

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04103

研究課題名(和文) DNAメチル化によるCYP3A4活性評価法と標的メタボローム解析による臨床応用

研究課題名(英文) Evaluation between CYP3A4 activity and DNA methylation

研究代表者

家入 一郎 (Ieiri, Ichiro)

九州大学・九州大学病院・教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの我々の研究により、ヒト肝におけるDNAメチル化頻度がCYP3A4発現の個人差の原因となることが認められている。DNAメチル化頻度は同一個体内においても、臓器ごとに異なる。ヒト肝におけるDNAメチル化状態を解析するためには肝臓の生検が必要であるが、被験者への負担も大きいため困難である。そこで、本研究では、まず、免疫磁気分離による末梢血からの肝細胞分離方法を確立した。次に、本手法を用いた「健常成人を対象とした末梢血肝由来細胞のDNAメチル化解析に基づくCYP3A4活性予測に関する臨床試験」により、DNAメチル化がCYP3A4活性予測のマーカーとして応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床使用される大部分の医薬品の代謝に関するCYP3A4の活性には、約20倍の個人差が認められることから、その活性予測は臨床・創薬の両面から切望されている。本試験により、末梢血から分離した肝細胞のDNAメチル化解析は、CYP3A4活性予測のマーカーとして応用可能であることが示唆された。本研究により確立した解析法は、臨床での応用を想定して検体の採取方法や採取量の構築を行った。今後の大規模試験の実施によるマーカーとしての感度と特異性の検証は重要であるが、社会実装が容易な解析法であることから、臨床・創薬への寄与が十分に期待でき社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies suggest that the frequency of DNA methylation in human liver is responsible for individual differences in CYP3A4 expression. The frequency of DNA methylation varies in the cells derived from organs, even within the same subject. Biopsy of liver tissues is necessary to analyze the frequency of DNA methylation, but is difficult to perform due to its high invasiveness. In this study, a method for separating hepatocytes from peripheral blood by immunomagnetic separation has been established. Next, we performed a clinical study on the prediction of CYP3A4 activity based on DNA methylation analysis in healthy adults using our established methods. The purpose of this study was to determine the relationship between the frequency of DNA methylation in hepatocytes and the pharmacokinetics of midazolam, a known substrate of CYP3A4. The results of the clinical study suggest that DNA methylation can be applied as a marker for predicting individual CYP3A4 activity.

研究分野：薬物動態学

キーワード：CYP3A4 個別化医療 DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Cytochrome P450 (CYP) は、薬物代謝の第 I 相反応において中心的な役割を果たしている酵素である。その中でも CYP3A4 は主要代謝臓器である肝臓において、最も多く発現している CYP の一種である。CYP3A4 は現在臨床現場で使用されている医薬品の半数以上を基質としており<sup>1,2</sup>、この発現量の個人差は多くの薬物の薬効および副作用発現に寄与し得ると考えられる。一方で CYP3A4 は肝臓において、その発現量に約 50 倍、活性には数十倍という大きな個人差を有していることが知られている<sup>3</sup>。現在までに CYP3A4 遺伝子について遺伝子多型解析が行われ、多くの遺伝子多型が同定されてきた。しかしながら、活性に影響を与えるものは少なく、いずれの多型においても出現頻度は極めて低いものであることから<sup>4</sup>、十分に個人差を説明できる要因は未だに同定されていない。このような現状を踏まえると、CYP3A4 の個人差要因の解明には、遺伝子多型解析とは異なったアプローチが求められる。

遺伝子多型以外に遺伝子発現に個人差をもたらす得る発現制御メカニズムとして、エピジェネティクスが注目されている。エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現機構と定義されている。エピジェネティクスの代表的な機構として、DNA メチル化がある。DNA メチル化とは、DNA 配列中の cytosine (C)、guanine (G) が連続する CpG site において C の 5 位炭素がメチル化される現象のことを主に指し、胚発生、分化において重要な役割を果たす<sup>5</sup>。さらに CpG site は、ゲノム上で高密度に集積することで CpG island を形成し、ゲノム上に点在する。特に遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に存在する CpG island は、DNA メチル化を受けることで、遺伝子発現の抑制に寄与することが知られている<sup>6</sup>。我々は以前、CYP3A4 発現の個人差がプロモーターを除くシスエレメントによるものであることを示唆する結果を得ている<sup>7</sup>。また Dannenberg らは、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に脱メチル化剤として知られる 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理を施すことで、CYP3A4 mRNA 発現の上昇が引き起こされることを報告した<sup>8</sup>。以上より CYP3A4 発現の個人差は、シスエレメントの代表的な機構であるエンハンサーとして DNA メチル化が遺伝子発現調節することで引き起こされていることが想起され、我々は CYP3A4 遺伝子発現を制御する CpG island における DNA メチル化解析を進めてきた。

