

助成番号 0722

## 高食塩ストレスによる薬物代謝酵素の遺伝子発現制御機構の解明

伊藤 崇志, 福田 剛史, 南畝 晋平, 藤尾 慈, 東 純一

大阪大学大学院薬学研究科

**概要** 医薬品の体内動態を規定する因子として、肝臓における薬物代謝(解毒機構)は最も重要な位置を占める。多くの薬物代謝酵素は、環境因子など、多様な因子により変動し、薬物治療における治療効果及び副作用発現を左右する。肝臓は主に食事などの影響により、常に浸透圧の変化にさらされているが、これまでに薬物代謝酵素の発現に対する浸透圧の影響は検討されていない。

我々は、高食塩ストレス及び浸透圧ストレスの薬物代謝酵素の発現量に及ぼす影響を検討するため、ヒト初代培養肝細胞を用いて、一連の薬物代謝酵素遺伝子の変動を解析した。その結果、高食塩培地及び高浸透圧培地にて培養した細胞において、cytochrome P450(CYP)分子種である CYP2A1 と CYP2E1 及び UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B4 遺伝子の増加が認められた。

さらに、高食塩ストレスによる CYP2E1 遺伝子の変動に関わる分子メカニズムを検討するためにヒトゲノム DNA 上のプロモーター領域の解析を行い、CYP2E1 遺伝子の上流領域に浸透圧応答配列のコンセンサスモチーフを同定した。レポーターアッセイの結果、このモチーフが高食塩ストレスによる CYP2E1 プロモーター活性の必要不可欠であることが示された。また、浸透圧応答配列結合タンパク(TonEBP)が高食塩ストレスによる CYP2E1 遺伝子の発現上昇に関わることが明らかにされた。

今回の結果から、高食塩及び高浸透圧ストレスが薬物代謝酵素 CYP1A1、CYP2E1、UGT2B4 の発現制御に関与することが明らかになり、これらが肝臓における薬物の代謝に影響を及ぼす可能性が考えられた。

### 1. 研究目的

医薬品の体内動態を規定する因子として、肝臓における薬物代謝(解毒機構)は最も重要な位置を占める。多くの薬物代謝酵素は、環境因子など、多様な因子により変動することがよく知られている。

細胞内外の浸透圧は食事や水分補給、栄養状態やホルモン、酸化ストレスといったさまざまな生理的または病態的条件により変動することが報告されている。組織における浸透圧変化は正常な細胞内のイオン活動を攪乱するため、細胞は形態変化をきたし、細胞傷害または細胞死に至る(Dmitrieva *et al.* 2001)。一方で、高浸透圧刺激によりストレスに順応するためのシグナル分子が活性化されることが報告されており、その一つとして Rel/NFκB/NFAT フェ

ミリーに属する転写因子である tonicity response element binding protein (TonEBP) が挙げられる(Woo *et al.* 2002a; Ho 2006)。TonEBP は高浸透圧環境において活性化され、taurine transporter (TauT) や sodium/myo-inositol transporter、betaine/GABA transporter-1 などの浸透圧調節物質のトランスポーターや、heat shock protein 70 (Hsp70)、osmotic stress protein of 94 kDa (Osp94) などのシャペロンタンパクなど、osmoprotective 遺伝子の発現を制御し、高浸透圧ストレスに対して細胞保護の役割を果たす(Burg *et al.* 1997; Woo *et al.* 2002b; Ito *et al.* 2004; Kojima *et al.* 2004)。

肝臓は主に食事などの影響により、常に浸透圧の変化にさらされているが、これまでに薬物代謝酵素の発現に対

する浸透圧の影響は検討されてきていない。そこで、本研究は浸透圧が薬物代謝酵素の遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的とし、まず高食塩ストレスおよび浸透圧ストレスによるP450や他の薬物代謝酵素の発現変化を、ヒト肝細胞を用いて網羅的に解析した。さらに、高食塩ストレスにより発現変動が見られた分子種についてその発現変動に係る分子メカニズムの解析を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 細胞培養

ヒト肝凍結細胞(Xeno Tech LLC)を $10^6$  cells/wellの濃さでコラーゲンタイプ1によりコートされた6ウェルプレートに播種し、ランフォード培地(Charls River Japan)にて二日間培養した。ヒト肝がん由来HepG2細胞は6ウェルプレートに播種し、Minimum Essential Mediumにて培養した。その後、細胞を等張培地または高浸透圧培地で24時間培養し、実験に用いた。高浸透圧培地は20、50 mMのNaCl(高食塩培地)、もしくは50、100 mMのスクロースを培地に添加し調製した。本検討での結果が、物質の透過性によるものではないことを確認するために、細胞を透過するNaClと、透過しないスクロースをそれぞれ用いた2種の高浸透圧培地で検討を行った。

