

糖質コルチコイド受容体とエピジェネティック修飾による  
カルボキシルエステラーゼ遺伝子の転写調節機構  
Transcriptional regulation of carboxylesterase gene  
by glucocorticoid receptors and epigenetic marks

薬科学専攻 堀 武志  
Takeshi Hori

## 背景

医薬品の作用は、体内の各部位における医薬品の濃度と密接な関係がある。したがって、新規医薬品の開発においては、医薬品候補化合物のヒトでの体内動態をできるだけ正確に予測することが要求される。体内動態には、吸収、分布、代謝、排泄が主に関わっている。その中で代謝は、化合物の構造を変化させる重要な過程であり、それを行う酵素は薬物代謝酵素と呼ばれる。そのため、化合物の薬理作用や有害作用を正確に評価するためには薬物代謝酵素について理解する必要がある。

近年、新規医薬品は分子間相互作用を基に理論的に設計されることが多い。しかし、薬理活性を追求していくと、臨床で使用できない程の低い体内吸収率をもった構造になる場合がある[1]。また、抗がん剤などは、標的組織に到達する前に正常細胞に作用して重大な副作用を発現させることがある。そのため、体内吸収率を改善して生物学的利用能を高めたり、副作用を軽減したりする目的で、医薬品候補化合物をエステル結合やアミド結合などで化学修飾する場合がある。このようにして作られた医薬品はプロドラッグと呼ばれる。プロドラッグは化学修飾により薬理活性がマスクされており、生体内で代謝活性化を受ける。エステル化やアミド化されたプロドラッグの代謝活性化において中心的な役割を果たしているのは、カルボキシルエステラーゼ (carboxylesterase, CES) と呼ばれる加水分解酵素である。この薬物代謝酵素はプロドラッグの代謝活性化のみならず多くの薬物の不活性化にも関与するため、薬物代謝において極めて重要な役割を果たしている。

以上のような背景から、生体内における CES の分布や化合物による CES の誘導に関わる情報は、医薬品開発において有用である。そのため、本研究では、CES の組織特異的発現や誘導に関わる遺伝子発現調節機構を明らかにすることを目的とした。第一章では、ヒトにおける CES1A1 アイソザイムの組織特異的発現の機序についてエピジェネティクスの観点から検討した。第二章では、ヒト胎児の肝細胞において、合成糖質コルチコイドのデキサメタゾンによる CES1A1 の誘導の可能性とその機序について検討した。第三章では、ラットの肝臓におけるデキサメタゾンによる CES2 の誘導機序について検討した。

## 第一章

### 【目的】

CES1A1 はヒトにおける主要な CES アイソザイムである。CES1A1 mRNA は肝臓、肺、心臓などの臓器で発現し、特に肝臓での発現が高い。一方で、腎臓や小腸における CES1A1 mRNA の発現は低い。このような CES の組織特異的発現の機序を解明することは、目的の臓器で効率的に代謝される副作用の少ないプロドラッグの開発に繋がる可能性がある。ヒト腎臓には *CES1A1* 遺伝子の転写を促進する Sp1 や HNF-4 $\alpha$  [2] が発現していることから、腎臓には *CES1A1* 遺伝子の発現を抑制する機構が存在している可能性が考えられた。遺伝子発現

を抑制する機構として、遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が関与するものが知られている。そのため、本章においては DNA メチル化による *CES1A1* 遺伝子の発現抑制の可能性について検討した。

#### 【方法】

DNA メチル化による転写制御を調べるために、HEK293 細胞（ヒト胎児腎由来細胞）、HuH-7 細胞（ヒト肝癌由来細胞）、そして HepG2 細胞（ヒト肝癌由来細胞）を DNA メチル基転移酵素阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-aza-dC) またはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) で処理し、*CES1A1* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。さらに、HEK293 細胞、HepG2 細胞、ヒト腎組織、そして肝組織における *CES1A1* 遺伝子のプロモーター領域とその周辺領域の DNA メチル化状態についてバイサルファイトシーケンシングによって調べた。

