

20020410

厚生労働科学研究研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

# 薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する 生体側の感受性決定因子の探索

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 雅之

平成15（2003）年3月

## 目次

### I 総括研究報告

薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する生体側の感受性決定因子の探索

Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析

山本雅之

1

### II 分担研究報告

1. 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における AhR/ Nrf2-Keap1 制御系の関与の検討

本橋ほづみ

13

2. ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスのダイオキシンに対する反応性の検討

遠山千春

22

III 研究成果の刊行に関する一覧表

30

IV 研究成果の刊行物・別刷

33

# 厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 総括研究報告書

### 薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する 生体側の感受性決定因子の探索

#### Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析

主任研究者 山本雅之（筑波大学・基礎医学系・教授）

#### 研究要旨

本研究は、薬物代謝に関わる酵素群の遺伝子発現制御機構を転写因子レベルで包括的に解明することを目的とする。その達成のために、以下のような分子生物学実験と動物個体を用いた発生工学実験、そして、ヒトの遺伝子多型の解析を行った。Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析においては、Nrf2、Keap1 それぞれに、親電子性試薬に対する Nrf2 の活性化に関与する複数の機能ドメインが存在することを、*in vitro*、*in transfecto* での実験系から明らかにした。これらのドメインは、薬剤の毒性発現を抑制するための Nrf2 活性化剤の開発の手がかりになると考えられる（以下参照）。

薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における AhR/Nrf2-Keap1 制御系の関与の検討として、Nrf2 欠損マウスの易発がん性の検討（本橋分担研究報告参照）、ヒト AhR ノックインマウスの作製と薬剤反応性の検討（本橋・遠山分担研究報告参照）、AhR::Nrf2 2 重欠損マウスの作製と薬剤反応性の検討（本橋分担研究報告参照）、さらに、ヒト *nrf2* 遺伝子 *keap1* 遺伝子の多型解析（本橋分担研究報告参照）を行った。Nrf2 欠損マウスはベンツピレンやニトロサミンなど

の化学物質に対して、著明な易発癌性を示すことが明らかになり、Nrf2 により制御される因子群は、薬物の発癌性予防にも重要であることが証明された。

一方、ヒト AhR ノックインマウスは、3-メチルコラントレンに対しては、コントロールマウスと同程度に反応したが、TCDD に対しては弱い反応しか認められなかった。この結果は、ヒト AhR ノックインマウスがヒトの反応の特異性を再現できる有用なモニター動物として利用可能であることを示唆するものである。AhR::Nrf2 2重欠損マウスは、AhR と Nrf2 とに依存しない代謝系のみを有するマウスであることが確認された。ヒト *nrf2* 遺伝子、*keap1* 遺伝子の多型解析では、ヒト *nrf2* 遺伝子では、プロモーター領域に複数の多型が、*keap1* 遺伝子ではアミノ酸翻訳領域に様々な多型が存在することが確認された。

## 分担研究者

本橋ほづみ（筑波大学・基礎医学系・講師）

遠山千春（国立環境研究所・

## A. 研究目的

近年、様々な医薬品開発が進み、生活習慣病に対する薬剤治療が成功裏に行われるようになりつつあり、また、生活習慣病以外の疾患に対しても、投薬治療が有効に行われている。しかしながら、薬剤には期待される効果と同時に、毒性・副作用が付随するのが常であり、個人によってはその発生が重大問題となる。したがって、これからの高齢化社会においては、薬剤急性毒性を未然に防止し、個人の体質に応じて適切な薬剤を適正な投薬量で処方する体制づくりが急務である。

本研究の目的は、薬物代謝に関わる酵素群の遺伝子発現制御機構を転写因子レベルで包括的に解明することである。この目的で、動物個体を用いた発生工学実験と分子生物学実験を行う。また、その制御に関与する因子群のヒ

トにおける機能と遺伝子多型を解析することを通して、個人ごとの薬剤に対する感受性を予測し、投薬量の最小化や薬剤急性毒性の発症を最小限に食い止める方策を開発することである。本研究は、厚生労働省の掲げる「個人の特徴に応じた革新的な医療の実現」の課題に、生命科学の最先端から挑むものであり、本領域の世界標準の形成を目指すものである。