### 2.2 DNA マイクロアレイ

Total RNAは、細胞をQiazol(QIAGEN)により回収し、製品プロトコールに準じて抽出した。逆転写反応は10 µgのtotal RNAを鋳型とし、Cy3-dUTP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)、oligo(dT)12-18primer(Invitrogen)、RNase Inhibitor(TOYOBO)およびSuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen)を含む50 mM Tris-HCl(pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTTとdNTPsから成るバッファー中で行った。反応は42°C 80分間行い、反応開始40分後にSuperScript II Reverse Transcriptaseを加えた。反応液よりMinElute™ PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて、製品プロトコールに準じてCy-3によってラベルされたcDNAプローブを精製した。

遺伝子発現のスクリーニングにはKurabo Multiple Assay DNA array for Human(MAPH-01, Kurabo)を用いた。スライドはまず4x standard saline citrate(SSC)、0.5% sodium dodecyl sulfate(SDS)、1% bovine serum albumin(BSA)から成るブロッキング溶液と42°Cにおいて45分反

応させた。ラベルされたcDNAは2x SSC、4x Deahardt's solution(Sigma-Aldrich)、salmon sperm DNA(Invitrogen)を含むハイブリダイゼーションバッファー中で95°C 2分の変性の後、室温まで冷却した。それらのcDNAを個々のアレイウインドウにアプライし、65°Cにおいて16時間ハイブリダイズさせた。スライド上のラベルされたcDNAを2x SSCと0.1% SDSを含むバッファーにより洗浄し、直ちにスライドを以下の組成のバッファーで洗浄した(2x SSCと0.1% SDSで室温5分間、0.2x SSCと0.1% SDSで室温5分間、0.2x SSCと0.1% SDSで55°C5分間、0.2x SSCで室温にてすすいだ後、0.05x SSCで室温2分間)。ハイブリダイズしたイメージはGenePix 4000B microarray scanner(Molecular Devices)によって取り込み、Genepix Pro 6.0 software(Molecular Devices)を用いて数値化した。補正された強度は、それぞれの遺伝子の強度からバックグラウンドの値を減じたものである。補正された強度がバックグラウンドの値の2倍未満である遺伝子は未検出とみなした。

### 2.3 リアルタイム RT-PCR

逆転写反応は3 µgのtotal RNAを鋳型とし、oligo(dT)12-18 primer(Invitrogen)0.5 µg、dNTP各0.8 mM、RNase Inhibitor(TOYOBO)40 unitsおよびRever Tra Ace(TOYOBO)100 unitsを含むRT反応液20 µL中で42°C 60分間反応を行い、cDNAを合成した。反応後、滅菌蒸留水を加え2倍希釈液とし、そのうちの1 µLをPCRに供した。Real-time PCRはSYBR greenと、センスおよびアンチセンスプライマーを各0.16 µM、0.2 M dNTPs、Ampli Taq Gold(Applied Biosystems)1 unitを含む25 µL液を反応液とし、ABI PRISM Sequence Detector 7700(Applied Biosystems)により行った。各プライマーの配列をTable 1に示した。なお、各プライマーはイントロンを挟んだ領域に設定し、混在するゲノムDNAの影響を受けないよう考慮した。反応条件はまず95°Cで5分間加熱後、95°C 30秒、60°C 1分の反応を40サイクル繰り返した。なお、ハウスキーピング遺伝子のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を補正に用いた。

### 2.4 プラスミド作製

CYP2E1のプロモーター領域、-1361~+32はヒトのゲノムDNAを鋳型とし、PCR反応により増幅した。PCRのためのプライマー+32RにはHindIIIサイトを連結し、-1361FのXho IサイトとのフラグメントをpGL3-basic(Promega)へ

Table 1. プライマー配列

Gene	primer sequence	Tm annealing	amplicon size
CYP1A1	forward: 5'-GATCCTTGTGATCCCAGGCTC-3'	60 °C	122 bp
	reverse: 5'-GAAACTCCGTGGCCGACAT-3'		
CYP2E1	forward: 5'-TCAATCTCTGGACCCCAACTGT-3'	60 °C	115 bp
	reverse: 5'-AGTCACGGTGATAACCGTCCATT-3'		
UGT2B4	forward: 5'-GGCTGTACAAGTGGATACCCAG -3'	60 °C	147 bp
	reverse: 5'-CAGGTTGATCTGCAACAATGGA-3'		
GAPDH	forward: 5'-CAATGGAAATCCCATCACCATC-3'	60 °C	101 bp
	reverse: 5'-TGAAGACGCCAGTGGACTCC -3'		