ヒト肝における DNA メチル化解析の結果、CYP3A4 遺伝子が座位する 7 番染色体上の 5 Mbp 下流の CpG island (Differential Methylation Region, 以下 DMR と称する) のメチル化頻度と CYP3A4 mRNA 発現量との間に強い負相関を認められた (図 1)。CpG island 領域と CYP3A4 遺伝子の高次構造の解析や CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により CpG island 欠失させた細胞を用いた解析より、図 2 に示す立体的な CYP3A4 遺伝子発現調節機構を明らかにした (未発表)。以上の基礎的な知見より、CpG island の DNA メチル化頻度が CYP3A4 活性予測のための新規バイオマーカーになることが示唆された。

DNA のメチル化頻度は遺伝子多型とは異なり、同一個体内においても組織ごとに異なるパターンを有していることが知られている<sup>9</sup>。肝臓の DNA メチル化頻度の測定には、肝臓由来の DNA を得ることが不可欠である。しかしながら、組織生検によって直接肝細胞を獲得する方法は、侵襲性が高く、患者へ強い負担が大きいため困難である。近年、末梢血循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells, CTC) が腫瘍組織から遊離し、血液中を循環することが明らかになっている<sup>10,11</sup>。がんの診断や治療効果のモニタリングのツールとして CTC が注目を集めており、CTC を末梢血より分離する様々な手法がこれまでに報告されている<sup>12-15</sup>。肝がん患者の末梢血より、肝細胞特異的に発現していることが知られている膜蛋白質を標的とした免疫磁気分離法を用いて、肝由来 CTC を分離した報告がある<sup>14,15</sup>。同膜蛋白質は、正常肝細胞においても発現が認められることから、末梢血中の正常肝細胞の分離に免疫磁気分離法を応用することが可能であると考え、同分離方法の構築を行った。次に、当該分離法を用いた「健康成人を対象とした末梢血肝由来細胞の DNA メチル化解析に基づく CYP3A4 活性予測に関する臨床試験」を実施し、CpG island の DNA メチル化を、CYP3A4 活性予測のマーカーとする検討を試みた。

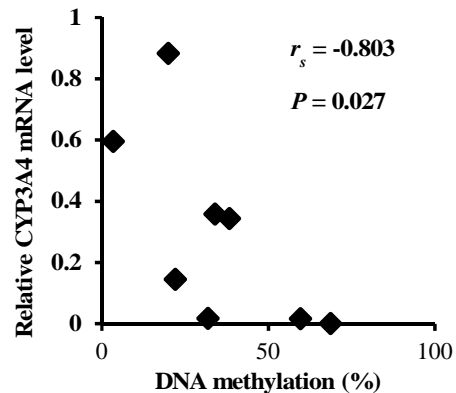


図 1 Correlation analysis between CYP3A4 mRNA and DNA methylation levels in human liver samples

The CYP3A4 mRNA level is plotted against individual methylation rate of CG sites in the CpG island ( $n = 8$ ). The expression of CYP3A4 mRNA was analyzed in total RNA isolated from human liver by real-time PCR. The  $r_s$  and  $p$  values are from Spearman's rank-order correlation analysis.

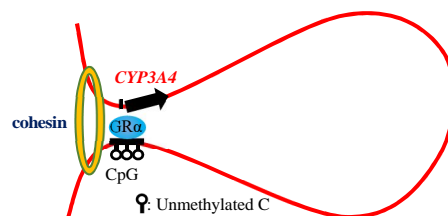


図 2 Chromatin loop structure model in CYP3A4 gene and CpG island

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を研究目的とした。

- (1) 末梢血からの肝由来 DNA 抽出方法 (免疫沈降法) の確立
- (2) 健常成人を対象とした臨床試験の実施 (DNA メチル化頻度と CYP3A4 基質薬物ミダゾラム体内動態との関連評価)