本研究より、薬物代謝酵素群遺伝子の発現制御機構の包括的理解が進むとともに、薬剤の急性毒性発症を規定する因子を解明することができるものと期待される。また、ヒトにおいて、低レベル薬物代謝能と連関する制御因子の遺伝子多型を予め調べることにより、薬剤感受性の高い個人を予測することが可能となる。さらに、急性毒性発症機構を分子レベルで解明することにより、それを回避するための補助薬などを開発することが可能になる。すなわち、本研究により、個人の特徴に応じた医療の実現が可能になるものと考ええる。一方、薬物代謝制御機構の分子レベルでの正確な理解と制御因子遺伝子の改変マウスは、薬剤や食品添加物、農薬の評価基準を算出する際に、確固とした生物学的な根拠を提供するモデル系作出に繋がる。

本研究報告書では、Nrf2-Keap1 制御系の分子メカニズムの解析について本年得られた成果を報告する。他の項目は、本橋・遠山の分担研究報告書を参照されたい。

薬物の1次代謝産物は、生体内で異物代謝系第2相酵素群の発現を誘導する。我々は転写因子 Nrf2 がこれら生体防御酵素群の発現を統一的に制御することを発見し、本知見を同因子の遺伝子破壊マウスを作製・解析して実証した。また、同欠損マウスではアセトアミノフェン等の薬物に対する感受性が亢進していること、すなわち Nrf2 が薬剤毒性に対する生体防御に重要なことを発見した。さらに、Nrf2 の抑制性制御因子として Keap1 を単離し、同分子が Nrf2 機能を制御していることを生化学的・遺伝学的に証明した。Keap1 による Nrf2 の機能抑

制の解除が、生体防御酵素群の誘導の上で鍵となるステップであり、その分子メカニズムを解明する目的で、以下の実験を行った。

## B. 研究方法

Nrf2 は、非刺激時においては、細胞質において Keap1 に捉えられてプロテアソームにより分解されている。しかし、異物代謝系第 1 相反応の生成物である親電子性物質の刺激が加わると、Keap1 から解離して安定化し、核内に移行して転写を活性化する。以下の実験により、Nrf2 が Keap1 から解離し、活性化する分子機構を解析した。

**(1) Nrf2 の分子解剖** Nrf2 分子の様々な欠失変異体を作製し、培養細胞に対する一過性遺伝子導入実験の系を用いて、その転写活性化能、Nrf2 分子の細胞内局在、代謝回転速度を指標に、各ドメインの機能を評価した。

**(2) Keap1 の分子解剖** Nrf2 と同様に、Keap1 分子の様々な欠失変異体を作製し、培養細胞に対する一過性遺伝子導入実験により、その機能を Nrf2 の抑制能と親電子性試薬に対する反応性という観点から調べた。また、Keap1 の一つの特徴として、アクチンフィラメントへの結合が認められることから、Nrf2 の抑制能に対するその意義を調べるために、アクチンの脱重合剤存在下での Nrf2 抑制能を検討した。さらに、Keap1 はシステイン残基が数多く存在する蛋白質であることから、親電子性物質が直接 SH 基と反応をする可能性が考えられ、質量分析により、その標的となるシステイン残基の同定を試みた。

## C. 研究結果

**(1) Nrf2 の分子解剖** Nrf2 の転写活性化に関与するドメインとして、bZip 構造のアミノ末端側に存在する CBP との結合領域と、RNA ポリメラーゼ II の CTD に類似したアミノ酸配列を有する C 末端領域の重要性が示され

た。また、非刺激時における Nrf2 の分解に関与するドメインとして、Nrf2 分子の最もアミノ末端領域が必要であることが示された。そのカルボキシル末端側に隣接して、Keap1 との相互作用に必要な部分が存在することも明らかになった。

**(2) Keap1 の分子解剖** Keap1 は、アミノ末端側から、NTR ドメイン、BTB ドメイン、IVR ドメイン、DGR ドメイン、CTR ドメインに分けられる。Nrf2 との結合には DGR ドメインが必須であるが、その機能抑制には、BTB、IVR、DGR いずれの領域が欠失しても、不十分になるという結果であった。Nrf2 機能を抑制するためには、Keap1 分子の複数のドメインが必要であり、Keap1 分子全体のコンフォメーションが保たれていることが必要である。CTR ドメインの欠失変異分子は、Nrf2 機能を抑制するにも関わらず、親電子性試薬に対してその抑制が解除できないことから、試薬に対する反応性を担っている領域であることが予想される。また、BTB ドメイン欠失変異体は Nrf2 と結合できるにも関わらず、Nrf2 分子の分解を促進することができない。すなわち、BTB ドメインは Nrf2 分子の分解に重要な機能貢献を果たしている可能性が考えられる。アクチン重合阻害剤の添加により、細胞外にトラップされていた Nrf2 が核内へ移行したことから、Keap1 はアクチンフィラメントを足場にして Nrf2 の捕捉と分解を行っていると考えられる。また、質量分析をもちいた解析により、IVR ドメインのシステイン残基に、親電子性試薬が直接作用することが示された。つまり、Keap1 が親電子性試薬のセンサー分子として機能し得ることが明らかになった。