サブクローニングして p2E1-1342 とした。このフラグメントを鋳型とし、異なる長さの CYP2E1 プロモーター領域のフラグメントを作製した。-586 から+32 と、-566 から+32 のフラグメントは PCR により増幅し、pGL3-basic へ挿入して p2E1-586、p2E1-566 とした。-230 から+32 を含むレポータープラスミド、p2E1-230 は p2E1-586 のフラグメントを Nhe I で切断し、セルフライゲーションにより作製した。また TonE コンセンサス配列を変異させたプライマー -586mutF を用いた PCR により複製したフラグメントを pGL3 へ挿入し、p2E1-586mut を作製した。作製したプラスミドの塩基配列はダイレクトシーケンシング法により確認した。CYP2E1 のプロモーター領域に存在する TonE コンセンサス配列を四つつなげたレポータープラスミド p4x2E1TonE-SV40-Luc は、SV40 promoter を含む pGL-3-promoter vector に 5'-CTAG CGGATCCCATGGAATTTTCCAGTTCATGGAATTTTC CAGTTCATGGATTTTCCAGTT-3' の塩基対を挿入することにより作製した。また、TonEBP の発現ベクター pFLAG-TonEBP またはドミナントネガティブ体 (dnTonEBP) の発現ベクター pFLAG-dnTonEBP は既存のものを用いた (Ko *et al.* 2000; Ito *et al.* 2004)。

## 2. 5 レポーターアッセイ

HepG2 細胞へのプラスミドのトランスフェクトは、Fugene 6 transfection reagent (Roche) を用い、製品プロトコールに準じ行った。Thymidine kinase (TK) promoter を有するウミシイタケルシフェラーゼプラスミド pRL-TK はトランスフェクト効率の補正のためにコトランスフェクトした。細胞は等張培地または高浸透圧培地で 24 時間培養後、回収し、Dual

Luciferase assay system (Promega) を用いて、ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性を測定した。

## 2. 6 ゲルシフトアッセイ

HepG2 細胞を  $1.9 \times 10^5$  cells/well で 10 cm dish に播種し、浸透圧処置後、既報に従い核抽出液を回収した (Ito *et al.* 2007)。各サンプルは BCA assay (Pierce Biotechnology) でタンパク定量し、-80°C で保存した。

目的の配列を含んだオリゴヌクレオチドと、その相補鎖のオリゴヌクレオチド (2E1-TonE sense: AACTGGAAAA TTCCATG, antisense: CATGGAATTTTCCAGTT) を等量混和し、95°C で 5 分加熱し、その後徐々に冷却しアニーリングさせ、2 本鎖 DNA を作製した。プローブのラベルリングには、10  $\mu$ M DNA Probe 1.0  $\mu$ l、10 $\times$ Protruding End Kinase buffer 1.0  $\mu$ l、[ $\gamma$ 32P]-ATP (Perkin Elmer) 3.0  $\mu$ l、T4 Polynucleotide Kinase (9 U/ $\mu$ l) (TOYOBO) 1.1  $\mu$ l、Nano Pure 3.9  $\mu$ l を加え、全量 10  $\mu$ l の系で 37°C、60 分間ラベル化反応を行った後、95°C で 2 分処理し、徐冷した。反応後、プローブをスピンカラム (BioLad) にて精製し、-20°C に保存した。

核抽出タンパク 5  $\mu$ g を [ $\gamma$ 32P]-ATP でラベルした 200 fmol の 2E1/-580 to -564 プローブと結合させた。DNA プローブと核抽出物は以下の条件下 (7.5 mM HEPES (pH 7.8), 0.9 mM EDTA, 3.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.7 mM DTT, 10% glycerol, 1  $\mu$ g/ml polydI-dC) で、30°C にて 20 分反応させた。Competition assay のために、過量の wild もしくは mutant 2E1-TonE, wild TauT-TonE オリゴヌクレオチド ( 2E1-TonEmut sense: AACTCGATCATTTCCATG,

antisense: CATGGAATGATCGAGTT, TauT-TonE sense: AGCTGGTATTTTTCCACCCAG, antisense: CTGGGTGG AAAAATACCAGCT) (Ito *et al.*, 2007)をプローブとインキュベートする前に5分間プレインキュベートした。スーパーシフトの検出のために、核抽出物を2 µgの抗体(抗TonEBP抗体(Oncogene), コントロール IgG(Santa Cruz Biotechnology))と30°Cで15分さらに反応させた。その後、4% polyacrylamide 1×TBE gelを用いて電気泳動を行い、タンパク質を分離した。終了後、酢酸メタノール(酢酸:メタノール:水=1:1:8)を用いてタンパク-DNA複合体を固定し、シグナルをX線フィルム上に露光して検出した。