## 3. 研究の方法

### (1) 肝由来 DNA 抽出方法の確立

DNA メチル化頻度は組織・臓器により異なるため、解析標的臓器由来の DNA を得ることが必須となる。しかし、直接得ることは困難であるので末梢血を用いた方法を構築した。末梢血中には、臓器由来の細胞が微量リークする。肝細胞特異的な膜抗原である Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) に対して、免疫沈降することで、臓器特異的に細胞を得ることとした。免疫沈降で得た細胞から DNA を抽出し、DNA メチル化解析の試料とした。肝細胞分取の特異性の確認は、肝細胞由来 DNA の特有の表現型である GSTP1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化領域の解析により行った。DNA メチル化頻度の測定は、pyrosequencing 法により行った。絶対的メチル化頻度の測定のため、メチル化、非メチル化 DNA fragment を作成し、混合比を変えることで検量線を作成した。

### (2) 健常成人を対象とした臨床試験の実施

これまでの検討で、CYP3A4 遺伝子発現に重要な領域であることを特定した CpG island における DNA メチル化頻度をバイオマーカーとし、CYP3A4 の基質薬物であるミダゾラムを投与する臨床試験を実施した。被検者のスクリーニングとして、全血 20 mL を採血し、(1)において確立した肝細胞分離法により肝由来 DNA を得た。絶対的 DNA メチル化頻度を pyrosequencing 法により測定した。同時に、CYP3A4 のサブファミリーでありミダゾラムを代謝することが知られている CYP3A5 について、非活性型の被検者を選択するため CYP3A5\*3 の遺伝子診断を行った。CYP3A5 遺伝子多型診断は 83 名を対象に実施した。CYP3A5\*3 ホモ型保有者 38 名で DNA メチル化解析を実施し、20 名を臨床試験に登録した。ミダゾラムを単回静脈内と経口投与し、肝細胞の DNA メチル化と薬物動態パラメータ (ミダゾラム水酸化体とミダゾラムの血中濃度-時間曲線下面積の比) の相関を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝由来 DNA 抽出方法の確立

ヒト肝臓 CYP3A4 機能を予測するバイオマーカーとして、肝臓における CpG island の DNA メチル化を解析する。そのため、末梢血から肝由来細胞の DNA を獲得することが必要である。本研究では、肝臓特異的に発現する膜タンパク質 ASGPR を標的にした免疫磁気分離による、末梢血からの肝由来細胞分離法の構築を試みた。末梢血の遠心分離により得られる Buffy coat 画分は、ほとんど血球細胞から構成されており、肝由来細胞は極めて微量であると考えられる。そこで血球特異的に発現する膜抗原を標的にした免疫磁気分離のステップを組み込むことで、予め血球細胞の除去を行った後、ASGPR を標的にした肝由来細胞の免疫磁気分離を試みた (図 3)。

磁気分離により得られた肝由来細胞について、肝細胞と血球細胞にそれぞれ高発現している microRNA (miRNA) 発現量を定量する手法により、肝由来細胞の分離を確認した。血球での発現が低く、肝細胞に強く発現する miR-1915 および血球特異的に発現が認められる miR-150 の発現量をそれぞれ定量した。なお内部標準には、miR-16 を用

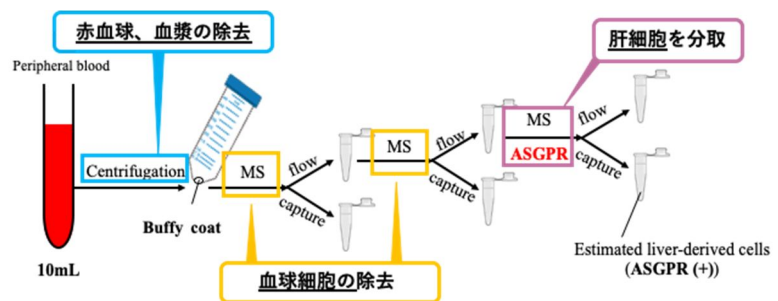


図 3 Schematic diagram showing the method for separating liver-derived cells from peripheral blood

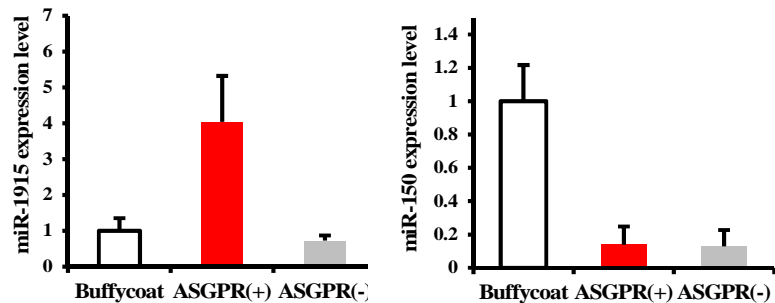


図 4 miRNA expression levels in isolated cells obtained after removal of blood cells by magnetic immunoprecipitation (n = 4)

ASGPR (+), cells isolated by immunomagnetic separation (IMS) targeting ASGPR; ASGPR (-), flow-through cells from IMS targeting ASGPR. Each column represent the mean S.D. \*, p < 0.05, significantly different from input (Buffy coat): statistically analyzed using Dunnett's test.

