

核内レセプターconstitutive androstane receptor (CAR)の発現調節機構

2010 年

齊藤 公亮

目次	頁
略語一覧.....	4
緒言.....	5
第1章 ヒト <i>CAR</i> 遺伝子 5'上流領域における <i>LXRα</i> 応答配列の同定.....	7
第1節 序文	
第2節 実験材料および方法	
1-2-1 プラスミド	
1-2-2 レポータージーンアッセイ	
1-2-3 ゲルシフトアッセイ	
1-2-4 ChIP アッセイ	
第3節 実験結果	
1-3-1 <i>LXRα</i> 、 <i>FXR</i> および <i>PXR</i> によるヒト <i>CAR</i> 遺伝子プロモーターの活性化の検討	
1-3-2 ヒト <i>CAR</i> 遺伝子プロモーター上の <i>LXRα</i> / <i>RXRα</i> 応答配列の同定	
1-3-3 ヒト <i>CAR</i> DR5 配列に対する <i>LXRα</i> / <i>RXRα</i> の結合の検討	
第4節 考察	
第5節 小活	
第6節 図表	
第2章 ヒト <i>CAR</i> 遺伝子イントロン1領域における <i>RARα</i> 応答配列の同定....	18
第1節 序文	
第2節 実験材料および方法	
2-2-1 プラスミド	
2-2-2 レポータージーンアッセイ	
2-2-3 ゲルシフトアッセイ	
2-2-4 ChIP アッセイ	
2-2-5 ヒト初代培養肝細胞	
2-2-6 リアルタイム PCR	
第3節 実験結果	

2-3-1	ヒト <i>CAR</i> 遺伝子イントロン 1 領域における転写制御領域の検討	
2-3-2	ヒト <i>CAR</i> 遺伝子イントロン 1 領域における <i>RARα</i> 応答領域の同定	
2-3-3	ヒト <i>CAR</i> <i>RAR</i> 応答配列に対する <i>RARα/RXRα</i> の結合の検討	
2-3-4	オールトランスレチノイン酸が <i>CAR</i> の mRNA 量に与える影響	
第 4 節	考察	
第 5 節	小活	
第 6 節	図表	
第 3 章	<i>CAR</i> の発現量増加が <i>CAR</i> 標的遺伝子の発現量に与える影響.....	30
第 1 節	序文	
第 2 節	実験材料および方法	
3-2-1	試薬	
3-2-2	初代培養肝細胞	
3-2-3	リアルタイム PCR	
3-2-4	ウエスタンブロット	
3-2-5	RT-PCR	
第 3 節	実験結果	
3-3-1	<i>PPARα</i> アゴニストが <i>CAR</i> および <i>CYP2B1/2</i> の mRNA 量に与える影響	
3-3-2	シクロヘキシミドがシプロフィブラートによる <i>CYP2B1/2</i> の mRNA 量増加に与える影響	
3-3-3	シプロフィブラートによる全細胞および核における <i>CAR</i> タンパク量の変化	
3-3-4	オールトランスレチノイン酸が <i>CAR</i> 、 <i>CYP3A4</i> および <i>CYP2C8</i> の mRNA 量に与える影響	
第 4 節	考察	
第 5 節	小活	
第 6 節	図表	
総括.....		40
参考文献.....		41

主論文目錄.....	47
謝辭.....	48
主査、副査名.....	49

略語一覽

AhR	arylhydrocarbone receptor
CAR	constitutive androstane receptor
CYP	cytochrome P450
FXR	farnesoid X receptor
GR	glucocorticoid receptor
hGUS	human β -glucronidase
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 alpha
LXR	liver X receptor
MDR1	multidrug resistance 1
MRP2	multidrug resistance protein 2
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPAR α	peroxisome proliferator activated receptor alpha
PXR	pregnane X receptor
RXR	retinoid X receptor
SRE	sterol regulatory element
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein 1c
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

緒言

Constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3)は核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子であり、肝に多く発現している[1]。CAR は細胞内において主に細胞質に存在し、シャペロンタンパクである heat shock protein 90、および cytosolic CAR retention protein と、複合体を形成している[2、3]。これまでに、数多くの天然物および合成化合物が、CAR の活性を変化させると報告されており[4]、活性化された CAR は細胞質から核内へ移行する[5]。核へ移行した CAR は、retinoid X receptor (RXR)とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上の CAR/RXR 応答配列に結合し、コアクチベーターを誘引することにより遺伝子の転写を活性化する[6]。これまでに、CAR/RXR 応答配列はヒトチトクローム P450 (CYP) 2B6、ラット CYP2B1/2 およびマウス CYP2B10 をはじめとして、CYP3A4、CYP2C8、UDP-グルクロン酸抱合酵素 1A1 (UGT1A1)、硫酸抱合酵素(SULT2A1)などの薬物代謝酵素および P-糖タンパク、multidrug resistance associated protein 2 などの薬物トランスポーターをコードする遺伝子のプロモーター上に同定されている[7-10]。これらのことから、CAR の活性化は薬物動態に影響を与える大きな要因といえる。

一方、CAR はアゴニスト非存在下においても、核内に移行することが可能であれば転写活性化作用を示すことから、CAR 自身の発現量が薬物動態関連遺伝子の発現量に影響を与えると考えられている。例えば、ヒト肝試料において CAR の mRNA 量と CAR 標的遺伝子である *CYP2A6*、*CYP2B6*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*UGT1A1* および *MRP2* の mRNA 量が正の相関を示すことが報告されている[11]。また、CAR ノックアウトマウスでは代表的な CAR 標的遺伝子である *CYP2B10*の mRNA 量が野生型と比べて減少している[12]。これらのことから、CAR の活性化だけでなく CAR の発現量の変動が CAR 標的遺伝子の転写制御に関与していると考えられる。しかしながら、CAR 自身の発現量増加による CAR 標的遺伝子の発現への影響は明らかになっていない。

さらに、代表的な CAR アクチベーターであるフェノバルビタールや、CAR アゴニストである 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP)による CYP2B の誘導は CAR の発現量増加により増強されることも報告されている[13-15]。すなわち、ヒト初代培養肝細胞において認められるフェノバルビタールによる CYP2B6 の誘導は CAR の発現量を転写レベルで増加させるデキサメ

タゾン(glucocorticoid receptor、GR アゴニスト)により増強する[13]。また、マウスにおいて認められる TCPOBOP による CYP2B10 の誘導は CAR の発現量を増加させる β -ナフトフラボン(arylhydrocarbonyl receptor、AhR アゴニスト)により増強する[14]。このように、CAR の発現量増加は CAR を活性化する化合物による薬物動態の変動を増強する要因であると考えられる。したがって、CAR 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、薬物動態を予測する上で重要な情報になると考えられる。しかしながら、CAR 遺伝子の発現調節機構についての報告は限られており、ヒト CAR 遺伝子の転写開始点より上流領域に GR と hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)の応答配列[13、16]、マウス CAR 遺伝子の転写開始点より上流領域に HNF4 α の応答配列[17]、ラット CAR 遺伝子の転写開始点より上流領域に peroxisome proliferators activated receptor alpha (PPAR α)応答配列が同定されたのみである[15]。

そこで本研究では、ヒト CAR 遺伝子の発現調節に関わる新たな転写因子を同定すること(第 1 章、第 2 章)および CAR 自身の発現量増加による CAR 標的遺伝子の発現への影響を明らかにすること(第 3 章)を目的とし、以下の検討をおこなった。

第1章 ヒト *CAR* 遺伝子 5'上流領域における *LXRα*応答配列の同定

第1節 序文

これまでに *CAR* 遺伝子の発現を転写レベルで制御すると報告されている *GR*、*HNF4α*および *PPARα*は、*CYP*をはじめとする薬物動態関連遺伝子の転写制御因子でもある[18-20]。また、*CYP1A*の誘導に関与する *AhR*も、*CAR*の発現制御における寄与が示唆されている[21]。これらのことから、*CAR*遺伝子の転写制御は薬物動態関連遺伝子の転写制御因子と関連があると考えられる。そこで本章では、薬物動態関連遺伝子の代表的な転写制御因子のうち、これまでに *CAR* 遺伝子の発現制御との関連性が検討されていない liver X receptor (*LXR*)、farnesoid X receptor (*FXR*)および pregnane X receptor (*PXR*)について、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーターに対する活性化作用の有無を検討した。

上記の検討により *LXR* がヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化することが明らかとなったため、次に *LXR* によるヒト *CAR* 遺伝子の転写制御機構を検討した。*LXR* は核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子であり、*LXRα*と *LXRβ*の2つのサブタイプが存在する[22]。肝臓には *LXRα*が主に発現しており、コレステロールのホメオスタシスに大きく関与している[23]。*LXRα*は *CAR*と同様に *RXR*とヘテロダイマーを形成し、*LXRα/RXR* 応答配列に結合することで標的遺伝子の転写を制御している。そこで、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーターにおける *LXRα/RXR* 応答配列を同定することを目的として以下の検討をおこなった。

第2節 方法

1-2-1 プラスミド

ヒト *CAR* 遺伝子の転写開始点より約 2 kb 上流のプロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターベクター(*CAR* -2312/+58)は、以下のように作製した。まず、既に報告されている転写開始点を+1として[13]、-2312 bp から+58 bp の領域を、以下のプライマーを用いて、ヒトゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により増幅した (5'-CTCTTTCAAAGTTTCCTGATGGACTC-3' and

5'-CCAAACTCCCACGCTGTTGCTGGTTTCC-3')。増幅産物は PCR-BluntII-TOPO ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてクローニングし、制限酵素 KpnIおよび XhoIを用いて pGL4.17 ベクター(Promega, Madison, WI, USA)へ組み換えた。

異なる長さのヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼレポーターベクター(CAR -619/+58、CAR -99/+58 および CAR -40/+58)は、以下のように作製した。まず、以下のプライマーを用いてそれぞれの領域を CAR -2312/+58 を鋳型として PCR 法により増幅した (5'-CCTGGACCTCAGCCTCCCAATTAGC-3' for CAR -619/+58, 5'-CTGGTACCAGGGTCTGTGCCCTAACC-3' for CAR -99/+58 or 5'-AAGGTACCATCTCTTGTTCCTCCAGA-3' for CAR -40/+58, and 5'-CCATGGTGGCTTTACCAACAGT-3' for common)。増幅産物は制限酵素 KpnIおよび XhoIを用いて pGL4.17 ベクターへ組み換えた。

CAR -2312/+58 に対して-69/-53 bp に存在する direct repeat 5 (DR5)配列に変異を導入した CAR -2312/+58 mt は以下のプライマーを用いて CAR -2312/+58 を鋳型として部位特異的変異導入法を用いて作製した (5'-AGGCTCCATAAAACAGACATCTCTTG-3' and 5'-CCAGGTAGTCTCAGTGAAGTGTGGGGT-3')。

LXR α 、FXR、PXR および RXR α 発現ベクターはそれぞれをコードする領域を pTarget ベクター(Promega)組み込んだものを使用した[24-26]。