#### D. 考察

Nrf2 は非常に強い転写活性化能を有する転写因子である。生体は Nrf2 分子の機能を、その蛋白質量と細胞内局在というポイントで制御することにより、刺激に応じた速やかな反応を可能にしていると考えられる。興味深い点は、Nrf2 の強力な転写活性化能が発揮されるトリガーを与えるメカニズムと、その強い

転写活性化のメカニズムである。これらの課題は、Nrf2 と Keap1 の相互作用、Nrf2 の分解、Nrf2 の核移行、Nrf2 の転写活性化能の獲得、Keap1 とアクチンフィラメントとの相互作用、といった要素に分けることができ、本研究では、これらのステップにおいて機能する領域のいくつかを同定した。

親電子性試薬の Keap1 に対する直接作用の証明は、システイン残基の SH 基を介する新たなストレス応答シグナル伝達機構の存在という概念を創出するものである。

## E. 結論

In vitro、in transfecto での解析から Nrf2、Keap1 それぞれに親電子性試薬に対する Nrf2 の活性化に関与する複数の機能ドメインが存在することを明らかにした。また、親電子性試薬が Keap1 に直接作用することを証明し、Keap1 がセンサー分子として機能し得ることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. Kusunoki, H., Motohashi, H., Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M. and Tanaka, T. *Nature Str. Biol.* 9, 252-256 (2002)
- (2) A sulforaphane analogue that potentially activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, H., Fujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K. *J. Biol. Chem.* 277, 3456-3463 (2002)
- (3) Nrf2 transactivator-independent GSTP1-1 expression in 'GSTP1-1 positive' single cells inducible in female mouse liver by DEN: a preneoplastic character of possible initiated cells. Satoh, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Tanaka, M., Hayakari, M., Ookawa, K.,



- Yamazaki, T., Sato, T., Tsuchida, S. and Hatayama, I. **Carcinogenesis** **23**, 457-462 (2002)
- (4) Linkage analysis of susceptibility to hyperoxic lung injury: role of Nrf2 as a candidate gene. Cho, H.Y., Jedlika, A.E., Reddy, S.P.M., Zhang, L.Y., **Yamamoto, M.**, Kensler, T.W. and Kleeberger, S.R. **Am. J. Res. Cell Mol. Biol.** **26**, 175-182 (2002)
- (5) Regulation of the expression of Nrf2 transcription factor by cancer chemopreventive agents through antioxidant response element (ARE)-like sequences in its proximal promoter region. Kwak, M.K., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Kensler, T. **Mol. Cell. Biol.** **22**, 2883-2892 (2002)
- (6) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., **Yamamoto, M.** and Biswal, S. **Cancer Res.** **62**, 5196-5203 (2002)
- (7) Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with PML nuclear bodies. Muto, A., Tashiro, A., Tsuchiya, H., Kume, A., Kanno, M., Ito, E., **Yamamoto, M.** and Igarashi, K. **J. Biol. Chem.** **277**, 20724-20733 (2002)
- (8) Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and **Yamamoto, M.** **Genes Cells** **7**, 807-820 (2002)
- (9) Direct evidence that sulfhydryl group of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., **Yamamoto, M.** and Talalay, P. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **99**, 11908-11913 (2002)
- (10) Electrophile response element mediated regulation of the expression of the cystine/glutamate exchange transporter. Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Bannai, S. **J. Biol. Chem.** **277**, 44765-71 (2002)
- (11) Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Hayes, J.D. **Biochem J.** **365**, 405-416 (2002)
- (12) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. Sun, J., Hoshino, H., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M. M., **Yamamoto, M.** and Igarashi, K. **EMBO J** **21**, 5216-5224 (2002)