### 2.7 統計処理

得られた結果は平均値 ± 標準誤差(S.E.)で表し、2群間比較の有意差は student's test にて検定し、 $p < 0.05$ を統計学的な有意差とした。

## 3. 結果

### 3.1 高食塩ストレス及び浸透圧ストレスによる薬物代謝酵素遺伝子の発現変動

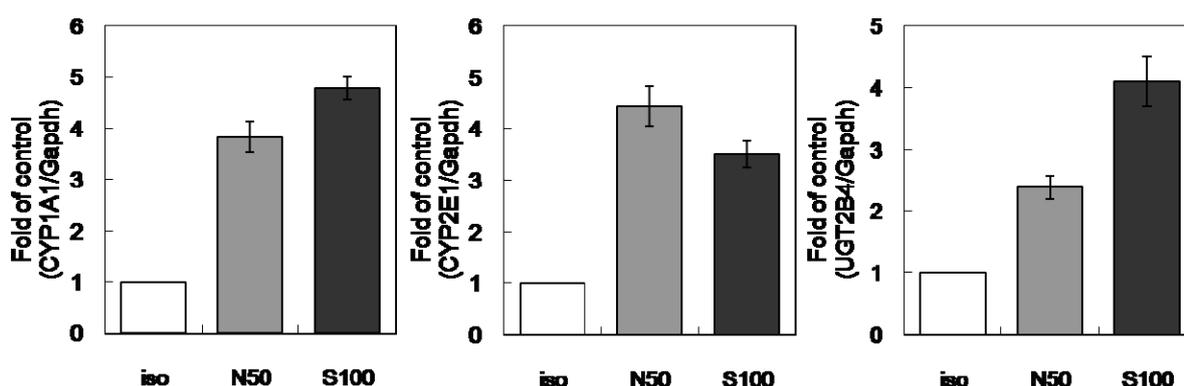
浸透圧負荷により遺伝子発現が調節される薬物代謝関連遺伝子を同定するため、ヒト肝初代培養細胞を高食塩含有培地及び高浸透圧培地(スクロース添加培地)にて24時間培養後、RNAを精製し、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。99の薬物動態関連遺伝子の発現変化を解析した結果、高食塩含有培地及び高浸透

圧培地にて培養した細胞において、CYP2E1、CYP1A1、UGT (UDP-glucuronosyltransferase) 2B4 遺伝子の2倍以上の発現誘導が認められた。さらに、リアルタイム RT-PCR法により、高食塩条件で培養された細胞においてこれらの遺伝子発現の増加を確認した(Fig. 1)。