1-2-2 レポータージーンアッセイ

レポータージーンアッセイはヒト肝ガン由来細胞 HepG2 細胞を用いておこなった。HepG2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)に 10 %非働化ウシ胎児血清(Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA)および 50 units/mL penicillin-50 μ g/mL streptomycin (Invitrogen)を加えた培地を用いて、37 C $^{\circ}$ 、5 % CO $_2$ の条件下で培養した[27]。レポーターベクター(50 ng/well)、核内レセプター発現ベクター(10 ng/well)およびコントロールベクター(pGL4.74, 5 ng/well)は、リバーストランスフェクション法により HepG2 細胞(1.6×10^5 cells/well, 48-well プレート)に導入した。細胞の播種から 24 時間後に LXR α アゴニストである T0901317 (1 μ M; Calbiochem, Darnstadt,

Germany)、FXR アゴニストであるケノデオキシコール酸(10 μ M; Sigma, St. Louis, MO, USA)および PXR アゴニストであるリファンピシン(10 μ M; Wako, Osaka)を添加した。アゴニスト添加から 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase reporter assay system (Promega)により測定した。なお、ルシフェラーゼ活性はサンプルベクターである pGL4.17 の firefly luciferase 活性をコントロールベクターである pGL4.74 の renilla luciferase 活性の比として補正することにより求めた。

1-2-3 ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) によって放射ラベルした 2 本鎖 DNA プローブと TnT Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega)を用いたインビトロトランスレーション法により合成したタンパクを用いて、既報のとおりおこなった[28]。プローブに用いたコンセンサス DR4 配列(cDR4)およびヒト *CAR* 遺伝子 DR5 配列(hCARDR5)のセンス鎖 DNA 配列は以下のとおりである (5'-ATCAGGTCATCGAAGGTCAGAT-3' for cDR4 and 5'-ACAGTCACTGAGAGCAACTGGAGGCCACAT-3' for hCARDR5)。スーパースhiftアッセイには抗 LXR α 抗体(1 μ g; Perseus Proteomix, Tokyo)を用いた。

1-2-4 ChIP アッセイ

ヒト肝試料(35 歳、ヒスパニック、女性)は National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA, USA)を介して米国から輸入されたヒト肝組織を HAB 研究機構(Chiba)により供与していただいたものを使用した。本実験によるヒト試料の利用は千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会において事前に承認されている(千大薬総第 396 号)。

ChIP アッセイは、ChIP-IT キット(Active Motif, Carlsbad, CA, USA)および前述のヒト肝試料を用いて既報のとおりにおこなった[28]。抗体は抗 LXR α 抗体(1 μ g)を用いた。回収した DNA 断片を鋳型とし、ヒト *CAR* 遺伝子 DR5 配列を含む領域(-160/+58)およびそれと無関係の 5'上流側の領域(-4500/-4300)を以下のプライマーを用いて増幅した (5'-CACCAACCGCACTTTTGTCA-3' and 5'-CCAAACTCCCACGCTGTTGCT-3' for -160/+58, and

5'-GAGCAGGGAGAATAATTGAATA-3' and
5'-CTGCTGTCTTCTCCCAGATACA-3' for -4500/-4300)。

第3節 結果

1-3-1 LXR α 、FXR および PXR によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化の検討

HepG2 細胞を用いたレポータージーンアッセイにより、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター(CAR -2312/+58)の活性化に対する LXR α 、FXR および PXR の影響を検討した。Fig. 1A に示すように、検討した3種の核内レセプターのうち LXR α のみがヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化した。

LXR α は RXR とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子に存在する LXR α 応答配列に結合することにより転写を制御することから、次に LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化に対する RXR 共発現の影響を調べた。その結果、Fig. 1B に示すように、LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は T0901317 によって増強され、RXR α を共発現させた場合にはさらに増強された。

1-3-2 ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の LXR α /RXR α 応答配列の同定

LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化を担う領域を同定するために、5'上流側を段階的に欠失させたヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを用いて LXR α /RXR α による活性化を検討した。Fig. 2A に示すように、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は3種類のヒト *CAR* プロモーター(CAR -2312/++58、CAR -619/+58 および CAR -99/+58)において認められた。しかしながら、LXR α /RXR α による活性化はヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の -99 bp から -40 bp を欠失させた最も短いヒト *CAR* 遺伝子プロモーター(CAR -40/+58)では認められなかった。また、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の -619 bp から -99 bp の領域を欠失させることにより、LXR α /RXR α の存在下および非存在下のいずれにおいてもヒト *CAR* 遺伝子のプロモーター活性が低下した。

LXR α /RXR α は DR4 配列を主な応答配列とし、DR4 配列に対して強く結合す

ること[29]、および DR4 と比べると比較的弱い DR5 配列に対しても結合することが報告されている[30]。そこで、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の -99 bp から -40 bp の領域について DR4 配列および DR5 配列を調べた。Fig. 2B に示すように、-69 bp から -53 bp に DR5 配列が 1 つ存在した。しかしながら、-99 bp から -40 bp の領域内に DR4 配列は存在しなかった。

次に、今回見いだされたヒト *CAR* DR5 配列が LXR α /RXR α の応答配列であるかどうかを明らかにするために、ヒト *CAR* DR5 配列に対して変異を導入したヒト *CAR* 遺伝子プロモーター(CAR -2312/+58 mt)を用いて、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーター活性化作用への影響を検討した。Fig. 2C に示すように、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの LXR α /RXR α による活性化作用は、変異を導入することにより 36.0 倍から 10.6 倍へと大きく減少した。

1-3-3 ヒト *CAR* DR5 配列に対する LXR α /RXR α の結合の検討

ゲルシフトアッセイにより、インビトロにおけるヒト *CAR* DR5 配列に対する LXR α /RXR α の結合を検討した。まず、インビトロ合成した LXR α および RXR α の結合能を確認するために、コンセンサス DR4 配列(cDR4)をプローブとして検討をおこなった。Fig. 3A に示すように、LXR α /RXR α 依存的なシフトバンド(s.)が形成された(lane 2)。そこで、ヒト *CAR* DR5 配列(hCARD5)をプローブとして検討をおこなったところ、LXR α または RXR α の単独存在下およびどちらにも存在しない場合にはシフトバンドが認められなかったが(lane 3-5)、LXR α および RXR α の共存下においてはシフトバンドが認められた(lane 6)。さらに、抗 LXR α 抗体を用いてスーパーシフトアッセイをおこなったところ、hCARD5 および cDR4 のどちらにおいても、LXR α /RXR α 依存的なシフトバンドは抗 LXR α 抗体によってスーパーシフトすることが認められた(lane 7-12)。

つぎに、ChIP アッセイにより、ヒト肝組織においてもヒト *CAR* DR5 配列に対して LXR α /RXR α が結合しているか否かについて検討した。Fig. 3B に示すように、抗 LXR α 抗体によって沈降した DNA 断片において、ヒト *CAR* DR5 配列を含む領域(-160/+58)の増幅が確認された。一方、コントロール抗体によって沈降した DNA 断片においてはヒト *CAR* DR5 配列を含む領域の増幅は認められなかった。また、ヒト *CAR* DR5 配列とは無関係の 5' 上流領域(-4500/-4300)は抗 LXR α 抗体およびコントロール抗体によって沈降した DNA 断片どちらにおいても

も増幅は認められなかった。

第4節 考察

本章では、ヒト肝ガン由来細胞である HepG2 細胞を用いたレポータージーンアッセイにより、LXR α がヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化すること、およびその活性化はヘテロダイマーパートナーである RXR α によって増強されることを明らかにした(Fig. 1)。また、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化には、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-69 bp から-53 bp に存在するヒト *CAR* DR5 配列が関与することを明らかにした(Fig. 2)。さらに、ヒト *CAR* DR5 に対して、LXR α /RXR α がインビトロおよびインビボにおいて結合することを明らかにした(Fig. 3)。これらのことから、LXR α は RXR α とヘテロダイマーを形成し、ヒト *CAR* DR5 配列に対して結合することで、ヒト *CAR* 遺伝子の転写を活性化することが示唆された。

また今回の検討により、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-619 bp から-99 bp の領域を欠失させることで、ヒト *CAR* 遺伝子のプロモーター活性および LXR α /RXR α による活性化作用の両方が、大きく減少することが示された(Fig. 2A)。このことから、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-619 bp から-99 bp の領域に、ヒト *CAR* 遺伝子のプロモーター活性に関わる転写因子の応答配列が存在する可能性が考えられた。これまでに、*CYP7A1*をはじめ、数多くのコレステロールのホメオスタシスに関わる遺伝子のプロモーター上に、LXR α /RXR α 応答配列が同定されている [29]。これらの遺伝子のうち、*CYP7A1*、*apolipoprotein A1* および *sterol regulatory element binding protein 1c* (*SREBP-1c*) 遺伝子に関しては、*CAR* 遺伝子と同様に、HNF4 α の結合配列も同定されている [31-33]。また、これらの報告では、いずれの遺伝子プロモーターも HNF4 α を共発現させることで、LXR α によるプロモーターの活性化作用が増強することが示されている。ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-619 bp から-99 bp の領域には、HNF4 α 結合配列(-118/-106)が含まれていることから [16]、ヒト *CAR* 遺伝子についても同様に LXR α によるプロモーターの活性化に対して HNF4 α による増強作用が引き起こされる可能性が考えられる。したがって、LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子の転写制御に対する HNF4 α の増強作用の有無についても検討する必要がある。

本章において、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-69 bp から-53 bp の領域に存在するヒト *CAR* DR5 配列を LXR α /RXR α 結合配列として同定した。このヒト *CAR* DR5 配列以外に、DR4 および DR5 配列はヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-99 bp から-40 bp の領域には存在しなかった。一方、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は、ヒト *CAR* DR5 配列に対して変異を導入したことにより大きく減少したものの、完全には消失しなかった(Fig. 2C)。この原因として、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化には、1)ヒト *CAR* DR5 配列以外の領域を介した LXR α による活性化機構が存在する、2)LXR α /RXR α 結合配列を介した LXR α /RXR α の直接的な活性化作用だけでなく、間接的な活性化作用が存在する可能性が考えられた。LXR α は脂質合成関連遺伝子の転写制御因子である SREBP-1c を誘導する[34]。誘導された SREBP-1c は、sterol regulatory element (SRE)と呼ばれる配列に対して結合し、転写を活性化する[35]。SRE はこれまでに数多く報告されているが、そのうち、*HMG-CoA synthase* 遺伝子プロモーターに存在する SRE (CTCACCCCAC)と非常に良く類似した、SRE 様配列がヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上の-87 bp から-78 bp に存在する(CTAACCCCAC)。したがって、LXR α /RXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は、LXR α /RXR α 結合配列を介した直接的な活性化に加え、LXR α によって誘導された SREBP-1c による SRE 様配列を介した間接的な活性化によって引き起こされる可能性も考えられる。今後、LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子の転写活性化機構に関しては LXR α /RXR α によるヒト *CAR* DR5 配列以外の領域を介した活性化作用、および SREBP-1c を含む LXR α によって誘導される転写因子による活性化作用の可能性についても検討する必要がある。

本章における結果は、ヒト *CAR* 遺伝子が LXR α の標的遺伝子の 1 つであることを示唆している。LXR α はコレステロールのホメオスタシスに大きく関与しており、生体内のコレステロール過剰時に合成されるオキシステロールをアゴニストとして活性化することで、標的遺伝子の転写を調節している[36]。実際に、コレステロール含有食を与えた LXR α ノックアウトマウスでは、肝臓内にコレステロールが蓄積することが明らかになっている[23]。一方、*CAR* は主に薬物代謝酵素などの薬物動態関連遺伝子の転写制御に関与しているが、このうち CYP3A、SULT2A1 および MRP2 は、コレステロールの主要代謝経路である胆汁酸の代謝排泄に関わっている[37、38]。このことから、*CAR* はこれらの遺伝