- (13) Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and **Yamamoto, M.** *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1163-1174 (2002)
- (14) Influence of *nrf2* genotype on modulation by oltipraz of benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. Ramos-Gomez, M., Dolan, P.M., Itoh, K., **Yamamoto, M.** and Kensler, T.W. *Carcinogenesis* **24**, 461-467 (2003)
- (15) Modulation of *keap1* and *nrf2* – dependent gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones: IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS. Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., **Yamamoto, M.** and Kensler, T.W. *J. Biol. Chem.* **278**, 8135-8145 (2003)
- (16) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and **Yamamoto, M.** *Genes Cells* **8**, 379-391 (2003)
- (17) Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and **Yamamoto, M.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 105-111 (2003)
- (18) EPR imaging and analysis of reducing activity in oxidative stress-related Nrf2 transcription factor deficient mice. Hirayama, A., Yoh, K., Nagase, S., Ueda, A., Itoh, K., Morito, N., Hirayama, K., Takahashi, S., **Yamamoto, M.** and Koyama, A. *Free Rad. Biol. Med.*, in press
- (19) Distinct specificity of xenobiotic response in AhR-humanized model mouse. Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y. and **Yamamoto, M.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press

## 2. 学会発表

Transcription factor Nrf2 controls expression of CD36 by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynoneal in macrophages. Tetsuro Ishii, Ken Itoh, Emilio Ruiz, David S. Leake, **Masayuki Yamamoto** and Giovanni E. Mann. XIIth International Vascular Biology Meeting, Karuizawa, Japan, May 12-16, 2002

Identification of the phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system regulating detoxification and antioxidant enzymes. Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and **Yamamoto, M.** 5th International Conference on Zebrafish Development & Genetics, Madison, June 12-16, 2002 (Abstracts p. 285)

- 4-Hydroxynonenal induces nuclear translocation of the ubiquitin binding protein A170 in aortic smooth muscle cells. Tetsuro Ishii, Emilio Ruiz, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto and Giovanni E. Mann. XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International. Paris, France, July 16-20, 2002
- Redox regulation in vascular endothelial and smooth muscle cells. Giovanni E. Mann, Emilio Ruiz, Richard C.M. Siow, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto and Tetsuro Ishii. XIth Meeting of the International Society for Free Radical Research International. Paris, France, July 16-20, 2002
- Hemoprotein Bach1 regulates enhancer accessibility of heme oxygenase-1 gene. Sun, J., Muto, A., Suzuki, H., Nakajima, O., Shibahara, S., Alam, J., Yamamoto, M. and Igarashi, K. 6th International Porphyrin-Heme Symposium "Recent studies on porphyrin-heme and related compounds", Tokyo, July 6-8, 2002
- Decreased sensitivity to xenobiotics in a humanized mouse model. Moriguchi, T., Motohashi, H., Aoki, Y., Ohsako, S., Nakajima, O., Fujii-Kuriyama, Y., Tohyama, C., and Yamamoto, M. 14th International Symposium on Microsomes and Drug oxidations (MDO2002), Sapporo, July 22-26, 2002.
- Two domains of Nrf2 cooperatively bind CREB binding protein and synergistically activate transcription. Ken Itoh, Yasutake Katoh, Eisaku Yoshida, Makoto Miyagishi, Akiyoshi Fukamizu, Masayuki Yamamoto. 第 28 回 FEBS meeting, イスタンブールヒルトン, 10 月 20-25 日 (講演要旨集 p. 69)
- Nrf2 regulates CD36 scavenger receptor expression in macrophages: a novel signaling pathway acting in concert with PPAR- $\gamma$ . Tetsuro Ishii, Ken Itoh, Emilio Ruiz, David S. Leake, Hiroyuki Unoki, Masayuki Yamamoto and Giovanni E. Mann. International symposium for redox signaling and stress diseases. Kyoto, November 6-8, 2002
- 伊東健, 若林伸直, 加藤恭丈, 小林聡, 姜文一, 石井哲郎, 山本雅之. 酸化ストレスに対する生体応答・抗酸化剤防御. 第 75 回日本生化学会, 京都宝ヶ池プリンスホテル, 10 月 14-17 日 (講演要旨集 p. 649)
- 孫継英, 中島修, 鈴木洋, 武藤哲彦, 田代聡, 柴原茂樹, 武藤誠, 山本雅之, 五十嵐和彦. ヘム結合性転写因子 Bach1 によるヘムオキシゲナーゼ 1 遺伝子制御機構の解析. 第 75 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 10 月 14-17 日 (講演要旨集 p.1002)
- 石井哲郎, 伊東健, Emilio Ruiz, David Leak, 山本雅之, Giovanni E. Mann. Nrf2 はマクロファージにおいて酸化 LDL によるスカベンジャーリセプター CD36 の発