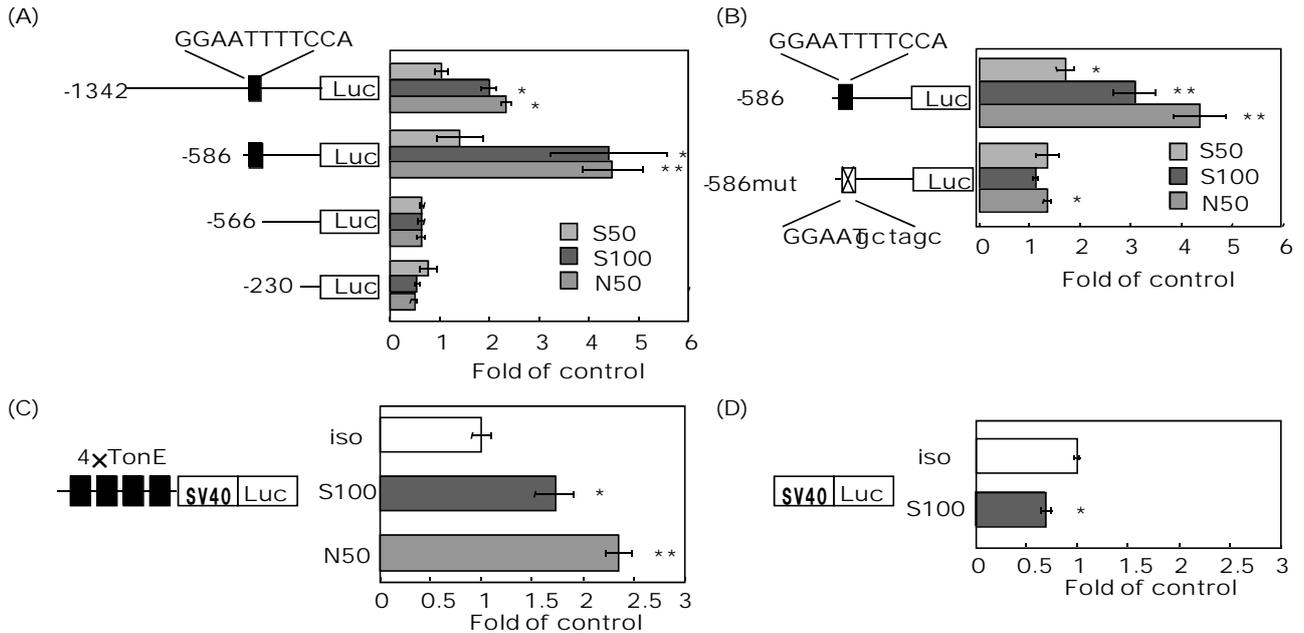
### 3.2 高食塩ストレスによるCYP2E1誘導メカニズム

高食塩ストレスによる薬物代謝酵素の遺伝子発現変動に関わる分子メカニズムを検討するため、ヒトゲノム DNA上のプロモーター領域の解析を行った。高食塩及び高浸透圧培地で培養後に発現上昇のみられた遺伝子(CYP2E1, CYP1A1, UGT2B4)のコーディング領域上流約5 kbpのプロモーター領域の塩基配列を調べ、転写調節に関わるモチーフの塩基配列の探索を行った。その結果、CYP2E1 遺伝子上流領域の-577~-567において、浸透圧応答配列(TGGAAA・C/T・C/T)が確認された(Fig. 2A)。なお、他の遺伝子上流配列からは、この配列は同定されなかった。

次に、CYP2E1のプロモーター領域に見つかった浸透圧応答配列が、高食塩ストレスによる遺伝子発現上昇に関与するかを検討するため、レポーターアッセイを行った。レポーターアッセイには、ルシフェラーゼ遺伝子上流に異なる長さのプロモーター配列を導入したレポータープラスミド(Fig. 2A)を用いた。浸透圧負荷により、CYP2E1プロモーターの-1342から+32を含むp2E1-1342のレポーター活性は顕著に増加し、その活性化はp2E1-586でも認め



**Fig. 1. Regulation of drug-metabolizing enzymes in human primary hepatocyte culture.** Real-time RT-PCR was carried out by using primers specific for CYP1A1, CYP2E1 and UGT2B4 with total RNA prepared from human primary hepatocytes cultured in isotonic (iso) or hypertonic media [50 mM NaCl (N50) or 100 mM sucrose (S100)] for 24 h. Data are shown in bar graphs and represent the mean ± S.E., n=5. Data were obtained from five independent lines of primary hepatocytes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus isotonic condition.



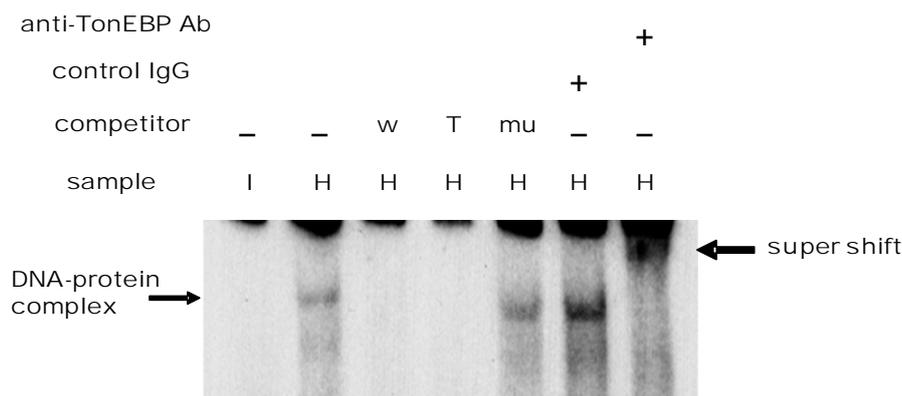
**Fig. 2. 5'-Flanking region necessary for transcriptional activation of CYP2E1 gene by hypertonic stimulation.** Luciferase assay driven on CYP2E1 promoter-reporter constructs [A; p2E1-1342, p2E1-586, p2E1-566 or p2E1-230, B; p2E1-586 or p-586mut, C; p4xTonE-SV40, D; SV40]. HepG2 cells were cotransfected with each promoter-reporter construct and pRL-TK and then cultured in isotonic or hypertonic media [NaCl 50 mM (N50) and 100 mM sucrose (S100)] for 24 h. Then, luciferase activities were measured. Underlines indicate consensus sequence of TonE. Data are shown as -fold of corresponding control cells cultured in isotonic medium and represent the mean  $\pm$  S.E., n=4. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 versus isotonic condition. Each experiment was repeated at least three times with independent cell preparations.