子を転写制御することで、コレステロールのホメオスタシスに関与している可能性が考えられる。また、詳細なメカニズムは明らかではないが、マウスに **CAR** アゴニストである **TCPOBOP** を投与することにより、血漿中におけるコレステロールレベルが低下することが報告されている[39、40]。これらのことから、**LXR α** による **CAR** の転写制御は、胆汁酸の代謝排泄を介して、コレステロールのホメオスタシスの一部を担っている可能性が考えられた。

現在のところ、**LXR α** アゴニストは医薬品として用いられてはいないが、**LXR α** アゴニストである **T0901317** は、アテローム性動脈硬化に対して有効であることが、マウスモデルを用いて明らかにされている[41]。このことから、**LXR α** は新たな創薬のターゲットとして考えられている。今回の検討により、**LXR α** はヒト **CAR** 遺伝子のプロモーターを活性化することが明らかになったことから、**LXR α** アゴニストを医薬品として開発する際には、**CAR** を介した薬物動態関連遺伝子の発現変動と、それにともなう併用薬の動態への影響を考慮する必要があると考えられた。

第5節 小括

本章では、ヒト **CAR** 遺伝子の **LXR α** による転写制御機構について検討をおこない以下の結果を得た。

1. **LXR α** はヒト **CAR** 遺伝子プロモーターを活性化し、その活性化は **RXR α** によって増強された。
2. **LXR α** によるヒト **CAR** 遺伝子プロモーターの活性化には-69 bp から-53 bp に存在するヒト **CAR DR5** 配列が関与していた。
3. **LXR α** は **RXR α** とヘテロダイマーを形成しヒト **CAR DR5** 配列に対して結合した。

以上より、**LXR α** はヒト **CAR** 遺伝子プロモーター上の-69 bp から-53 bp に存在するヒト **CAR DR5** 配列に、**RXR α** とヘテロダイマーを形成して結合することで、ヒト **CAR** 遺伝子プロモーターを活性化することが示唆された。

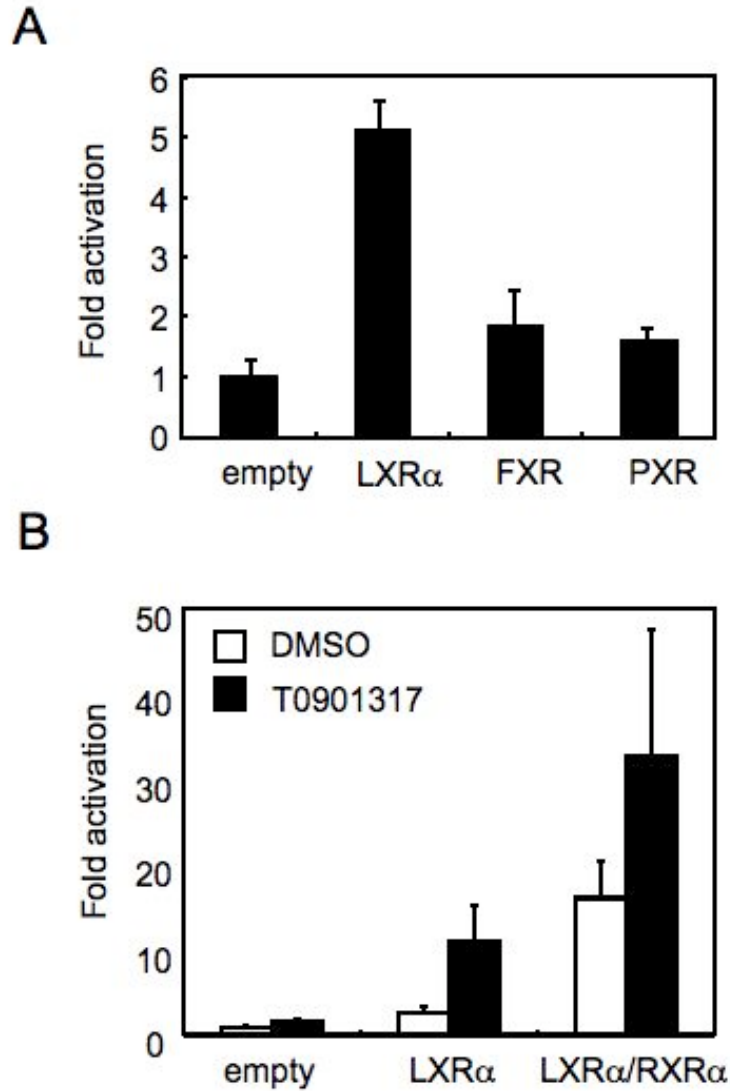


Fig. 1 Effects of LXR α , FXR and PXR on the activation of human *CAR* promoter in HepG2 cells. Expression vectors for LXR α , FXR, PXR and RXR α were co-transfected with CAR -2312/+58 into HepG2 cells. Cells were treated with T0901317 (LXR α ; 1 μ M), chenodeoxycholic acid (FXR; 10 μ M) and rifampicin (PXR; 10 μ M). Data were expressed as fold induction normalized by the luciferase activity of CAR -2312/+58 without expression vector. This experiment was performed at least three times and mean $\pm$ S.D. was conferred as error bar.

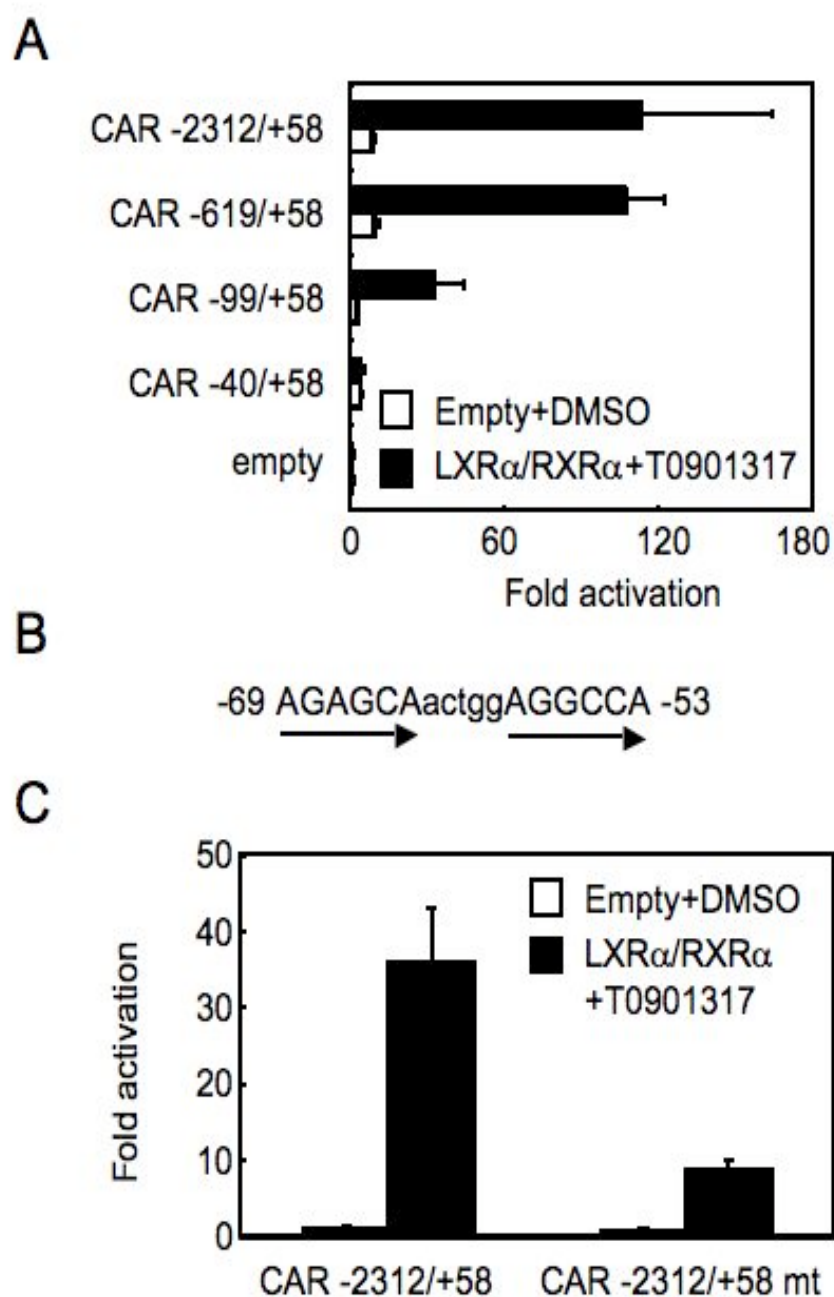


Fig. 2 Identification of LXRα/RXRα response element on the human *CAR* promoter. A, C, Expression vectors for LXRα and RXRα were co-transfected with various *CAR* promoter construct into HepG2 cells. Cells were treated with T0901317 (1 μM). Data were expressed as fold induction normalized by the luciferase activity of pGL4.17 empty vector. These experiments were performed at least three times and mean ±S.D. was conferred as error bar. B, The nucleotide sequences of human *CAR* DR5 site.

