

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390044
 研究課題名（和文） 薬物動態関連遺伝子の多型に代わる発現メカニズムの多様性とヒト機能
 解明への展開

研究課題名（英文） Alternative mechanisms of gene regulation for pharmacokinetics
 related genes

研究代表者

樋口 駿 (HIGUCHI SHUN)
 九州大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：40218699

研究成果の概要（和文）：

遺伝子多型に代わるメカニズムとして、本研究では1. 遺伝子の数の多型であるコピーナンバー、2. 遺伝子発現を制御することが近年報告されている機能性小分子RNAであるマイクロRNA、3. 親由来により遺伝子発現が異なるゲノムインプリントについて解析を行った。その結果、1. 癌部においては一部の検体においてコピーナンバーは増大すること、2. 抗癌剤5-FUの代謝酵素であるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの制御に複数のマイクロRNAが関与すること、3. 有機カチオントランスポーターの個人差にゲノムインプリントが影響していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on copy number variation, microRNA and genome imprinting. Copy number was increased in human tumor tissues compared to normal counter parts. Dihydropyrimidine dehydrogenase was repressed by some miRNAs. Inter-individual difference in human organic cation transporter was responsible for loss of imprinting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：(1) コピーナンバー多型 (2) miRNA (3) インプリンティング

1. 研究開始当初の背景

薬物の体内動態や効果に見る大きな個人差を個々の遺伝子の配列の違いすなわち遺伝子多型から説明する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、かなり詳細な多型解

析が実施されているにも関わらず、多型が表現型（薬物血中濃度等）と一致しない事例が多く経験されつつある。さらに遺伝子多型により個人差の大中小といった大まかな説明は可能であるものの各群内に依然残される

個人差を精度よく説明する方法論の提唱などの研究報告は殆ど見られない。一塩基多型のみならず、遺伝子そのものの数による多型や翻訳に作用することが知られる miRNA、配列非依存的に転写を制御するエピジェネティックメカニズムといった遺伝子機能調節メカニズムにより遺伝子機能の個人差がもたらされている可能性が考えられる。研究開始時において、これらについて薬物の体内動態や薬効の個人差の原因と位置付けて行われた研究は国内、国外ともに報告がない状態であった。

2. 研究の目的

(1) コピーナンバー多型

薬物動態関連遺伝子を中心に複数の遺伝子について、肺癌組織と同非癌部を対象にコピーナンバー多型の解析ならびのその発現量への影響を評価する。

(2) miRNA

5-FU 代謝に最も重要である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) 遺伝子について miRNA の制御を受けているのかについて検討する。

(3) インプリンティング

有機カチオントランスポーターについてヒト胎盤を対象にインプリンティング解析を行い、その発現量への影響を同定する。上記3つのアプローチにより、薬物動態の個人差について新規メカニズムに基づく解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) コピーナンバー多型

対象の遺伝子として、非小細胞肺癌の治療に用いられるカルボプラチン(プラチナ系薬物)、パクリタキセル・ドセタキセル(タキサン系薬物)、5-FU の代謝・輸送に関与するものを選択した。代謝に関与する遺伝子として、GSTP1, OPRT, UMPK, TP, DPD、輸送に関与する遺伝子として ATP7A, ATP7B, CTR1, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCC11, ABCG2, ENT1 を挙げた。また 5-FU の標的部位として TS についても同様に解析を行った。これらの遺伝子について、癌部と非癌部における Copy Number と mRNA 発現量をそれぞれ測定した。測定には Real Time PCR を用い、比較 Ct 法の一つである Pfaffl 法により算出した。

(2) miRNA

がん細胞 HepG2 に precursor miRNA を一過性にトランスフェクトし、48 時間後の Luciferase activity の抑制効果を検討した。miRNA が内在性の DPD 発現に影響するかの検討を、DPD 高発現株 MIAPaCa-2 細胞に

precursor miRNA を一過性にトランスフェクトし、48 時間後の DPD protein、DPD mRNA の定量を行った。

肺癌手術で外科的に切除された正常肺組織、ガン部肺組織における DPD protein、DPD mRNA、miR-27a、miR-27b、miR-134、miR-582-5p の発現量の定量を行い、それらの相関解析を行った。