- 現調節を行う主要な転写因子である。第 75 回日本生化学会大会，京都国際会議場，2002 年 10 月 14-17 日（講演要旨集 p.1005）
- 藤井義明，沼山恵子，馬場崇，三村純正，十川和博，山本雅之，諸橋憲一郎。アリル ハイドロカーボン受容体 (AhR) の生体作用の分子メカニズム。第 24 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜，12 月 11-14 日（講演要旨集 p. 295）
- Ken Itoh, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Tetsuro Ishii, Tania O'Connor, Masayuki Yamamoto. Keap1 Regulates Both Cytoplasmic-Nuclear Shuttling and Degradation of Nrf2 in Response to Electrophiles. 第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜，12 月 11-14 日（講演要旨集 p. 300）
- 三村純正，馬場崇，細谷朋方，大島基彦，中島修，本橋ほづみ，高橋智，山本雅之，藤井義明。AhR による AhR のネガティブフィードバック制御。第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜。2002. 12. 11-14.（講演要旨集 p. 371）
- 小林麻己人，西川恵三，益見厚子，山本雅之。ゼブラフィッシュを活用した Gata1 遺伝子の制御機構の解明。第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜，12 月 11-14 日。（発表抄録集 p. 418）
- 本橋ほづみ，勝岡史城，Engel J.D.，山本雅之。マウスを用いた bZip 因子制御ネットワークの構成と機能の検証。第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜。2002. 12. 11-14.（講演要旨集 p. 419）
- 野原恵子，九十九伸一，伊藤智彦，山本雅之，本橋ほづみ，日田安寿美，藤井義明，井上薫，長井治子，遠山千春。T 細胞特異的 Constitutive Active Arylhydrocarbon Receptor トランスジェニックマウスの免疫系の解析 第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜。2002. 12. 11-14.（講演要旨集 p. 610）
- 鈴木隆史，高木やえ子，長内仁，小林麻己人，山本雅之。ゼブラフィッシュ GSTP 遺伝子の転写調節領域の解析。第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜，12 月 11-14 日。（発表抄録集 p. 765）
- 姜 文一，若林伸道，小林 聡，伊東 健，小林麻己人，山本雅之。Keap1 binds to actin in the cytosol and provokes the repression of Nrf2 activity. 第 25 回日本分子生物学会年会 バシフィコ横浜，12 月 11-14 日（講演要旨集 p. 765）
- 森口尚，本橋ほづみ，細谷朋方，中島修，高橋智，大迫誠一郎，青木康展，遠山千春，藤井義明，山本雅之。ヒト型ダイオキシン受容体ノックインマウスの表現型解析。第 25 回日本分子生物学会年会，バシフィコ横浜。2002. 12. 11-14.（講演

演要旨集 p.777)

## 招待講演

発生工学と遺伝子発現制御研究. ゲノム創薬セミナー. 旭テクノグラス本社会議室. 1月11日

転写因子による血液細胞の分化と癌化の制御機構. 東京大学分子細胞研究所セミナー. 1月16日

*Nrf2 and Keap1 regulation of antioxidant and phase II enzyme genes.* International symposium on the Regulation Network of Eukaryotic Gene Expression. Japan Society for Promotion of Science; Research for the Future Program. Sanjo Conference Hall at the University of Tokyo, February 2

遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの転写因子機能の解析. 第11回 心血管代謝研究会 特別講演, ホテルグランピア大阪, 2月22日

転写因子による異物代謝系と酸化ストレス応答系の制御機構. 放射線医学総合研究所: フロンティア研究センター講演会, 放射線医学総合研究所, 3月29日

*Nrf2 and Keap1 regulation of antioxidant and phase II enzyme genes.* The 7<sup>th</sup> Symposium of Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, May 22

*Dissection of elaborating cellular response to environmental stimuli.* Symposium at Annual Meeting of Korean Society of Toxicology: Current Trends in Toxicological Sciences. Chejun, Korea. May 24

解毒・抗酸化の分子機構. 日本生化学会東北支部会 2002年シンポジウム「レドックス生物学の進展」, 山形大学医学部大講義室, 5月31日

*Transgenic complementation rescue analysis of transcription factor function in vivo.* Kolloquium Molekulare Zellbiologie, Universitata zu Leubeck, June 27

転写因子による異物代謝系と酸化ストレス応答系の制御機構. 第19回日本小児肝臓研究会, サンレイク土浦, 7月19-20日

*Nrf2 and Keap1 in drug induction of metabolizing enzymes.* M. Yamamoto, N. Wakabayashi, T. Ishii, M. Kobayashi, Y. Kato, and K. Itoh. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. Royton Sapporo Convention Center, Sapporo, July 22-26