いた。Buffy coat 画分、ASGPR を標的にした免疫磁気分離後の画分 (ASGPR (+)) と、同ステップのフロースルー画分 (ASGPR (-)) の3つの画分に対して、肝特異性の解析を行った。各 miRNA を定量した結果、ASGPR (+) 画分では、miR-1915 において Buffy coat 画分と比べておよそ4倍高い発現量を示した (図 4A)。一方、ASGPR (+) 画分、ASGPR (-) 画分の両画分で、miR-150 において Buffy coat 画分と比べて有意な発現量の低下が認められた (図 4B)。

## (2) 健常成人を対象とした臨床試験の実施

CYP3A5 遺伝子多型ならびに CpG island (DMR) の DNA メチル化に基づく被験者選択

ヒトにおいて CYP3A5 は、CYP3A4 と基質が重複することが知られており、ミダゾラムに関しても同様の報告がある。そこで CYP3A4 の機能を正確に測定するために、被験者 80 名に対して CYP3A5\*3 の遺伝子診断を実施した。その結果 CYP3A5\*3/\*3 ホモ型保有者は、45 名であった (表 1)。本研究では DMR の DNA メチル化を CYP3A4 の機能予測のバイオマーカーとして確立するため、幅広い DNA メチル化を有する被験者集団を選択する必要がある。そこで、CYP3A5\*3 ホモ型であることが確認され、かつ DNA メチル化解析への協力が得られた被験者 38 名に対して (1) にて構築した分離法より得た ASGPR (+) 画分を対象に、pyrosequencing 法によって CpG island の DNA メチル化頻度の定量を行った。解析の結果、分離後の DMR の DNA メチル化頻度において幅広い個人差を認めた (図 5)。最終的に、DNA メチル化頻度を得た被験者のうち 20 名から、ミダゾラム投与による臨床試験への参加に同意を得た。

| CYP3A5 genotype | Observed number |
|-----------------|-----------------|
| *1/*1           | 6               |
| *1/*3           | 29              |
| *3/*3           | 45              |

表 1 A summary of CYP3A5 genotypes in 80 healthy Japanese volunteers

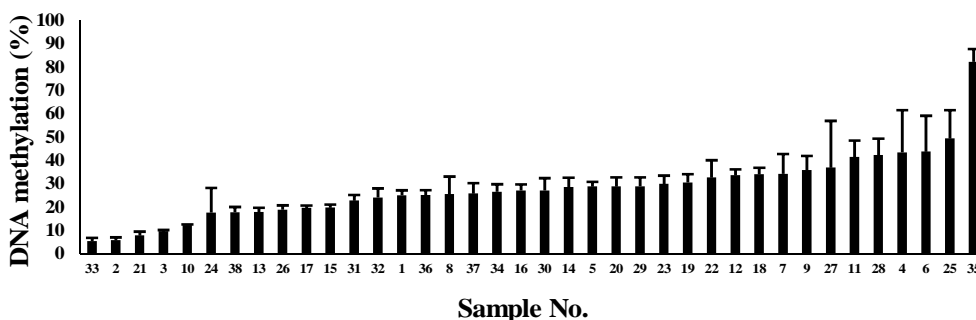


図 5 Methylation analysis in immunoprecipitated-fractions obtained from healthy volunteers (n= 38)

Methylation frequency at four CpG sites (A) and its average (B) in volunteers. Methylation frequency of each CpG site was determined by pyrosequence.