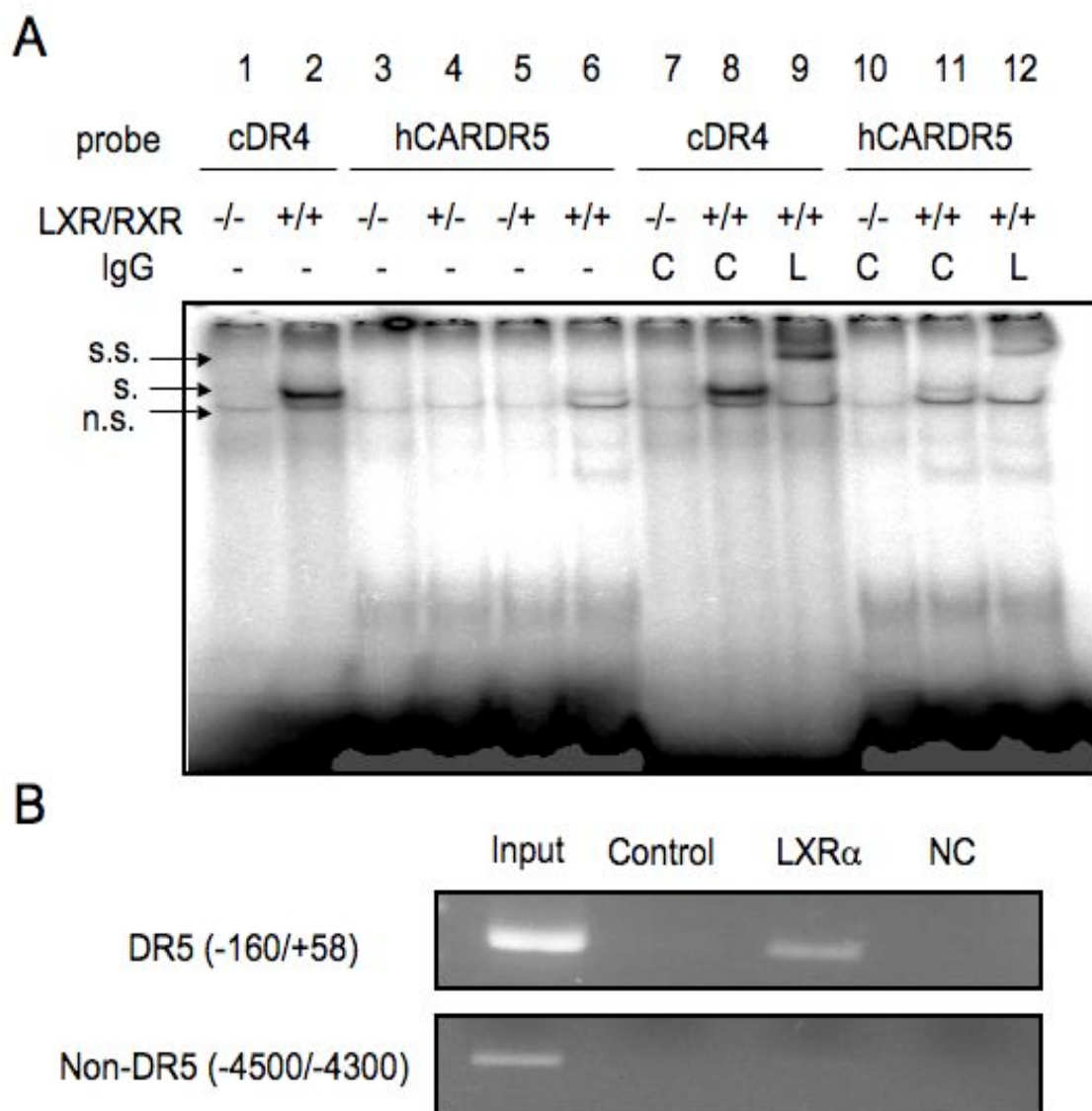


Fig. 3 Binding of LXR α /RXR α to the human CAR DR5. A, Gel mobility shift assay was performed to examine binding of LXR α /RXR α to the human CAR DR5. The lower arrow indicated as n.s. shows the non-specific band, the middle band indicated as s. shows the LXR α /RXR α heterodimer-dependent shifted band and the upper band indicated as s.s shows the supershifted band of LXR α /RXR α heterodimer and LXR α antibody complex. IgG described C stands for control IgG and L stands for LXR α antibody. B, ChIP assay was performed to examine binidng of LXR α to the human CAR DR5 in the human liver. Input indicates DNA of control sheared genomic DNA, Control indicates DNA of precipitated with control IgG, LXR α indicates DNA of precipitated with LXR α antibody, and NC indicates non DNA sample.

第2章 ヒト *CAR* 遺伝子イントロン1領域における *RAR* α 応答配列の同定

第1節 序文

第1章において、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーター上に、*LXR* α 応答配列が存在することが明らかとなった。すでに、*GR* および *HNF4* α が、それぞれヒト *CAR* 遺伝子の 5'上流遠位および近位領域を介して、転写制御に関与していることが報告されている[13、16]。一方、遺伝子の転写制御に関する研究は転写開始点より上流側に関して数多く報告されているが、*FXR* によるマウス *PXR* 遺伝子の転写制御のように転写開始点の下流側であるイントロン1も、遺伝子の転写制御に関わることも報告されている[42]。しかしながら、イントロン1領域を介したヒト *CAR* 遺伝子の転写制御は明らかになっていない。そこで、本章では、ヒト *CAR* 遺伝子のイントロン1領域における転写制御について検討した。

第2節 方法

2-2-1 プラスミド

転写開始点より上流-317 bp からイントロン1を含む、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーターのルシフェラーゼレポーターベクター(*CAR* -317/+1579)は、以下のよう¹に作製した。まず、-317 bp から+1579 bp の領域を用いて、ヒトゲノム DNA を 鋳 型 と し て PCR 法 に よ り 増 幅 し た (5'-CTCTCTCTCTCTCTTCCCAGCTTGTTTCAG-3' and 5'-GGTGGCTGTCACAGACTCCTGAATGT-3')。増幅産物は、PCR-BluntII-TOPO ベクターを用いてクローニングし、制限酵素 *Kpn*Iおよび *Xho*Iを用いて、pGL4.17 ベクターへ組み換えた。

異なる長さのイントロン1を一部含む、*CAR* 遺伝子プロモーターのルシフェラーゼレポーターベクター(*CAR* +1009/+1579、*CAR* +1386/+1579 および *CAR* +1501/+1579)は、以下のように作製した。まず、以下のプライマーを用いて、*CAR*-317/+1579 を 鋳 型 と し て、PCR 法 に よ り 増 幅 し た (5'-AAGGTACCATCCTGGTGTGGTGGT-3' for *CAR* +1009/+1579, 5'-GTGGTACCGCAAGAACTTGTGTCA-3' for *CAR* +1386/+1579 or 5'-ACGGTACCGAAGGGACAGAAAGG for *CAR* +1501/+1579, and

5'-CCATGGTGGCTTTACCAACAGT-3' for common)。増幅産物は制限酵素 KpnIおよび XhoIを用いて pGL4.17 ベクターへ組み換えた。

CAR -317/+1579 に対して+1453 bp から+1469 bp に存在するヒト CAR RAR 応答配列に変異を導入した CAR -317/+1579 mt は以下のプライマーを用いて CAR -317/+1579 を鋳型として部位特異的変異導入法を用いて作製した (5'-TAACGCCAGGGAAGTAGTCATCGGCATGGTTTGGT-3' and 5'-TCCCTGGCGTTATCTTTTGTGGTTTC-3')。

RAR α 発現ベクターは以下のように作製した。まず、RAR α をコードする領域を、以下のプライマーを用いて、ヒト肝から合成した CDNA を鋳型として、PCR 法により増幅した (5'-CCGCTTGGCATGGCCAGCAACAGCA-3' and 5'-TGTCCATGTGGCGTGGGCGGTCACG-3')。増幅産物は、PCR-BluntII-TOPO ベクターを用いてクローニングし、制限酵素 BamHIおよび NotIを用いて、pTarget ベクターへ組み換えた。

2-2-2 レポータージーンアッセイ

レポータージーンアッセイは、RAR α アゴニストとしてオールトランスレチノイン酸(1 μ M; Wako)を用いた以外は、第 1 章と同様におこなった。

2-2-3 ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、プローブとして RAR β 遺伝子の RAR 応答配列 (β RARE)およびヒト CAR RAR 応答配列(cRARE)を用いた以外は、第 1 章と同様におこなった。 β RARE および cRARE のセンス鎖 DNA 配列は、以下のとおりである (5'-TAGGGTTCACCGAAAGTTCACTC-3' for β RARE and 5'-CAGGGATCAAGTCAAGGGCATGT-3' for cRARE)。また、スーパーシフトアッセイには、抗 RAR α 抗体(1 μ g; Perseus Proteomix)を用いた。

2-2-4 ChIP アッセイ

ヒト肝試料(35 歳、ヒスパニック、女性)は、第 1 章と同じ方法で入手した。ChIP アッセイは抗 RAR α 抗体(1 μ g)を用い、以下の領域を増幅した以外は、第

1 章と同様におこなった。回収した DNA 断片中のヒト CAR RAR 応答領域を含む領域(+1381/+1521)およびそれと無関係の 5'上流側の領域(-4027/-3790)は、以下のプライマーを用いて検出した(5'-ACAGAGCAAGAACTTGTGTCA-3' and 5'-TTGACCCTTTTCTGTCCCTTC-3' for +1381/+1521, and 5'-TAACCCTGAAAGCCTGTTTACCATGGATGC-3' and 5'-TGGTCCAGGGATGCCCTTCAC-3' for -4027/-3790)。

2-2-5 ヒト初代培養肝細胞

ヒト初代培養肝細胞(35 歳、ヒスパニック、女性)は、第 1 章で使用したものと同一ヒト肝試料から調製されたものを用いた。本実験に用いたヒト試料の利用は、千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会において事前に承認された(千大薬総第 396 号)。ヒト初代培養肝細胞は、コラーゲンタイプIでコートされた 6 ウェルプレートに、 8×10^5 cells/well の細胞濃度で播種した。培地は、William's E 培地を基礎培地として、10 %非働化ウシ胎児血清、10 nM デキサメタゾン、100 $\times$ ITS-X (Invitrogen)、4 mM グルタミンおよび 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加したものを用いた。細胞の播種から 4 時間培養後に、培地を前述の William's E 培地から、10 %非働化ウシ胎児血清を含まない培地に交換した。培地交換から 16 時間後に、オールトランスレチノイン酸を添加し、48 時間培養した。

2-2-6 リアルタイム PCR

オールトランスレチノイン酸(1 μ M)を、48 時間処理したヒト初代培養肝細胞より、全 RNA を抽出し、逆転写をおこなった。得られた cDNA を鋳型として、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、リアルタイム PCR をおこなった。CAR の mRNA 量は、TaqMan Gene Expression Assays (CAR, Hs_00901571_m1; Applied Biosystems)を用い、human β -glucuronidase (hGUS)の mRNA 量は、TaqMan Assay reagents (hGUS; Applied Biosystems)を用いて検出した。

第 3 節 結果

2-3-1 ヒト *CAR* 遺伝子イントロン 1 領域における転写制御領域の検討

HepG2 細胞を用いたレポータージーンアッセイにより、異なる長さのイントロン 1 領域を含むレポーターベクターを用いて、ヒト *CAR* 遺伝子のプロモーター活性を比較した。Fig. 4 に示すように、転写開始点より上流域を含むレポーターベクター(*CAR* -317/+1579)を用いた時に、最も高い活性が認められた。また、-317 bp から+1386 bp を欠失させたイントロン 1 領域のみのレポーターを用いた場合にも、最大活性の約 66 %の活性が認められた。一方、+1386 bp から+1501 bp の領域を欠失させた場合には、ほとんど活性が認められなかった。

2-3-2 ヒト *CAR* 遺伝子イントロン 1 領域における *RAR* α 応答領域の同定

ヒト *CAR* 遺伝子イントロン 1 領域の+1386 bp から+1501 bp の領域について、転写調節因子結合配列予測プログラム Genomatix (www.genomatix.de/; Genomatix, Ann Arbor, MI, USA)を用いて、転写因子結合配列を検索したところ、+1453 bp から+1469 bp に、*RAR* β 遺伝子プロモーターに存在する *RAR* 応答配列に類似した配列(ヒト *CAR* *RAR* 応答配列)が存在した(Fig. 5A)。

そこで、*RAR* α がイントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化するかを調べた。Fig. 5B に示すように、*RAR* α およびオールトランスレチノイン酸によって、イントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーターが活性化された。つぎに、ヒト *CAR* *RAR* 応答配列が *RAR* α の応答配列であるか否かを明らかにするために、ヒト *CAR* *RAR* 応答配列に対して変異を導入したイントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーター(*CAR* -317/+1579 mt)を用いて *RAR* α によるプロモーター活性化作用への影響を検討した。Fig. 5B に示すように、*RAR* α によるイントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は、変異を導入したことにより 5.2 倍から 2.4 倍へと大きく減少した。また、ヒト *CAR* *RAR* 応答配列に対して変異を導入することで、*RAR* α の非導入時においても、イントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーター活性が 40 % 減少した。