遺伝子レスキュー法による転写因子機能の個体レベルでの検証法. 山梨大学・山

梨医科大学総合分析実験センター設置記念特別講演，山梨医科大 臨床講義棟，  
9月3日

遺伝子レスキュー法による転写因子機能の個体レベルでの検証法．第9回八幡平  
造血セミナー，八幡平ハイツ，9月7日

IN VIVO FUNCTION OF GATA-1 AND GATA-2—Transgenic Complementation Rescue  
Analysis of Transcription Factor Function. 13th Conference on Hemoglobin  
Switching, St. John's College, Oxford, UK, September 26-30

トランスジェニックレスキュー法を用いた個体レベルでの転写因子機能の解析．

第75回日本生化学会シンポジウム「転写制御複合体の形成とその生物機能」京  
都国際会館，10月14日～17日

転写因子による異物代謝系と酸化ストレス応答系の制御機構．病態代謝研究会特  
別講演，経団連会館，10月19日

動物モデルから迫る赤血球分化の分子機構．第4回血液フォーラム，KDDI大手  
町ビル，10月19日

環境適応・応答制御の分子機構．第66回日本皮膚科学会東部支部学術大会，つ  
くば国際会議場，10月26日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

## 厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

### 分担研究報告書

#### 薬物代謝系の制御機構の解明と薬剤に対する 生体側の感受性決定因子の探索

#### 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における AhR/Nrf2-Keap1 制御系の関与の検討

分担研究者 本橋ほづみ（筑波大学・基礎医学系・講師）

#### 研究要旨

薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における、第1相酵素群・第2相酵素群の関与を、個体レベルにおいて明らかにするために、それらの統一的な制御因子である AhR と Nrf2 それぞれの遺伝子改変マウスを作製し、それらの薬剤に対する反応性を調べた。その結果、AhR と Nrf2 により制御される遺伝子群の機能は、薬剤の毒性発現の抑制に重要であることが示された。また、ヒトにおける薬剤応答性の個人差の発生に、これら遺伝子の機能的な差異がどれほど影響しているかを明らかにするために、AhR 遺伝子と Nrf2 遺伝子の多型解析を行った。その結果、それぞれの遺伝子に複数の多型が存在することが明らかになった。

#### A. 研究目的

異物代謝系第1相酵素群と第2相酵素群の協調的な作用により、体内に摂取された薬物は代謝され、体外に排泄される。第1相酵素群は、主として、チトクローム P450 群により触媒されており、薬物を酸化、あるいは、水酸化することにより、反応性の高い代謝中間産物を形成する。摂取された薬剤が、第1

相酵素群の誘導的な発現をもたらすが、その作用は、ステロイドホルモン受容体に類似した受容体型転写因子により実現されている。芳香族炭化水素類は、ダイオキシン受容体 (AhR) を活性化することにより、CYP1 族の酵素群を誘導し、フェノバルビタール類は CAR を介して CYP2 族酵素群を誘導する。また、PXR は合成ステロイド剤を含む様々な化合物により活性化されて、CYP3 族の発現をもたらす。PPAR はペルオキシソーム増殖剤や非遺伝毒性発癌剤などにより活性化されて CYP4 族の酵素群を誘導することが報告されている。第 1 相反応により生成した活性化代謝中間産物は、第 2 相酵素群の発現を誘導し、第 2 相反応により水溶性の高い硫酸基、グルタチオン基、あるいは、グルクロン酸基などと抱合され、排泄される。これまでの我々の研究から、第 2 相酵素群の統一的な制御因子が Nrf2 であることが明らかになった。

本研究の目的は、これら異物代謝系が、薬物による急性毒性や慢性毒性、晩発性障害である発癌などの副作用の発現の防止にどのように貢献しているのかを、それらの統一的な制御因子の機能を操作することを通して明らかにすることである。さらに、ヒトにおけるこれら制御因子の遺伝子多型が存在するかどうかの検討を行い、薬剤に対する反応の個人差の発生に、こうした遺伝子多型がどれほど貢献しているのかを明らかにすることである。そして、ひいては、個人の特徴的な反応性に応じた薬剤を適切な投薬量で処方するという、テーラード薬物治療を可能にすることである。