(3) インプリンティング

インプリント解析は、ヘテロ型変異をマーカーとして、RT-PCR 法によりアリルを区別して発現を解析した。OCT1、2 を含む各遺伝子発現量を Real-time PCR 法によって定量した。また各遺伝子のプロモーター領域、および上流域の DNA メチル化状態を COBRA 法、ヒストンメチル化状態、ヒストンアセチル化状態を ChIP assay により解析した。

4. 研究成果

(1) コピーナンバー多型

非小細胞肺癌における治療に用いられる抗癌剤の輸送・代謝に関与するとされる 16 種類の標的遺伝子と内標準遺伝子 RNase P について、非癌部と肺癌部における copy number を Real time-PCR により測定した。その結果を、非癌部について Fig. 1 (A) に、癌部について Fig. 1 (B) に示す。標的遺伝子の内、ATP7A は性染色体である X 染色体上に存在するため、男性では Copy number = 1、女性では Copy number = 2 となっている。ATP7A 以外の遺伝子は常染色体上に存在するため、Copy number は通常 2 である。今回、Copy number の測定・mRNA 発現量の定量には、Real-time PCR を用い、比較 Ct 法の一つである Pfaffle 法) により解析を行った。従来用いていた $\Delta\Delta Ct$ 法では、DNA 濃度によらず増幅効率が 2、つまり PCR 反応 1 サイクル毎に生成物が 2 倍になると仮定しているため、内標準遺伝子と標的遺伝子の増幅効率が同等であることが必須である。一方、今回用いた Pfaffle 法では、primer 毎に予め検量線を作成し、検量線の傾き (slope) から増幅効率を算出する ((1) 式)。この増幅効率を各 primer 固有の値として用いるため、 $\Delta\Delta Ct$ 法のように内標準遺伝子と標的遺伝子の増幅効率が等しくなくても用いることができる。それぞれの遺伝子について、全検体の Ct 値の中央値を基準として補正を行い、さらに内標準遺伝子である RNase P に対する相対値として Copy number を算出した ((2) 式, (3) 式)。

$$\text{Efficiency (E)} = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

・・・(1) 式

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

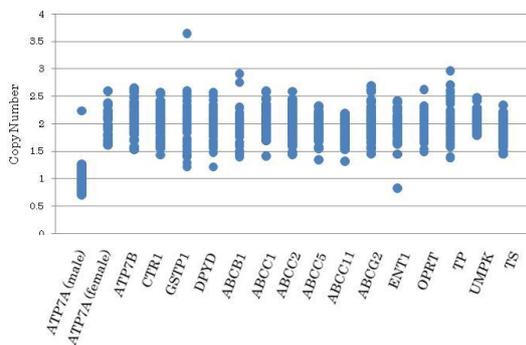
・・・(2) 式

$$\text{Copy Number} = \text{Ratio} \times 2$$

・・・(3) 式

非癌部において、ほとんどの PK/PD 関連遺伝子では相対 Copy number は 2 付近であった。ATP7A (male), GSTP1, ABCB1 において Copy number が増加した検体が存在し、ENT1 においては減少している検体が存在した。癌部においては、非癌部と比較して全体的にバラつきが大きくなる傾向にあり、ATP7B, CTR1, GSTP1, ABCB1, ABCC2, ABCC5, ABCC11, ENT1, OPRT においては Copy number が顕著に増加している検体が存在した。

(A) Normal tissue



(B) Tumor tissue

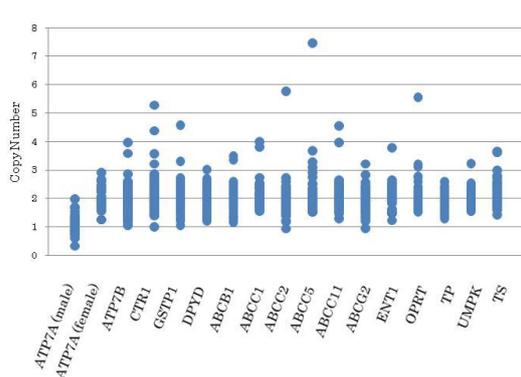


Fig. 1

Relative copy number of PK/PD related genes of anticancer drugs in NSCLC patients.