#### 【結果と考察】

*CES1A1* 遺伝子における CpG ジヌクレオチド含量を調べた結果、転写開始点 (+1) の 3' 側 (+72/+541) に CpG が相対的に高頻度で存在する領域、いわゆる CpG アイランドが存在していた。この結果は、*CES1A1* 遺伝子の発現が DNA メチル化によって転写制御されているという仮説と矛盾しない。次に、*CES1A1* mRNA を発現していないヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を 5-aza-dC で処理した結果、*CES1A1* mRNA の著しい増加が観察された。バイサルファイトシーケンシングの結果、HEK293 細胞における *CES1A1* 遺伝子の転写開始点周辺領域は高度に DNA メチル化されており、対照的にヒト肝癌由来の HepG2 細胞におけるこの領域はほとんど DNA メチル化されていないことが明らかになった。HEK293 細胞を 5-aza-dC で処理した結果、DNA メチル化をほとんど受けてない DNA 分子が観察された。これらの結果から、HEK293 細胞における *CES1A1* mRNA の発現が転写開始点周辺領域の DNA メチル化によって抑制されていることが示唆された。また、*CES1A1* mRNA の発現上昇において 5-aza-dC と TSA の相乗作用が観察されたことから、*CES1A1* 遺伝子の発現にヒストンのアセチル化が関与していることが示唆された。一方、ヒト腎組織と肝組織に関しては、特に CpG アイランドの 5' 側の領域において、肝組織よりも腎組織の方が有意に高く DNA メチル化されていた。これらの結果から、ヒト腎組織における *CES1A1* 遺伝子の発現の抑制に、転写開始点周辺領域の DNA メチル化が関与していることが示唆された[3]。

## 第二章

#### 【目的】

医薬品や環境化学物質の中には、酵素遺伝子の発現量を変化させるものがある。そのような化学物質の胎児への影響については、とりわけ注意が必要である。薬剤投与により *CES* 遺伝子の発現が誘導される場合、生体内の代謝が変動するため、臨床における薬物相互作用の原因となる可能性がある。

デキサメタゾン は核内受容体を介して多くの遺伝子の発現を誘導することが知られている。ヒト肝細胞において、デキサメタゾンは *CES1* を誘導することが報告されているが[4]、ヒト胎児肝細胞においてはこれまで検討されてこなかった。また、*CES1A1* mRNA の発現量が少ない胎児の肝細胞では、*CES1A1* 遺伝子の転写開始点周辺の領域が高度に DNA メチル化されていることが予想された。一方で、デキサメタゾン処理により DNA 脱メチル化が起こる遺伝子の存在が報告されている[5]。そこで本章においては、ヒト胎児由来の肝細胞を用いて、デキサメタゾンによる *CES1A1* 遺伝子の誘導について核内受容体と DNA メチル化の観点から検討した。

#### 【方法】

最初に、ヒト胎児肝 (HFL) 細胞を 100 nM のデキサメタゾンで 1、3、6、12、18 日間処理した。そして、*CES1A1* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で調べた。また、糖質コルチコイド受容体阻害剤 (RU-486) の存在下で、デキサメタゾン処理による *CES1A1* 遺伝子の発現への影響を調べた。続いて、第一章と同様に、DNA メチル化とヒストンアセチル化の関与を調べるために、HFL 細胞を 5-aza-dC または TSA で処理し、*CES1A1* mRNA の発現量をリアルタイム PCR によって測定した。さらに、デキサメタゾン処理をした HFL 細胞からゲノム DNA を抽出し、*CES1A1* 遺伝子のプロモーター領域とその周辺領域の DNA メチル化状態についてバイサルファイトシーケンシングを用いて調べた。

### 【結果と考察】

HFL 細胞をデキサメタゾンで処理したところ、処理後 3 日から 18 日において、*CES1A1* mRNA の顕著な増加が観察された。RU-486 の存在下で、HFL 細胞をデキサメタゾンで 3 日間処理した結果、デキサメタゾンによる *CES1A1* mRNA の増加は観察されなかった。したがって、デキサメタゾンによる *CES1A1* mRNA の増加は糖質コルチコイド受容体 (GR) を介していること示唆された。

一方、HFL 細胞を 5-aza-dC もしくは TSA で処理した結果、*CES1A1* mRNA の発現が上昇した。バイサルファイトシーケンシングの結果、成人肝組織や HepG2 細胞と比較して、HFL 細胞における *CES1A1* 遺伝子の転写開始点周辺領域は高度に DNA メチル化されていることが明らかになった。HFL 細胞をデキサメタゾンで処理した結果、非処理と比較して、転写開始点周辺領域における DNA メチル化レベルの低い分子がより多く観察される傾向があった。これらの結果から、デキサメタゾン処理による *CES1A1* mRNA の増加に DNA 脱メチル化が関与している可能性が示唆された。

## 第三章

### 【目的】

デキサメタゾン処理による *CES* の誘導はヒトのみならずラットにおいても観察される。これまでに本研究室では、デキサメタゾンの投与によりラットの肝臓内でラット *CES2* (r*CES2*) が著しく誘導されることを報告して来た [6]。しかしながら、酵素誘導の分子機構に関しては不明であった。ラットにおける *CES* の誘導機序を解明することは、臨床における薬物相互作用の予測や、*CES* 遺伝子の発現調節機構の研究に有用な情報を与える。そこで本章においては、デキサメタゾンによる r*CES2* の誘導機序について検討した。