2-3-3 ヒト *CAR* *RAR* 応答配列に対する *RAR* α /*RXR* α の結合の検討

ゲルシフトアッセイにより、インビトロにおけるヒト CAR RAR 応答配列に対する RAR α /RXR α の結合を検討した。まず、インビトロ合成した RAR α の結合能を確認するため、RAR β 遺伝子 RAR 応答配列(β RARE)をプローブとして検討をおこなった。Fig. 6A に示すように、RAR α /RXR α 依存的なシフトバンドが形成された(lane 2)。そこで、ヒト CAR RAR 応答配列(cRARE)をプローブとして検討をおこなったところ、RAR α または RXR α 単独およびどちらも存在しない場合にはこのシフトバンドは認められなかったが(lane 3-5)、RAR α および RXR α の共存下においてはシフトバンドが形成された(lane 6)。さらに、抗 RAR α 抗体を用いてスーパーシフトアッセイをおこなったところ、cRARE および β RARE どちらにおいても、RAR α /RXR α 依存的なシフトバンドは、抗 RAR α 抗体によってスーパーシフトすることが認められた(lane 7-10)。

次に、ChIP アッセイにより、ヒト肝組織においても、ヒト CAR RAR 応答配列に対して RAR α /RXR α が結合しているか否かについて検討した。Fig. 6B に示すように、抗 RAR α 抗体によって沈降した DNA 断片において、ヒト CAR RAR 応答配列を含む領域(+1381/+1521)の増幅が認められた。この増幅バンドの強度は、コントロール抗体によって沈降した DNA 断片の場合と比べて強いものであった。また、ヒト CAR RAR 応答配列とは無関係の 5'上流領域(-4027/-3790)は、抗 RAR α 抗体およびコントロール抗体によって沈降した DNA 断片のどちらにおいても増幅は認められなかった。

2-3-4 オールトランスレチノイン酸が CAR の mRNA 量に与える影響

ヒト初代培養肝細胞にオールトランスレチノイン酸を 48 時間曝露し、CAR の mRNA 量の変化を検討したところ、Fig. 7 に示すように、CAR の mRNA 量はオールトランスレチノイン酸によって 3.2 倍に増加した。

第 4 節 考察

本章では、HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、ヒト CAR 遺伝子のイントロン 1 に存在する+1386 bp から+1501 bp の領域が、プロモーター活性を有することを明らかにした(Fig. 4)。また、+1453 bp から+1469 bp の配列が、RAR β 遺伝子プロモーターに存在する RAR 応答配列に類似している

ことから(Fig. 5A)、RAR を介したヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化作用について検討し、RAR α がイントロン 1 を含むヒト *CAR* 遺伝子のプロモーターを活性化すること、およびその活性化には+1453 bp から+1469 bp のヒト *CAR* RAR 応答配列が関与することを明らかにした(Fig. 5B)。さらに、ゲルシフトアッセイおよび ChIP アッセイにより、インビトロおよびインビボのいずれにおいても、ヒト *CAR* RAR 応答配列に、RAR α /RXR α が結合することを明らかにした(Fig. 6)。さらに、ヒト初代培養肝細胞を用いて、オールトランスレチノイン酸が、*CAR* の mRNA 量を増加させることを明らかにした(Fig. 7)。これらのことから、RAR α は RXR α とヘテロダイマーを形成し、ヒト *CAR* 遺伝子のイントロン 1 に存在するヒト *CAR* RAR 応答配列に結合することで、ヒト *CAR* 遺伝子の転写を活性化し、*CAR* を誘導することが示唆された。

今回の検討では、ヒト *CAR* 遺伝子の-317 bp から+1009 bp の領域を含むレポーターベクターを用いた場合に、最も高いプロモーター活性を示すことが明らかとなった(Fig. 4)。ヒト *CAR* 遺伝子の-118 bp から-106 bp の領域には、HNF4 α 応答配列が存在し[16]、-69 bp から-53 bp の領域には、LXR α /RXR α 応答配列が存在する(第 1 章)。LXR α を発現させていない HepG2 細胞において、T0901317 によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化は、ほとんど認められなかったことから、内在性の LXR α はほとんど発現していないと考えられる(Fig. 1B)。一方、HNF4 α は HepG2 細胞において高く発現していることから、ヒト *CAR* 遺伝子の-317 bp から+1009 bp の領域に認められたプロモーター活性は、主に HNF4 α 応答配列を介していると考えられた。

RAR は、ビタミン A の活性代謝産物であるオールトランスレチノイン酸をアゴニストとすることで、様々な遺伝子の転写を制御し、細胞の分化、増殖および生体の恒常性の維持に関与している[43]。通常、過量のビタミン A を摂取した場合には、代謝物であるオールトランスレチノイン酸が RAR α を活性化し、その結果、オールトランスレチノイン酸の不活化に関与する CYP26A1 を誘導し、オールトランスレチノイン酸レベルを低下させるという生体防御反応が機能する[44]。しかし、さらに多くのビタミン A あるいはオールトランスレチノイン酸を摂取すると、レチノインシンδροームなどの重篤な症状を引き起こす[45]。オールトランスレチノイン酸の不活化には CYP26A1 だけでなく、薬物代謝酵素である CYP3A および CYP2C も関与することが報告されている[46, 47]。CYP3A および CYP2C 遺伝子の転写制御には *CAR* が関与しているから、*CAR*

を介した CYP3A および CYP2C の誘導が、オールトランスレチノイン酸の不活化を引き起こす可能性が考えられる。今回の検討により、オールトランスレチノイン酸による RAR α の活性化が、CAR 遺伝子の転写活性化を引き起こすことが示唆されたことから、RAR α による CAR 遺伝子の転写制御は、オールトランスレチノイン酸の不活化を介して、過剰量のオールトランスレチノイン酸から、生体を防御する働きの一部を担っている可能性が考えられた。

CAR は CAR 応答配列に結合することを介して、数多くの遺伝子の転写制御に関わっている。一方、CAR はインスリン応答性の転写因子である FoxO1 に対して直接結合し、糖新生に関わる *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子のインスリン応答配列に対する FoxO1 の結合を阻害する[48]。その結果、CAR の活性化は PEPCK 遺伝子の転写を抑制することが報告されている。一方、レチノイド療法によってグルコースレベルが低下すること、およびインスリン感受性が亢進することが報告されている[49、50]。このことから、オールトランスレチノイン酸は、糖新生を抑制している可能性が考えられる。本研究において、CAR がヒト初代培養肝細胞においてオールトランスレチノイン酸によって誘導されることが明らかにされたことから、オールトランスレチノイン酸はアゴニストとして RAR α を活性化することで CAR を誘導し、PEPCK 遺伝子の転写を抑制することで糖新生を抑制している可能性が考えられた。

RAR α アゴニストは、急性骨髄性白血病の治療薬として頻繁に用いられている[51]。また、オールトランスレチノイン酸がガンを抑制することも報告されており[52]、オールトランスレチノイン酸の代謝を阻害することで、細胞内オールトランスレチノイン酸濃度を増加させるレチノイン酸代謝阻害薬が、抗がん剤として用いられている[53]。今回の検討により、RAR α はヒト CAR 遺伝子の転写に関与することが示唆されたことから、RAR α アゴニストを治療薬として用いる際に、CAR の誘導を介して、薬物動態関連遺伝子の発現量が増加する可能性が考えられた。

第 5 節 小活

本章では、ヒト CAR 遺伝子のイントロン 1 領域を介した RAR α による転写制御機構について検討をおこない、以下の結果を得た。

1. ヒト *CAR* 遺伝子のプロモーター活性には、イントロン 1 領域内の+1386 bp から+1501 bp が関与していた。
2. $\text{RAR}\alpha$ 応答配列がヒト *CAR* 遺伝子の+1453 bp から+1469 bp の領域に存在し、ヒト *CAR* 遺伝子プロモーターは $\text{RAR}\alpha$ によって活性化された。
3. $\text{RAR}\alpha$ は $\text{RXR}\alpha$ とヘテロダイマーを形成し、ヒト *CAR* RAR 配列に対して結合した。
4. オールトランスレチノイン酸は、ヒト初代培養肝細胞において *CAR* の mRNA 量を増加させた。

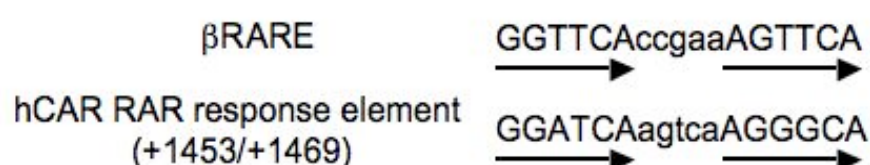
以上のことから、 $\text{RAR}\alpha$ はヒト *CAR* 遺伝子のイントロン 1 上の+1453 bp から+1469 bp に存在するヒト *CAR* RAR 応答配列に $\text{RXR}\alpha$ とのヘテロダイマーとして結合することによりヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化し、*CAR* を誘導することが示唆された。

第 6 節 図表



Fig. 4 Promoter analysis of human *CAR* gene. Reporter vectors for human *CAR* promoter were transfected into HepG2 cells. Data were expressed as fold activity normalized by the luciferase activity of pGL4.17 empty vector. This experiment was performed at least three times and mean $\pm$ S.D. was conferred as error bar.

A



B

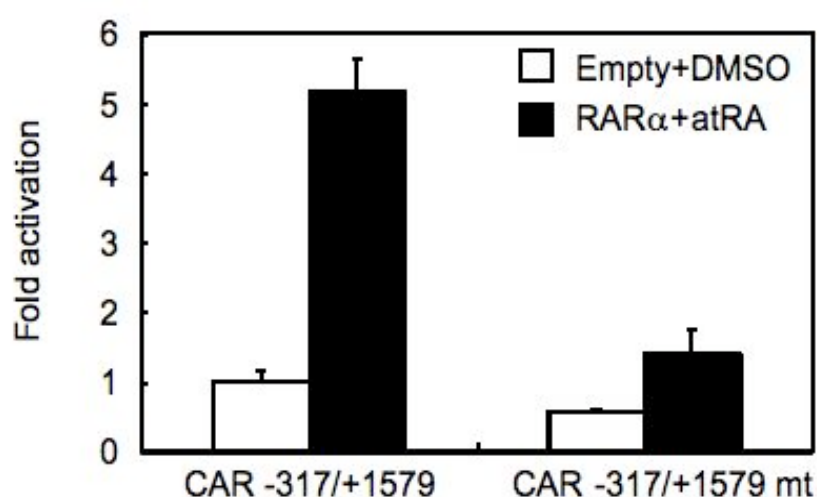


Fig. 5 Identification of RAR α response element on the human *CAR* promoter. A, The nucleotide sequences of β RARE and human *CAR* RAR response element. B, Expression vectors for RAR α were co-transfected with *CAR* promoter construct into HepG2 cells. Cells were treated with all-trans retinoic acid (atRA) or DMSO alone. Data were expressed as fold induction normalized by the luciferase activity of pGL4.17 empty vector. This experiment was performed at least three times and mean $\pm$ S.D. was conferred as error bar.