られた。一方、p2E1-566 と p2E1-230 においては、高浸透圧刺激による活性の変化は見られなかった。このことから、浸透圧応答配列の存在する -586 から -566 の間の配列が高浸透圧条件下でのプロモーターの活性化に必須であることが示唆された。さらに、浸透圧応答配列の塩基配列を変異させたプラスミド (p2E1-586mut) では、高浸透圧条件下でのレポーター活性の上昇が消失した (Fig. 2B)。また、TonE モチーフを4つ繋げたレポータープラスミドでは浸透圧負荷によって活性が上昇したが、TonE モチーフを含まないプラスミドでは活性上昇は見られなかった (Fig. 2C, D)。これらの結果から、高浸透圧条件下での CYP2E1 プロモーター活性の変化には TonE コンセンサス配列が必要不可欠であることが示された。

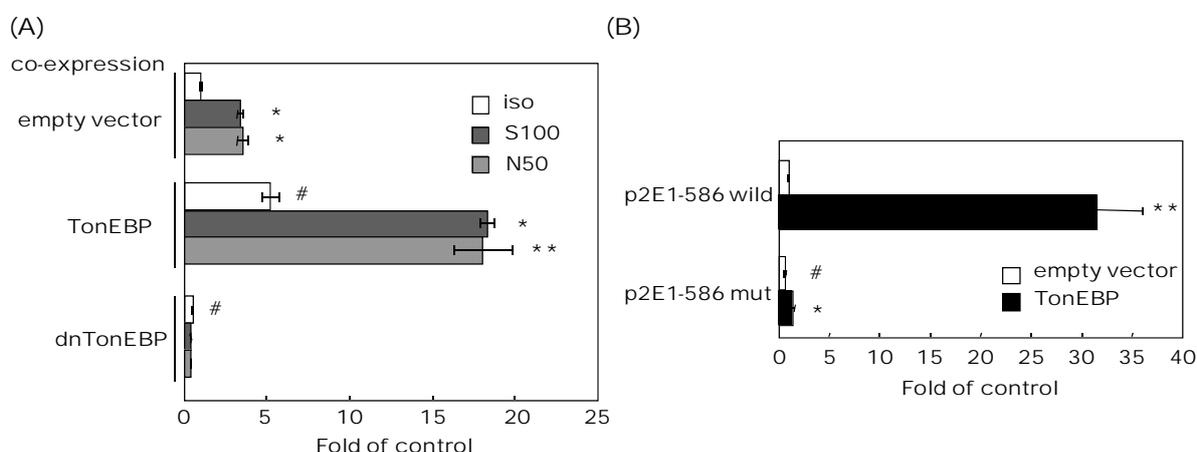
前述のように、転写因子 TonEBP は浸透圧応答配列に結合し、高浸透圧ストレス下において遺伝子発現を調節することが知られている。CYP2E1 プロモーター上の浸透圧応答配列に TonEBP タンパクが結合することを確かめるため、ゲルシフトアッセイを行った (Fig. 3)。HepG2 細胞の

核抽出物において DNA-タンパク複合体が認められ、高浸透圧条件下で培養した細胞の核抽出物で増加が見られた。この複合体はラベルしていないプローブや、既知の配列を有するオリゴヌクレオチド (タウリントランスポーター遺伝子プロモーター領域に存在する TonEBP 結合領域; Ito *et al.* 2004, 2007) とインキュベートすると競合したが、コンセンサス配列を変異させた、ラベルしていないオリゴヌクレオチドとは競合は見られなかった。DNA-タンパク複合体は抗 TonEBP 抗体とインキュベートしたことでスーパーシフトしたが、コントロール IgG ではシフトしなかったことから、複合体が TonEBP を含むことが示された。これらのことから、CYP2E1 遺伝子上流に存在する浸透圧応答モチーフは TonEBP の結合配列として機能し、また、高浸透圧刺激は CYP2E1 プロモーターに存在するモチーフへの TonEBP の結合を亢進することが示唆された。

次に、TonEBP が TonE モチーフを介して CYP2E1 のプロモーター活性を上昇させるかの検討を行った (Fig. 4)。TonEBP を発現ベクターにより過剰発現させると、浸透圧



**Fig. 3. TonEBP binds with TonE motif in CYP2E1 promoter.** Gel shift assay was performed with nuclear extract from HepG2 cells cultured in isotonic (I) or hypertonic (Suc100) (H) media and <sup>32</sup>P-labeled 2E1-TonE oligonucleotide. w, wild-type oligonucleotide; T, TonE motif encoded in 5'-flanking region of TauT gene (Ito *et al.* 2004); mu, mutant oligonucleotide.