## ミダゾラムを用いた臨床試験

ドルミカム注射液 10 mg、0.3 mL を静脈内投与後 24 時間までの各採血ポイントにおけるミダゾラムおよび活性代謝物 (1-OH ミダゾラム) の血漿中濃度を LC/MS/MS を用いて測定し、ノンコンパートメント解析を行った。CYP3A4 活性には、ミダゾラムと活性代謝物の AUC 比を用いた。CpG island の DNA メチル化頻度がヒト肝臓における CYP3A4 活性を予測するバイオマーカーとなるかについて評価するため、DNA メチル化頻度とミダゾラム活性の相関解析を行った。本検討では、検体 No.6 の CYP3A4 活性を 1 とした際の相対的な酵素活性を示した。CYP3A4 活性と DNA メチル化頻度について相関解析を行ったところ、負の相関傾向を認めた。

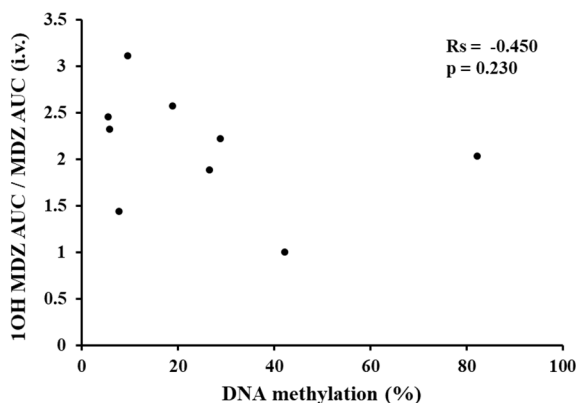


図 6 Correlation analysis between hepatic CYP3A4 activity and DNA methylation of CpG island in healthy subjects (n= 9)

Hepatic CYP3A4 activity was determined to the ratio of the AUC pf midazolam (i.v.) relative to the AUC of 1-OH midazolam (i.v.) and normalized to sample No.6. DNA methylation level was analyzed by pyrosequence. The Rs

## (3) まとめ

本研究で構築した肝由来細胞分離法により、末梢血から肝由来細胞を分離できることが示された。本分離法は、末梢血からの分取という比較的低侵襲的な検体採取法に基づいており、臨床現場での使用を考えた場合に非常に有用性が高いと言える。免疫磁気分離での標的を別の抗原に変えることで、肝臓以外の他臓器由来の細胞においても分離を行うことができる可能性を有し

ており、汎用性の高い細胞分離法と言える。事実、我々の研究室では、小腸由来のエクソゾームの抽出を血液を試料に確立させている。

以上の知見より、本研究により、DNAメチル化がCYP3A4活性予測のマーカーとして応用可能であることが示唆された。本知見は医薬品開発や医薬品の個別適正化使用に有用となる。

#### <引用文献>

1. Zhou, S. F., Xue, C. C., Yu, X. Q., Li, C. & Wang, G. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.* 29, 687-710 (2007).
2. Zhou, S.-F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Curr. Drug Metab.* 9, 310-322 (2008).
3. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414-423 (1994).
4. Werk, A. N. & Cascorbi, I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96, 340-348 (2014).
5. Uysal, F., Akkoyunlu, G. & Ozturk, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie* 116, 103-113 (2015).
6. Illingworth, R. S. & Bird, A. P. CpG islands - 'A rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713-1720 (2009).
7. Hirota, T., Ieiri, I., Takane, H., Maegawa, S., Hosokawa, M., Kobayashi, K., Chiba, K., Nanba, E., Oshimura, M., Sato, T., Higuchi, S. & Otsubo, K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum. Mol. Genet.* 13(23), 2959-69 (2004).
8. Dannenberg, L. O. & Edenberg, H. J. Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: Expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics* 7, 1-12 (2006).
9. Lehmann-Werman, R. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1826-E1834 (2016).
10. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* (80-. ). 331, 1559-1564 (2011).
11. Vicki Plaks, Charlotte D, Koopman, Z. W. Circulating Tumor Cells. *Methods Mol Biol* 213-219 (2018). doi:10.7551/mitpress/8876.003.0036
12. Green, B. J. et al. Beyond the Capture of Circulating Tumor Cells: Next-Generation Devices and Materials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 1252-1265 (2016).
13. Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* 59, 110-118 (2013).
14. Li, Y. M. et al. Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. *Cell Death Dis.* 4, (2013).
15. Xu, W. et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin. Cancer Res.* 17, 3783-3793 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

|  |                  |                   |
|--|------------------|-------------------|
| 産業財産権の名称<br>DNAメチル化解析方法ならびにCYP3A4発現量推定方法 | 発明者<br>家人一郎、廣田 豪 | 権利者<br>国立大学法人九州大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、6482087                | 取得年<br>2019年     | 国内・外国の別<br>国内     |

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 廣田 豪<br><br>(Hirota Takeshi)<br><br>(80423573) | 九州大学・薬学研究院・准教授<br><br><br><br>(17102) |    |