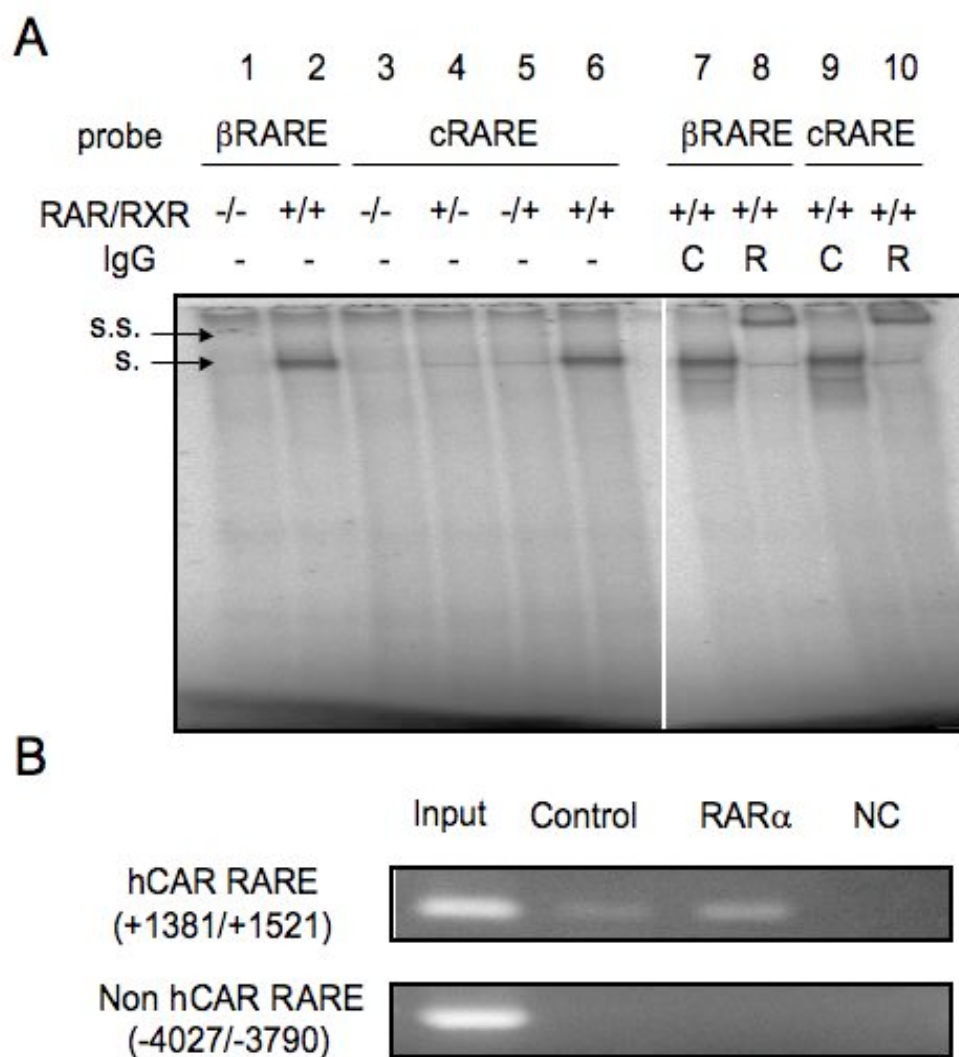


Fig. 6 Binding of RAR α /RXR α to the human CAR RAR response element. A, Gel mobility shift assay was performed to examine binding of RAR α /RXR α to the human CAR RAR response element (cRARE). The middle band indicated as s. shows the RAR α /RXR α heterodimer-dependent shifted band and the upper band indicated as s.s shows the supershifted RAR α /RXR α heterodimer and RAR α antibody complex. IgG described C stands for control IgG and L stands for RAR α antibody. B, ChIP assay was performed to examine binding of RAR α to the human CAR RARE (hCAR RARE) in the human liver. Input indicates DNA of control sheared genomic DNA, Control indicates DNA of precipitated with control IgG, RAR α indicates DNA of precipitated with RAR α antibody, and NC indicates non DNA sample.

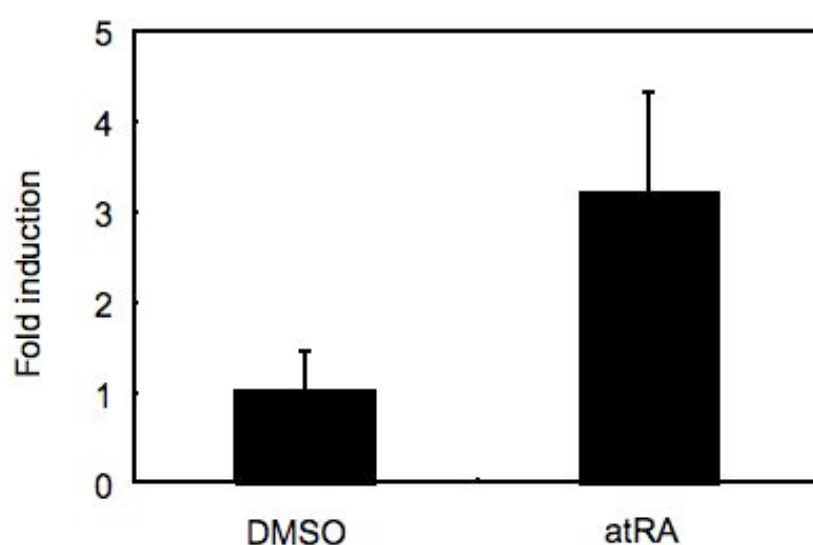


Fig. 7 Effect of atRA on the expression level of CAR mRNA in human primary hepatocytes. Human primary hepatocytes were treated with 10 μ M atRA or DMSO alone for 48 h. The expression level of CAR mRNA was normalized against the expression level of hGUS mRNA. Data are expressed as fold induction of the normalized CAR mRNA measured in DMSO-treated primary human hepatocytes. Quantification of the expression levels of human CAR and hGUS mRNA was performed in triplicate and each value is the mean $\pm$ S.D. from three independent quantification.

第3章 CARの発現量増加によるCAR標的遺伝子発現への影響

第1節 序文

CARは*CYP2B*遺伝子を含む種々の薬物動態関連遺伝子の転写制御に関わっており[7]、ヒト肝組織におけるCARのmRNA量とCARが標的とする遺伝子のmRNA量との間には、正の相関関係が存在することが報告されている[11]。しかしながら、CARの発現量の増加がCAR標的遺伝子の発現量を増加させるか否かについては明らかになっていない。そこで、本章では、ラット肝においてCARを誘導すると報告されているPPAR α アゴニストを用いて、ラット初代肝細胞におけるCARの発現量の増加がCAR標的遺伝子の発現量を増加させるか否かについて検討した。さらに、第2章においてRAR α がヒトCARを誘導することが示唆されたことから、RAR α アゴニストであるオールトランスレチノイン酸によるCARのmRNA量の増加およびCAR標的遺伝子である*CYP3A4*および*CYP2C8*のmRNA量の増加について、ヒト肝ガン由来細胞HepG2細胞を用いて検討した。

第2節 方法

3-2-1 試薬

ベザフィブラート、シプロフィブラート、シクロヘキシミド、フェノフィブラートおよびWY14643はSigmaより購入した。抗CAR抗体はPerseus Proteomics、抗 β -actin抗体はSigma、および抗TFIIB抗体はActive Motifよりそれぞれ購入した。その他の試薬についてはすべて市販のものを用いた。

3-2-2 ラット初代培養肝細胞

ラット初代培養肝細胞は、既報に従って6週齢の雄性SDラット(Japan SLC Inc, Shizuoka)から、2段階コラゲナーゼ灌流法により単離した[54]。単離した肝細胞は、コラーゲンタイプIでコートされた6ウェルプレートに、 4×10^5 cells/mlの細胞密度で播種した。播種培地および培養培地は、第2章におけるヒ

ト初代培養肝細胞と同様のものを用いた。細胞播種から 4 時間後に培養培地へ培地交換し、その 16 時間後から PPAR α アゴニスト、または PPAR α アゴニストおよびタンパク合成阻害剤を添加し、48 もしくは 72 時間化合物を曝露した。この研究は、実験動物の取り扱いガイドラインに従っておこなわれ、千葉大学動物実験委員会によって事前に承認された。

3-2-3 リアルタイム PCR

シプロフィブラート(30 μ M)、WY14643 (10 μ M)、ベザフィブラート(30 μ M) およびフェノフィブラート(30 μ M)を、48 時間処理したラット初代培養肝細胞より全 RNA を抽出し、逆転写をおこなった。得られた cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR をおこなった。CAR の mRNA 量は TaqMan Gene Expression Assays (CAR, Rn_00576085_m1; Applied Biosystems)を用い、18S rRNA 量は TaqMan Assay reagents (18S rRNA; Applied Biosystems)を用いて検出した。CYP2B1/2 および GAPDH の mRNA 量は、以下のプライマーと Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)を用いて検出した (5'-TGGTGGAGGAACTGCGGAAATC-3' and 5'-TGATGCACTGGAAGAGGAAGGT-3' for CYP2B1/2, and 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3' and 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3' for GAPDH)。

3-2-4 ウェスタンブロット

シプロフィブラート(30 μ M)もしくは溶媒(0.1 % DMSO)のみを 72 時間処理したラット初代培養肝細胞より、全細胞ライセートおよび核抽出物を調製した。試料は 10 %ポリアクリルアミドゲルによって分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。転写したニトロセルロース膜に対して抗 CAR 抗体、抗 β -actin 抗体および抗 TFIIIB 抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識-抗マウス IgG 抗体 (Sigma)を反応させ、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いて検出した。

3-2-5 RT-PCR

HepG2 細胞(3×10^5 cells/ml)を 6 ウェルプレートに播種した。細胞の播種から 24 時間後に、オールトランスレチノイン酸存在下で 48 時間培養した HepG2 細胞より全 RNA を抽出し、逆転写をおこなった。得られた cDNA を鋳型として、PCR をおこなった。CAR、CYP3A4、CYP2C8 および GAPDH の mRNA 量は以下のプライマーを用いて検出した (5'-TGGTACTGCAAGTCATCAAGT-3' and 5'-CTTCAATTGTGTAGCGAAGAG-3' for CAR, 5'-GATTGACTCTCAGAAGGCAAAAGAACTGA-3' and 5'-GGTGAGTGGCCAGTTCATCATAATG-3' for CYP3A4, 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3' and 5'-CAATCGATAAAGTCCCGAGGATTGTTA-3' for CYP2C8, and 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3' and 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3' for GAPDH)。PCR 反応条件は、94℃ 2 分の後、94℃ 25 秒、55℃ 25 秒、72℃ 25 秒のサイクルを 33 cycle (CAR)、35 cycle (CYP3A4 および CYP2C8)あるいは 25 cycle (GAPDH)とした。

第 3 節 結果

3-3-1 PPAR α アゴニストが CAR および CYP2B1/2 の mRNA 量に与える影響

ラット初代培養肝細胞に対して 4 種類の PPAR α アゴニスト(シプロフィブラート、ベザフィブラート、フェノフィブラートおよび WY14643)を 48 時間処理して、CAR および CYP2B1/2 の mRNA 量を測定した。Fig. 8 に示すように、CAR および CYP2B1/2 の mRNA 量は、すべての PPAR α アゴニストによって 5 から 10 倍に増加した。シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加は代表的な CAR アクチベーターであるフェノバルビタールによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加よりわずかに小さかった(data not shown)。

3-3-2 シクロヘキシミドがシプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量増加に与える影響

PPAR α アゴニストによる CYP2B1/2 の mRNA 量増加のメカニズムを調べる

ために、シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量増加に対するタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドの影響を検討した。Fig. 9 に示すように、シクロヘキシミド(20 μ M)の共処理により、シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加は、完全に消失した。