**Fig. 4. Involvement of TonEBP on hypertonicity-induced activation of CYP2E1 promoter.** Effect of expression vector carrying wild-type or dominant-negative TonEBP on promoter activity driven on CYP2E1 promoter-reporter constructs. A, HepG2 cells were cotransfected with p2E1-1342 and pRL-TK, and each expression vector [pcDNA (100 ng/well), pCMV-TonEBP (1 ng/well), and pCMV-dnTonEBP (100 ng/well)] and cultured in isotonic (white bar) or hypertonic media (+50 mM NaCl, light gray bar; 100 mM sucrose, dark gray bar) for 24 h. B, HepG2 cells were transfected with reporter plasmids (p2E1-586 or p2E1-586mut) and expression vectors [pcDNA (100 ng/well), white bar; pCMV-TonEBP (100 ng/well), black bar] and cultured in isotonic medium for 24 h. Then, luciferase activities were measured. Data are shown as -fold of corresponding control cells cultured in isotonic medium and represent the mean ± S.E., n=4. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 versus isotonic condition; ##, p<0.01 versus pcDNA. Each experiment was repeated three times with independent cell preparations.

負荷による CYP2E1 プロモーターの活性を促進した。一方、dnTonEBP 発現ベクターとのコトランスフェクションにより、CYP2E1 プロモーター活性は等張時と高浸透圧時の両方において消失した。また、野生型 TonE モチーフを含むプロモーター領域のレポータープラスミド (p2E1-586) では、

TonEBP 発現ベクターとのコトランスフェクションにより等張条件下で活性が増大したが、変異型のプラスミド (p2E1-586mut) では、活性に変化は見られなかった。これらの結果から、TonEBP は浸透圧負荷による CYP2E1 の遺伝子発現誘導に必須であることが示された。

#### 4. 考 察

CYP450 活性は食事、絶食や病態生理など、環境的要因によって変化する。今回、薬物代謝酵素が浸透圧負荷により調節されるという仮説の元に検討を行い、CYP2E1 がヒト肝初代培養細胞において高食塩及び高浸透圧ストレスにより誘導されることを見出した。さらに、TonEBP が CYP2E1 のプロモーター領域に存在する浸透圧応答配列を介して CYP2E1 の誘導に関与していることが明らかとなった。今回の結果は、浸透圧による薬物代謝酵素の遺伝子発現調節という初めての知見を提示するものである。

TonEBP は、哺乳類細胞において osmoprotective 遺伝子の誘導を介して、浸透圧ストレスに対する細胞保護の役割を担っていることが示唆されている。例えば、TonEBP のドミナントネガティブ体により TonEBP を阻害すると、細胞機能が障害され、浸透圧ストレスへの感受性が亢進することが報告されている (Trama *et al.* 2002; Wang *et al.* 2005; Ito *et al.* 2007)。今回の検討より、TonEBP は CYP2E1 の発現調節を介し、肝臓において外因性の毒性物質の代謝を制御しているという新たな役割が推察された。CYP2E1 は、アルコール、アセトアミノフェン、脂質などのさまざまな外因性および内因性の低分子毒性物質の代謝に関与し (Caro and Cederbaum 2004)、外来異物に対する生体防御に重要な役割を果たしている。CYP2E1 が浸透圧ストレスにより転写活性化を受ける生理学的意義は明らかではないが、浸透圧ストレスにより増加する毒性物質を代謝するために CYP2E1 が誘導される可能性や、CYP2E1 による反応によって浸透圧調節物質が合成される可能性が考えられる。一方、CYP2E1 は外因性物質の酸化的代謝を担っており、過酸化物質の産生に寄与している。CYP2E1 による酸化ストレスの増大が発癌やアルコール性および非アルコール性肝障害などの発症に関与することが報告されており (Caro and Cederbaum 2004; Gonzalez 2005)、TonEBP が CYP2E1 誘導を介して肝障害の発症に関与している可能性も考えられる。高食塩及び高浸透圧ストレス下における CYP2E1 の役割について、今後のさらなる検討が必要である。

また、TonEBP は浸透圧ストレス以外にも免疫反応である細胞遊走や、アミノ酸欠乏、抗腫瘍薬であるドキシソルピシンなどによっても活性が変化することが知られており (Franchi-Gazzola *et al.* 2001; Jauliac *et al.* 2002; Ito *et al.*

2007)、何らかのシグナル分子による TonEBP の活性化が、CYP2E1 の機能亢進につながる可能性も考えられる。さらに、CYP2E1 はエタノールやアセトンなどの基質によって誘導を受けるという特性を持ち、その機序の一つとして mRNA の安定化が報告されているが (Gonzalez *et al.* 2006)、基質により TonEBP が活性化される可能性も十分に考えられ、今後さらに検討すべきと考える。

cDNA マイクロアレイでのスクリーニングにより、CYP1A1 や UGT2B4 もヒト肝初代培養細胞において浸透圧負荷で誘導されるという新たな事実が明らかとなった。モチーフ検索の結果、プロモーター領域の 5 kbp 以内には TonE モチーフが存在しなかった (CYP1A1: NT\_010194, UGT2B4: NT\_077444)。薬物代謝酵素のゲノム構造は複雑であり、遺伝子が転写開始地点から遠く離れたシスエレメントの関与を受ける可能性や、TonEBP 非依存的な機序により制御されている可能性も考えられる。これらの遺伝子の浸透圧ストレスによる転写活性化については、さらなる検討が必要である。