## B. 研究方法

**(1) Nrf2 欠損マウスの易発癌性の検討** 第 1 相反応により形成される活性型代謝中間産物は、蛋白質や核酸などの生体高分子に対して結合性を示し、組織障害や発癌を惹起する。Nrf2 により統一的に制御される第 2 相酵素群は、これらの中間産物を抱合反応などにより無毒化して排泄を促す。Nrf2 により制御される因子群が、薬物の急性毒性のみならず、晩発性影響である発癌に対してどのような貢献を果たしているかを明らかにするために、Nrf2 欠損マウスに



対する発癌実験を行った。Nrf2 欠損マウスに対して、ベンツピレンの皮下投与を行い、皮下腫瘍の形成までの期間と、形成数、生成後の腫瘍の増殖を観察した。また、Nrf2 欠損マウスに対してニトロサミンを投与し、膀胱がんの発生率、腫瘍の悪性度を調べた。さらに、オルティブラッツという第2相酵素群の誘導剤が抗ガン作用を示すかどうかを、ニトロサミンとオルティブラッツの同時投与実験により検討した。

**(2) ヒト AhR ノックインマウスの作製と薬剤反応性の検討** 薬剤の毒性発現に対する第1相酵素群の役割を明らかにするため、第1相酵素群の誘導に関わる制御因子のうち AhR に注目し、同因子の機能を個体において検討することを試みた。AhR 分子の性質には種差が大きく、そのために、ダイオキシンなど芳香族炭化水素に対する反応は、種により質的・量的に異なっていることがこれまでの報告から推測されている。in vitro で計測された TCDD との親和性は、C57BL6 の AhR (AhR<sup>b-1</sup>) で高く、DBA/2 の AhR (AhR<sup>d</sup>) で低く、後者の親和性は hAhR のそれと同程度である。しかし、AhR 分子の C 末端側は、hAhR と AhR<sup>d</sup> とでは、大きく異なっており、それぞれの分子に特有の性質を担っている可能性が示唆される。そこで、ヒトの hAhR を有する hAhR ノックインマウスを作製し、その薬剤に対する反応性を調べた (分担研究報告書・遠山千春の項を参照のこと)。

マウス AhR 遺伝子のプロモーター領域の下流にヒト AhR cDNA が連結されるようにターゲティングベクターを構築し、ES 細胞において、相同組み換え体を得た。こうして得られたクローンを胎胚期胎児に顕微注入してキメラマウスを得、さらにこれらを野生型 C57BL6 マウスと交配することにより、C57BL6 の遺伝的背景を有する hAhR ノックインマウスを作製した。このマウスに対して、hAhR の組織における発現の確認を行った後、3-メチルコラントレン (3-MC) と 2,3,7,8-TCDD の投与実験をおこない、肝臓における CYP1A 遺伝子群の誘導的発現の検討と、催奇形性の検討を行った。

### (3) AhR::Nrf2 2重欠損マウスの作製の薬剤に対する応答性の検討 Nrf2

欠失マウスでは、異物代謝系第2相酵素群の誘導が欠落していることから、様々な外来の化学物質により障害を受けやすいことが、次のような我々の解析から明らかにされていた。解熱鎮痛消炎剤として頻用されているアセトアミノフェンを投与したところ、Nrf2欠失マウスでは急性肝障害が高頻度に誘発された。また、ディーゼルエンジンの排気ガスに曝露したところ、Nrf2欠失マウスではDNAの塩基の修飾（DNAアダクト）が高頻度に生成された。つまり、Nrf2は実際に生体内において、外来の化学物質の代謝に重要な役割を果たす鍵因子であるといえる。

AhRとNrf2により制御される第1相、第2相酵素群が、薬剤の毒性発現にどのように貢献するのかを明らかにするために、また、これらの酵素群の機能に依存しない薬物代謝系の実体を明らかにするために、AhR欠損マウスとNrf2欠損マウスを交配することにより、これらが制御する酵素群の誘導的発現が全ておこらないマウス AhR::Nrf2 2重欠失マウスを作製し、同マウスの薬剤に対する反応性を調べた。

### (4) ヒト *nrf2* 遺伝子・*keap1* 遺伝子の多型を解析

ヒトの様々な疾患感受性にNrf2/Keap1制御系の機能の個体差が関与している可能性を考え、ヒトの癌組織や、皮膚疾患、自己免疫疾患、慢性呼吸器疾患の患者血液など、様々なサンプルを用いて、ヒト *nrf2* 遺伝子、*keap1* 遺伝子の多型解析を行った。それぞれの遺伝子上にプライマーを設計し、ヒトサンプルから得られたDNAを鋳型にPCRを行い、ダイレクトシーケンス反応により、ゲノムDNAの配列を決定した。