3-3-3 シプロフィブラートによる全細胞および核における CAR タンパク量の変化

CAR はアゴニストあるいはアクチベーター非存在下では、主に細胞質に局在する[5]。しかし、核内に存在する CAR は、アゴニスト非存在下においても、転写活性化作用を示す[55]。そこで、シプロフィブラート処理および非処理の細胞について、全細胞および核における CAR のタンパク量を比較した。Fig. 10 に示すように、シプロフィブラートによって、CAR のタンパク量は全細胞だけでなく核においても増加した。

3-3-4 オールトランスレチノイン酸が CAR、CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量に与える影響

RAR α アゴニストであるオールトランスレチノイン酸が、HepG2 細胞における CAR、CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量に与える影響を検討した。Fig. 11 に示すように、CAR、CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量は、検討したいずれの濃度のオールトランスレチノイン酸によっても増加した。

第 4 節 考察

本章では、ラット初代培養肝細胞を用いて、4 種類の PPAR α アゴニストが CAR および CYP2B1/2 の mRNA 量を増加させることが明らかとなった(Fig. 8)。また、シクロヘキシミドによって、シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加が消失することも示された(Fig. 9)。これらのことから、シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加には、タンパク合成が必要であることが示唆された。さらに、シプロフィブラートは核内における CAR のタンパク量を増加させ得ることも明らかとなった(Fig. 10)。これらのことから、

シプロフィブラートは PPAR α を活性化することにより CYP2B1/2 を直接誘導するのではなく、CAR の発現量を増加させることで、CYP2B1/2 を誘導することが示唆された。また、HepG2 細胞においては、RAR α アゴニストであるオールトランスレチノイン酸が、CAR、CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量を増加させることから(Fig. 11)、オールトランスレチノイン酸が、RAR α の活性化を介して CAR の発現量を増加させ、CYP3A4 および CYP2C8 を誘導する可能性が考えられた。

本章において、PPAR α アゴニストは、ラット初代培養肝細胞における CYP2B1/2 の mRNA 量を増加させた(Fig. 8)。また、PPAR α アゴニストである WY14643 が、フェノバルビタールによるラット CYP2B1/2 の誘導を増強することも報告されている[15]。これらの結果は、マウスにおいて、PPAR α アゴニストが CYP2B10 を誘導せず、フェノバルビタールによる CYP2B10 の誘導を抑制するという結果と相反する[56]。マウスにおいては、PPAR α アゴニストが細胞質の CAR を核へ移行させるものの、核内においては CAR のアンタゴニストとして作用することが示唆されている[56]。マウス CAR の強力なアゴニストである TCPOBOP は、ラット CAR のアゴニストではないことが明らかなように、CAR のアゴニスト認識には種差が存在する[27]。従って、マウスとは異なり、ラットでは PPAR α アゴニストが CAR のアンタゴニストとして作用せず、CAR の発現量を増加させることにより CYP2B1/2 の発現量増加およびフェノバルビタールによる CYP2B1/2 の誘導の増強を引き起こすものと考えられた。

本検討では、PPAR α アゴニストが CYP2B1/2 の mRNA 量を増加させることを示したが、Wieneke ら[15]は、PPAR α アゴニストである WY14643 が、CAR の発現量を増加させるものの、CYP2B1/2 の発現量は増加させないという結果を示している。この矛盾を生じた原因の 1 つとして、検討に用いたラットの系統差が挙げられる。また、本検討では、Wieneke ら[15]の検討と比較して、初代培養肝細胞への PPAR α アゴニストの処理時間が長い。シプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加には、タンパク合成のステップが必要であることから(Fig. 9)、初代培養肝細胞への PPAR α アゴニストの処理時間の違いが、CYP2B1/2 の mRNA 量への影響の違いを生じさせた可能性が考えられる。

さらに、RAR α アゴニストであるオールトランスレチノイン酸も、CAR の mRNA 量だけでなく、CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量を増加させることが明らかとなった(Fig. 11)。オールトランスレチノイン酸による CYP3A4 およ

び CYP2C8 の mRNA 量の増加が、CAR の増加に起因するか否かは明らかではないが、PPAR α アゴニストが CAR の発現量の増加を介して CYP2B1/2 の mRNA 量を増加させるという結果とあわせて考えると、オールトランスレチノイン酸による CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量の増加も CAR の発現量の増加を介している可能性が考えられた。CAR の発現量の増加と CYP2B1/2、CYP3A4 および CYP2C8 の誘導との関連を明確にするためには CAR をノックアウトあるいはノックダウンした実験系を用いた検討が必要と考えられる。

第 5 節 小活

本章では、CAR の発現量増加が、CAR 標的遺伝子に与える影響について検討をおこない、以下の結果を得た。

1. 4 種類の PPAR α アゴニストは、CAR および CYP2B1/2 の mRNA 量を増加させた。
2. PPAR α アゴニストの 1 つであるシプロフィブラートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加は、タンパク合成阻害によって消失した。
3. シプロフィブラートによって、CAR のタンパク量が全細胞ライセートにおいてだけでなく、核内において増加した。
4. RAR α アゴニストであるオールトランスレチノイン酸によって、CAR だけでなく CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量が増加した。

以上のことから、CAR はアクチベーターの非存在下においても、発現量の増加により CAR 標的遺伝子の発現量を増加させることが示唆された。

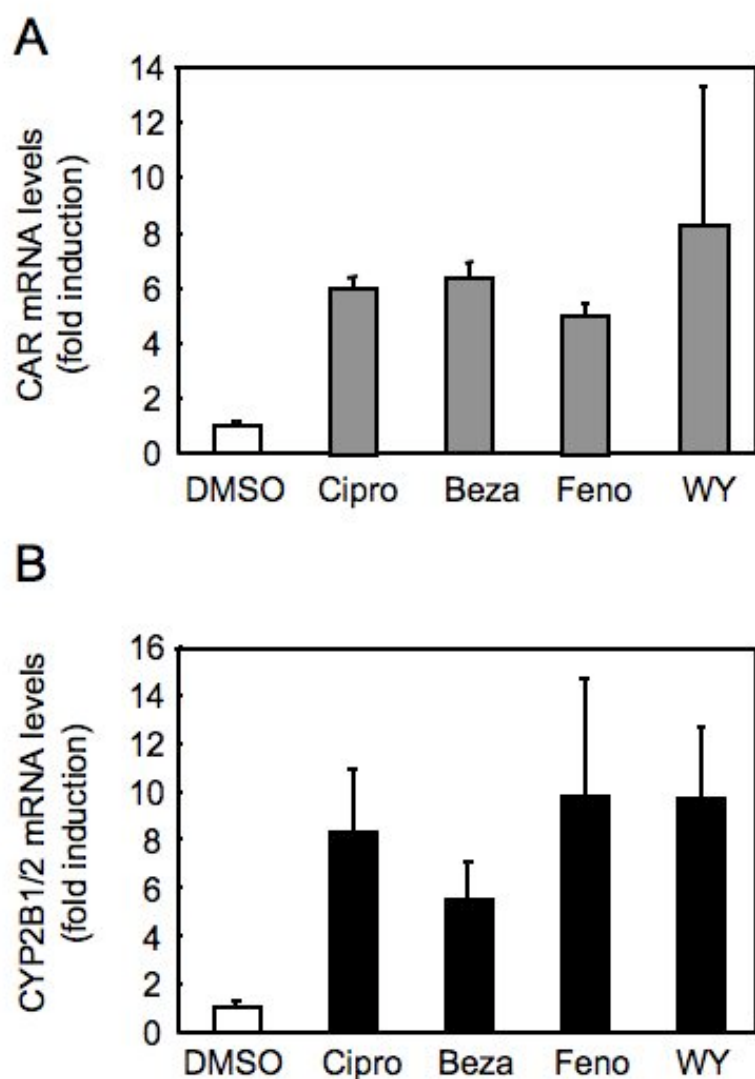


Fig. 8. Induction of CAR (A) and CYP2B (B) by PPAR α ligands. Rat primary hepatocytes were treated with ciprofibrate (Cipro; 30 μ M), bezafibrate (Beza; 30 μ M), fenofibrate (Feno; 30 μ M), WY14643 (WY; 10 μ M) or vehicle (DMSO) for 48 h. Data are expressed as fold induction over vehicle control. Each value is the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments.

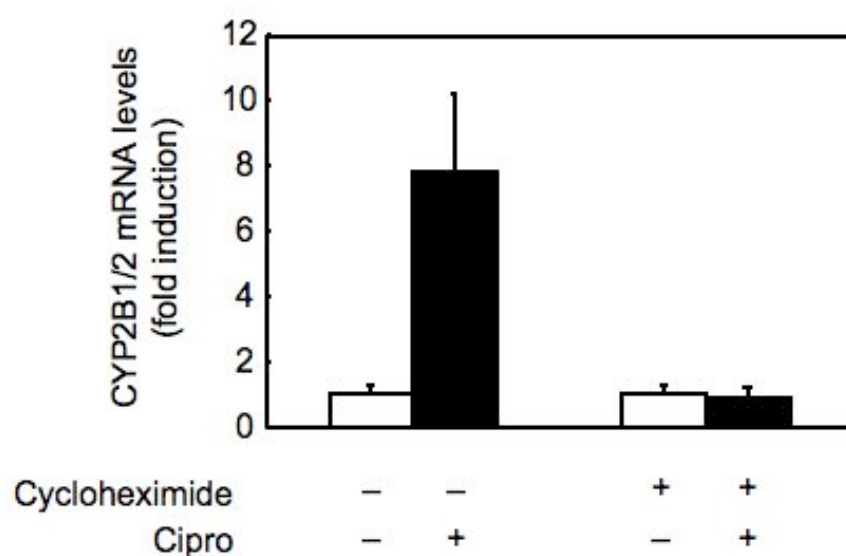


Fig. 9. Effects of cycloheximide on induction of CYP2B by ciprofibrate. Rat primary hepatocytes were treated with ciprofibrate (Cipro; 30 μ M) or vehicle (DMSO) for 48 h in the presence or absence of cycloheximide (20 μ M). The relative mRNA expression levels in the absence of ciprofibrate were designated as 1. Each value is the mean $\pm$ S.D. of four independent experiments.

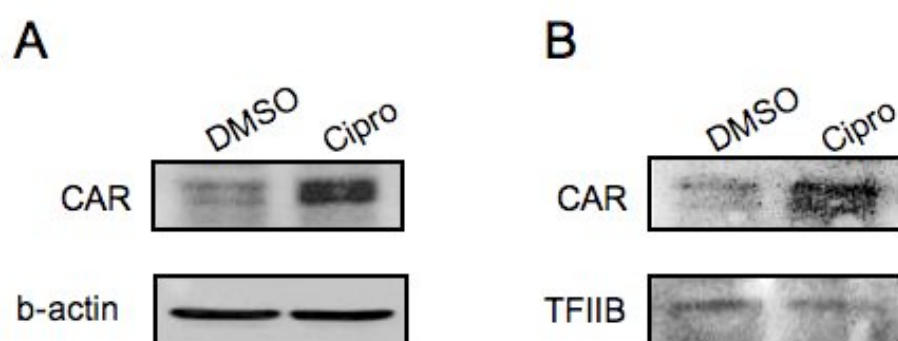


Fig. 10. Induction of nuclear CAR protein by ciprofibrate. Rat primary hepatocytes were treated with ciprofibrate (Cipro; 30 μ M) or vehicle (DMSO) for 72 h. Total cell lysates (A) and nuclear extracts (B) were prepared as described in Materials and Methods and subjected to Western blotting analyses. β -Actin and TFIIB were used as internal controls of total cell lysates and nuclear extracts, respectively.