### 【方法】

ラットにデキサメタゾン (1 mg/kg 体重) を腹腔内投与し、投与後 0、3、6、12、24 時間における肝臓を摘出した。それらの肝臓における r*CES2* mRNA とタンパク質の発現量、そしてヘミコハク酸メチルプレドニゾン (MPHS) 加水分解活性を調べた。次に、ラットの初代肝細胞をデキサメタゾンで処理した後、r*CES2* mRNA の発現量を測定した。さらに、GR 拮抗薬である RU-486 の存在下もしくはタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドの存在下、r*CES2* mRNA の発現量に対するデキサメタゾン処理の影響を調べた。デキサメタゾン処理による r*CES2* 遺伝子のプロモーター活性への影響を調べるために、r*CES2* 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを初代肝細胞に導入し、レポータージーンアッセイを行った。最後に RU-486 の存在下、デキサメタゾン処理による r*CES2* 遺伝子のプロモーター活性への影響を調べた。

### 【結果と考察】

デキサメタゾンを腹腔内投与した結果、投与後 12 時間にかけて肝臓で r*CES2* mRNA が著しく増加すること

が明らかになった。rCES2 タンパク質の発現量と MPHS 加水分解活性は、投与の 24 時間後が最も高かった。ラット初代肝細胞を 100 nM のデキサメタゾンで処理した結果、rCES2 mRNA の著しい増加が観察され、その増加は 10 μM RU-486 の存在下では観察されなかった。これらの結果から、デキサメタゾンによる rCES2 mRNA の増加には GR を介している可能性が示唆された。rCES2 mRNA の増加ほど顕著ではなかったが、rCES2 遺伝子のプロモーター活性はデキサメタゾン処理により上昇した。そして RU-486 の存在下では、その活性上昇は観察されなかった。したがって、デキサメタゾンは GR の活性化を介して rCES2 遺伝子の転写を促進するということが明らかになった。興味深いことに、初代肝細胞において観察された 100 nM のデキサメタゾン処理による rCES2 mRNA の誘導は、10 μg/mL のシクロヘキシミドの存在により完全に阻害されることが明らかになった。この結果から、デキサメタゾンによる rCES2 mRNA の誘導は新規タンパク質合成に依存している可能性が示唆された[7]。

## 結論

第一章では、CES1A1 遺伝子の発現に DNA メチル化が関与することが明らかになった。また、ヒトの腎臓において、CES1A1 遺伝子の転写開始点周辺領域の DNA メチル化により CES1A1 遺伝子の発現が抑制されている可能性が示唆された。

第二章では、ヒト胎児肝細胞において、デキサメタゾンは GR を介して CES1A1 mRNA を増加させることが示唆された。また、その増加に、CES1A1 遺伝子の転写開始点周辺領域の DNA 脱メチル化が関与している可能性が示唆された。

第三章では、ラット肝臓において、デキサメタゾンは GR を介して転写促進的に rCES2 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。また、その誘導に新規タンパク質合成が関与している可能性が示唆された。

## 引用文献 (主論文は[3]と[7]である。)

- [1] Imai T. [Carboxylesterase: from drug metabolism to drug discovery]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2009 Nov;134(5):281-4.
- [2] 堀 武志, 降幡知巳, 千葉 寛, 細川正清. カルボキシルエステラーゼ 1A1 (CES1A1) 遺伝子の発現調節における hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) の役割. 日本薬学会 第 129 年会. 2009 年 3 月.
- [3] Hori T, Hosokawa M. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica*. 2010 Feb;40(2):119-28.
- [4] Zhu W, Song L, Zhang H, Matoney L, LeCluyse E, Yan B. Dexamethasone differentially regulates expression of carboxylesterase genes in humans and rats. *Drug metabolism and disposition*. 2000 Feb;28(2):186-91.
- [5] Kress C, Thomassin H, Grange T. Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25;103(30):11112-7.
- [6] Furihata T, Hosokawa M, Fujii A, Derbel M, Satoh T, Chiba K. Dexamethasone-induced methylprednisolone hemisuccinate hydrolase: its identification as a member of the rat carboxylesterase 2 family and its unique existence in plasma. *Biochemical pharmacology*. 2005 Apr 15;69(8):1287-97.
- [7] Hori T, Jin L, Fujii A, Furihata T, Nagahara Y, Chiba K, Hosokawa M. Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene. *Xenobiotica*. 2012 Jul;42(7):614-23.