#### 5. 今後の課題

本検討での細胞実験による結果が、生体内における高食塩ストレス下の生体反応を反映したものであるかどうかを動物実験等により検証する必要がある。当初、ラットやマウス等の小動物において高食塩負荷による解析を試みる予定であった。しかし、ラット及びマウスのゲノム DNA をデータベース上で解析したところ、CYP2E1 遺伝子上流領域には浸透圧応答配列のコンセンサスモチーフやその周辺の配列が見つからなかったことから、これらの動物種においては本検討で確認された遺伝子発現の変動が見られないものと判断した。今後、高食塩ストレス下での CYP2E1 の生体内における生物学および病態生理学的意義を解明する上で、動物モデルにおける解析方法の確立が必要である。また、本検討において、CYP2E1 の他、CYP1A1 及び UGT2B4 が高食塩ストレスにより発現誘導されることを明らかにした。これらの発現調節に関わるシグナル経路の同定及び生物学的作用を解析することにより、細胞内に内在する高食塩及び高浸透圧ストレスに対する防御機構の解明が進むものと考えられる。

## 参考文献

- Burg MB, Kwon ED and Kultz D (1997) Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59: 437-455.
- Caro AA and Cederbaum AI (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:27-42.
- Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM and Burg MB (2001) Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:411-420.
- Franchi-Gozzola R, Visigalli R, Dall'asta V, Sala R, Woo SK, Kwon HM, Gazzola GC and Bussolati O (2001) Amino acid depletion activates TonEBP and sodium-coupled inositol transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1465-C1474
- Gonzalez FJ (2005) Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 569:101-110.
- Gonzalez FJ (2006) The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture CYP2E1. *Drug Metab Dispos* 35:1-8
- Ho SN (2006) Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *J Cell Physiol* 206:9-15.
- Ito T, Fujio Y, Hirata M, Takatani T, Matsuda T, Muraoka S, Takahashi K and Azuma J (2004) Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382:177-182.
- Ito T, Fujio Y, Takahashi K and Azuma J (2007) Degradation of NFAT5, a transcriptional regulator of osmotic stress-related genes is a critical event for doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 282:1152-1160
- Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A and Toker A (2002) The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology* 4:540-544
- Ko BC, Turck CW, Lee KW, Yang Y and Chung SS (2000) Purification, identification, and characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270:52-61.
- Kojima R, Randall JD, Ito E, Manshio H, Suzuki Y and Gullans SR (2004) Regulation of expression of the stress response gene, *Osp94*: identification of the tonicity response element and intracellular signalling pathways. *Biochem J* 380:783-794.
- Trama J, Go WY and Ho SN (2002) The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J Immunol* 169:5477-5488.
- Uesono, Y. and Toh-e, A. 2002. Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 16: 13848-13855.
- Wang Y, Ko BC, Yang JY, Lam TT, Jiang Z, Zhang J, Chung SK and Chung SS (2005) Transgenic mice expressing dominant-negative osmotic-response element-binding protein (OREBP) in lens exhibit fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks. *J Biol Chem* 280:19986-19991.
- Woo SK, Lee SD and Kwon HM (2002a) TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality. *Pflugers Arch* 444:579-585.
- Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK and Kwon HM (2002b) TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 22:5753-5760.

No. 0722

## Molecular Mechanism Underlying the High Salt Stress-Regulated Gene Expression of Drug-Metabolizing Enzymes

Takashi Ito, Tsuyoshi Fukuda, Shinpei Nonen, Yasushi Fujio, Junichi Azuma

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

### Summary

In this study, we evaluated the influence of high salt stress and hyperosmotic stress on the expression of drug-metabolizing enzymes in the cultured human hepatocyte. After the primary cultured human hepatocytes were exposed to the high salt or hypertonic media, cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP2E1 and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B4 were induced at RNA level. Furthermore, we identified the tonicity-response motif in the 5'-flanking region of CYP2E1, and revealed that this motif is related to the up-regulation of CYP2E1 genes through the interaction with tonicity response element binding protein (TonEBP). These novel findings indicate the possibility that hypertonic stress would influence the capacity of the drug metabolism in human liver, which may affect the therapeutic effect of drugs.