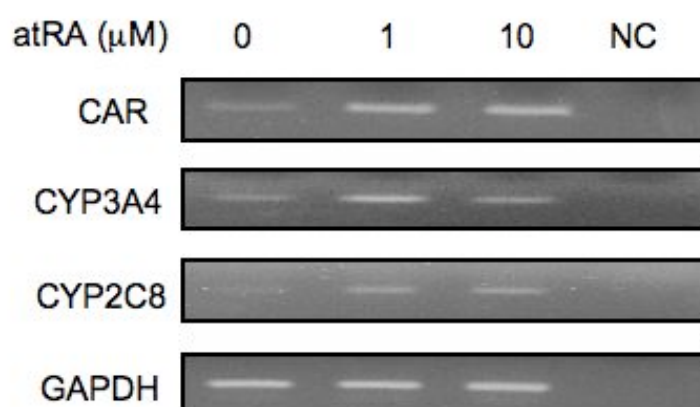


Fig. 11. Effect of all-trans retinoic acid (atRA) on the expression level of CAR, CYP3A4 and CYP2C8 mRNA in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with atRA (1 or 10 μ M) or DMSO alone for 48 h. Total RNA isolated from HepG2 cells was reverse-transcribed and detected by semi-quantum RT-PCR.

総括

1. LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化を検討したところ、LXR α はヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを活性化した。また、LXR α によるヒト *CAR* 遺伝子プロモーターの活性化には、-69 bp から-53 bp に存在する DR5 配列が関与していた。そして、LXR α は RXR α とヘテロダイマーを形成し、この DR5 配列に対して結合することが示された。これらのことから、LXR α はヒト *CAR* 遺伝子を制御する転写因子であることが示唆された。
2. ヒト *CAR* 遺伝子のイントロン 1 領域を介した転写を制御する転写因子について検討をおこなったところ、イントロン 1 領域内の+1453 bp から+1469 bp に存在するヒト *CAR* RAR 応答配列がプロモーター活性に関与していた。また、イントロン 1 領域を含むヒト *CAR* 遺伝子プロモーターを RAR α が活性化し、その活性化はヒト *CAR* RAR 応答配列に対して変異を導入することで大きく減少した。そして、RAR α は RXR α とヘテロダイマーを形成し、ヒト *CAR* RAR 応答配列に対して結合することが示された。さらに、ヒト初代培養肝細胞に対して、オールトランスレチノイン酸を処理したところ、*CAR* の mRNA 量が増加した。これらのことから、RAR α はヒト *CAR* 遺伝子を制御する転写因子であることが示唆された。
3. *CAR* の発現量を増加させる PPAR α アゴニストが、*CAR* 標的遺伝子に対して与える影響について検討をおこなったところ、*CAR* の mRNA の増加とともに CYP2B1/2 の mRNA 量の増加も認められた。また、シプロフィブレートによる CYP2B1/2 の mRNA 量の増加は、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを共処理することで消失した。そして、*CAR* の全細胞ライセートおよび核内におけるタンパク量は、ともにシプロフィブレートによって増加した。さらに、第 2 章において、*CAR* 遺伝子を制御する転写因子であることが示唆された RAR α のアゴニストであるオールトランスレチノイン酸によって、*CAR* の mRNA 量が増加した。また、同時に CYP3A4 および CYP2C8 の mRNA 量も増加した。これらのことから、*CAR* の発現量の増加によって *CAR* 標的遺伝子が誘導される可能性が考えられた。

参考文献

1. Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1544-1552.
2. Chang TK, Waxman DJ. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab Rev.* 2006; 38: 51-73.
3. Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, Negishi M. Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 1069-1075.
4. Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M. Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett.* 2003; 31: 17-20.
5. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 6318-6322.
6. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 5652-5658.
7. Zelko I, Negishi M. Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun,* 2000; 277: 1-6.
8. Kakizaki S, Yamamoto Y, Ueda A, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR. *Biochem Biophys Acta.* 2003; 1619: 239-242.
9. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 649-673.
10. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005; 28:

249-268.

11. Worthan M, Czerwinski M, He L, Parkinson A, Wan YJ. Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 1700-1710.
12. Yamazaki Y, Kakizaki S, Horiguchi N, Sohara N, Sato K, Takagi H, Mori M, Negishi M. The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2007; 56: 565-574.
13. Pascussi JM, Busson-Le Coniat M, Maurel P, Vilarem MJ. Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 42-55.
14. Patel RD, Hollingshead BD, Omiecinski CJ, Perdew GH. Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology.* 2007; 46: 209-218.
15. Wieneke N, Hirsch-Ernst KI, Kuna M, Kersten S, Püschel GP. PPARalpha-dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: potential role in starvation adaptation. *FEBS Lett.* 2007; 581: 5617-5626.
16. Pascussi JM, Robert A, Moreau A, Ramos J, Bioulac-Sage P, Navarro F, Blanc P, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ. Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms. *Hepatology.* 2007; 45: 1146-1153.
17. Ding X, Lichti K, Kim I, Gonzalez FJ, Staudinger JL. Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J Biol Chem.* 2006; 281: 26540-26551.
18. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of

- networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1619: 243-253.
19. Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci*. 2005; 94: 1169-1186.
 20. Jover R, Moya M, Gómez-Lechón MJ. Transcriptional regulation of cytochrome p450 genes by the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4- α . *Curr Drug Metab*. 2009; 10: 508-519.
 21. Köhle C, Bock KW. Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77: 689-699.
 22. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, Kliewer SA. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor α , farnesoid X receptor β , liver X receptor α , liver X receptor β , and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 742-759.
 23. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell*. 1998; 93: 693-704.
 24. Sachiko Takagi. Activation of nuclear receptor pregnane X receptor by fetal bovine serums of cell culturing component. Dissertation of master of pharmaceutical sciences. 2009.
 25. Kobayashi K, Yamagami S, Higuchi T, Hosokawa M, Chiba K. Key structural features of ligands for activation of human pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos*. 2004; 32: 468-472.
 26. Kosuke Saito. The mechanism of cytochrome P450 induction by HMG-CoA reductase inhibitors via nuclear receptor. Dissertation of master of pharmaceutical sciences. 2007.
 27. Kobayashi K, Yamanaka Y, Iwazaki N, Nakajo I, Hosokawa M, Negishi M, Chiba K. Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor.

- Drug Metab Dispos. 2005; 33: 924-929.
28. Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M, Chiba K. Involvement of hepatocyte nuclear factor 4alpha in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 1012-1018.
 29. Zhang Y, Mangelsdorf DJ. LuXuRies of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Mol Interv.* 2002; 2: 78-87.
 30. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995; 9: 1033-1045.
 31. Stroup D, Chiang JY. HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res.* 2000; 41: 1-11.
 32. Huuskonen J, Vishnu M, Chau P, Fielding PE, Fielding CJ. Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells. *Biochemistry.* 2006; 45: 15068-15074.
 33. Tarling E, Salter A, Bennett A. Transcriptional regulation of human SREBP-1c (sterol-regulatory-element-binding protein-1c): a key regulator of lipogenesis. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 107-109.
 34. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000; 14: 2819-2830.
 35. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res.* 2001; 40: 439-452.
 36. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996; 383: 728-731.
 37. Kullak-Ublick GA, Becker MB. Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine. *Drug Metab Rev.* 2003; 35: 305-317.

38. Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*. 2005; 42: 420-430.
39. Masson D, Qatanani M, Sberna AL, Xiao R, Pais de Barros JP, Grober J, Deckert V, Athias A, Gambert P, Lagrost L, Moore DD, Assem M. Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *J Lipid Res*. 2008; 49: 1682-1691.
40. Rezen T, Tamasi V, Lövgren-Sandblom A, Björkhem I, Meyer UA, Rozman D. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC Genomics*. 2009; 10: 384.
41. Zhu Y, Li Y. Liver X receptors as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Clin Invest Med*. 2009; 32: E383-394.
42. Jung D, Mangelsdorf DJ, Meyer UA. Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem*. 2006; 281: 19081-19091.
43. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 760-772.
44. Ozpolat B, Mehta K, Lopez-Berestein G. Regulation of a highly specific retinoic acid-4-hydroxylase (CYP26A1) enzyme and all-trans-retinoic acid metabolism in human intestinal, liver, endothelial, and acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2005; 46: 1497-1506.
45. Patatanian E, Thompson DF. Retinoic acid syndrome: a review. *J Clin Pharm Ther*. 2008; 33: 331-338.
46. Adedoyin A, Stiff DD, Smith DC, Romkes M, Bahnson RC, Day R, Hofacker J, Branch RA, Trump DL. All-trans-retinoic acid modulation of drug-metabolizing enzyme activities: investigation with selective metabolic drug probes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998; 41: 133-139.
47. Marill J, Cresteil T, Lanotte M, Chabot GG. Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid

- principal metabolites. *Mol Pharmacol*. 2000; 58: 1341-1381.
48. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 7931-7940.
 49. Hartmann D, Forgo I, Dubach UC, Hennes U. Effect of acitretin on the response to an intravenous glucose tolerance test in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992; 42: 523-528.
 50. Ellis CN, Kang S, Vinik AI, Grekin RC, Cunningham WJ, Voorhees JJ. Glucose and insulin responses are improved in patients with psoriasis during therapy with etretinate. *Arch Dermatol*. 1987; 123: 471-475.
 51. Ohnishi K. PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. *Int J Clin Oncol*. 2007; 12: 313-317.
 52. Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*. 2003; 22: 7305-7315.
 53. Njar VC, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Vasaitis TS, Khandelwal A, Mehta J, Huynh C, Belosay A, Patel J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem*. 2006; 14: 4323-4340.
 54. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976; 13: 29-83.
 55. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 5652-5658.
 56. Guo D, Sarkar J, Suino-Powell K, Xu Y, Matsumoto K, Jia Y, Yu S, Khare S, Haldar K, Rao MS, Foreman JE, Monga SP, Peters JM, Xu HE, Reddy JK. Induction of nuclear translocation of constitutive androstane receptor by peroxisome proliferator-activated receptor alpha synthetic ligands in mouse liver. *J Biol Chem*. 2007; 282: 36766-36776.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表による。

1. Kosuke Saito, Kaoru Kobayashi, Yuki Mizuno, Yukina Fukuchi, Tomomi Furihata and Kan Chiba, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) agonists induce constitutive androstane receptor (CAR) and cytochrome P450 2B in rat primary hepatocytes, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2009, in press

謝辞

本研究を通じて御指導、御鞭撻を賜りますとともに論文の御校閲をいただきました、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座(薬物学研究室)千葉寛 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、最後まで御指導、御鞭撻を賜りました、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座(薬物学研究室)小林カオル 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を通じて御指導、御鞭撻を賜りました、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座(薬物学研究室)降幡知巳 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を通じて、終止適切な御助言、御強力をいただきました、千葉大学大学院遺伝子薬物学講座(薬物学研究室)の皆様心より感謝いたします。

また、私事ではありますが、留学する機会を与えてくださいました National Institute of Environmental Health Sciences, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, Pharmacogenetics Group 根岸正彦 博士に心より感謝いたします。

最後に、これまで私を支えてくださいました両親に心より感謝いたします。

主査、副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員によりおこなわれた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	山口直人
副査	千葉大学教授（医学研究院）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	小林弘