## C. 研究結果

### (1) *nrf2* 欠損マウスの易発がん性の検討

ベンツピレンを投与された Nrf2

欠損マウスは、コントロールの野生型マウスに比べて、早い時期に皮下の腫瘍を形成し、その後の腫瘍の増殖も早い傾向にあることが明らかになった。また、ニトロサミンの投与を受けた Nrf2 欠損マウスは、膀胱がんの発生率が上昇し、腫瘍の悪性度もやや増悪している傾向が認められた。また、野生型マウスにオルティプラッツとニトロサミンを同時投与すると、ニトロサミンによる膀胱がんの発生が抑制された。しかし、Nrf2 欠損マウスにおいては、オルティプラッツの発癌抑制効果が観察されなかった。以上の結果から、Nrf2 により制御される酵素群はがん抑制に重要であること、また、オルティプラッツの発癌抑制効果は Nrf2 に依存していることが明らかになった。

**(2) ヒト AhR ノックインマウスの作製と薬剤反応性の検討** hAhR マウスは生存可能で、生殖能も正常であった。3-MC 投与による肝臓での CYP1A1 あるいは CYP1A2 の誘導の強度は、AhR<sup>b-1</sup> マウス>>AhR<sup>d</sup> マウス=hAhR マウスという順番であり、hAhR マウスと AhR<sup>d</sup> マウスの反応性はほぼ等しかった。一方、TCDD 投与による誘導の強度は、AhR<sup>b-1</sup> マウス>AhR<sup>d</sup> マウス>hAhR マウスであり、hAhR マウスは 3-MC に比べて TCDD に反応しにくいということが明らかになった。TCDD に対する催奇形性も、この結果と一致する傾向が得られた。口蓋裂は、AhR<sup>b-1</sup> マウスで 100%、AhR<sup>d</sup> マウスで 30%、hAhR マウスで 0%という発生率であった。水腎症の発生率は、いずれの系統においても 8 割前後であったが、重症度は AhR<sup>b-1</sup> マウス>AhR<sup>d</sup> マウス>hAhR マウスという傾向が認められた。

**(3) AhR::Nrf2 2 重欠損マウスの作製の薬剤に対する応答性の検討** AhR::Nrf2 2 重欠損マウスの薬剤に対する反応性を調べたところ、AhR リガンドである 3-MC や、Nrf2 の活性化剤である BHA に対する反応は著しく低下していたが、フェノバルビタールに対する反応は保たれており、むしろ、増強しているという結果であった。

**(4) ヒト *nrf2* 遺伝子, *keap1* 遺伝子の多型を解析**      ダイレクトシーケン  
ス反応を用いた多型解析の結果、ヒト *nrf2* 遺伝子では、アミノ酸翻訳領域には  
多型を検出することはできなかったが、プロモーター領域に複数の多型が存在  
することが明らかになった。*keap1* 遺伝子ではアミノ酸翻訳領域に様々な多型  
が存在しており、特に、アミノ酸の置換を伴うものが複数存在することが確認  
された。

#### D. 考察

Nrf2 の標的遺伝子群が、生体の薬剤による急性毒性・慢性毒性からの防御  
に重要であることが、個体レベルで確認された。この結果は、Nrf2 の選択的  
活性化剤が、がん予防の薬として利用可能であることを示唆しており、本研究  
の後半に予定している Nrf2 活性化剤の開発に向けてのよりどころを与えるも  
のである。

hAhR マウスに対して、様々な薬剤を投与して、個体に及ぼす影響とその感  
受性を明らかにしていくことにより、hAhR の基質特異性と影響の及ぶ組織特  
異性が明らかになると思われる。同マウスの解析は、ヒトの反応を予測し、そ  
れを予防するための基準作りに大きく貢献できるものと期待される。そして、  
同マウスから得られる実験結果は、これら化学物質の毒性の適切な評価を行う  
上で、非常に有用な情報を提供するものと思われる。

AhR::*Nrf2* 2重欠失マウスに対して様々な薬剤を投与し、さらに、その薬剤  
の代謝経路、代謝産物を調べることにより、AhR と Nrf2 に制御される酵素群  
の、薬物代謝と毒性の発現における重要性が明らかになると考えられる。

多型解析では、ヒト *nrf2* 遺伝子では、プロモーター領域に複数の多型が、*keap1*  
遺伝子ではアミノ酸翻訳領域に様々な多型が存在することが確認された。今後、  
これらの多型がどのような集団に多いかを検討し、疾患や薬剤感受性の異常と