yamazaki H, Nakajima M, Nakamura M, Asahi S, Shimada N, Gillam EMJ, Guengerich FP, Shimada T and Yokoi T (1999) Enhancement of cytochrome P450 3A4 catalytic activities by cytochrome *b₅* in bacterial membranes. *Drug Metab Dispos* **27**: 999-1004.

19. Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP and Yokoi T (1999) Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P450 2C8 and P450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **27**: 1260-1266.

20. Nakajima M, Yamagishi S, Yamamoto H, Yamamoto T, Kuroiwa Y and Yokoi T (2000) Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin Pharmacol Ther* **67**: 57-69.

21. Yamazaki H, Suzuki M, Tane K, Shimada N, Nakajima M and Yokoi T (2000) *In vitro* inhibitory effects of troglitazone and its

metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone. *Xenobiotica* **30**: 61-70.

22. Katoh M, Nakajima M, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,4-dihydropyridine calcium antagonists: prediction of *in vivo* drug-drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* (in press).

23. Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (2000) Inhibitory effects of amiodarone and its *N*-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: Prediction of *in vivo* drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* (in press).

2. 学会発表

Yokoi, T., Kato, M., Ohyama, K., Shimada, N., Yamazaki, H., Nakajima, M. Prediction of *in vivo* drug interactions via cytochrome P450 enzymes from *in vitro* inhibition studies. International Conference on Drug Interaction. Hamamatsu, (1999).

G. 知的所有件の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙3

分担研究者は主任研究者と同一施設に所属し、研究費は主任研究者一括計上のため省略。