Relative copy number of target gene refers to the ratio of the quantity of target gene to that of RNase P gene on the relative standard curve method (Pfaffl method).

mRNA の相対発現量の測定を各遺伝子につ

いて行った。内標準遺伝子としては GAPDH を用いた。

定量結果を非癌部について Fig. 2 (A) に、癌部について Fig. 2 (B) に示した。定量には、Copy number のスクリーニングと同様に Real-time PCR を用い、Pfaffle 法により解析を行った。各遺伝子について検量線を作成し、(1) 式から増幅効率を求めた。各遺伝子における全検体の Ct 値の中央値により補正し、さらに GAPDH に対する相対的な mRNA 発現量として算出した ((2) 式)。

$$\text{Efficiency (E)} = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

・・・(1) 式

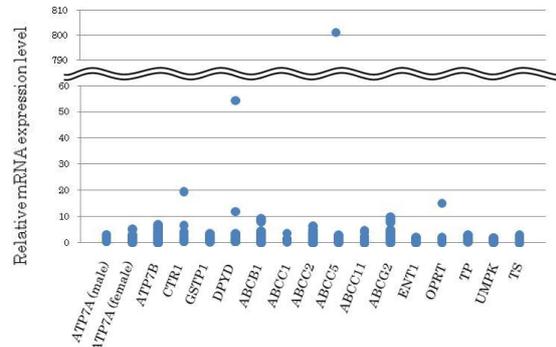
Relative mRNA expression =

$$\frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

・・・(2) 式

非癌部において多くの遺伝子では、mRNA 相対発現量は概ね 10 以下となっているが、CTR1, DPYD, ABCC5, OPRT においては mRNA 相対発現量が顕著に増加している検体が存在した。癌部においては、ATP7B, ABCB1, ABCC11 において mRNA 相対発現量が突出している検体が存在した。また、ABCC2, TS においては全体的にバラつきが大きくなり、相対発現量が 10 以上となった検体が複数存在した。

(A) Normal tissue



(B) Tumor tissue

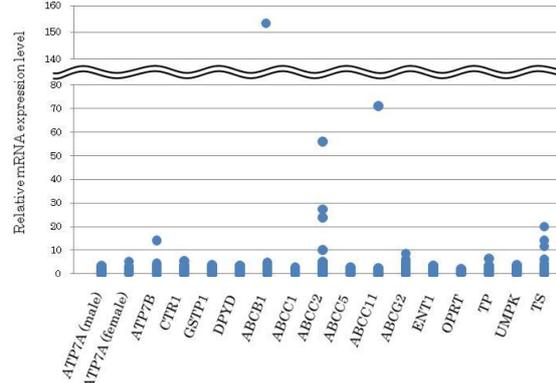


Fig. 2

Relative mRNA expression level of PK/PD related genes of anticancer drugs in NSCLC patients. Relative mRNA expression level of target gene refers to the ratio of the quantity of target gene to that of GAPDH gene on the relative standard curve method (Pfaffl method).

Copy number には癌部・非癌部ともに検体間でバラつきのある遺伝子が存在し、mRNA 相対発現量についても癌部・非癌部ともに検体間で差がみられることが分かった。Copy number の変動に伴い、鋳型となる配列の増加や染色体の構造の変化が生じるため、mRNA 発現量にも何らかの影響が及ぶ可能性が考えられる。

いずれの遺伝子も、Copy number が増加した検体であっても、mRNA 相対発現量に顕著な影響はみられなかった。また、mRNA 相対発現量が増大あるいは減少した検体であっても、Copy number は正常なものがほとんどであった。この結果から、非小細胞肺癌において抗癌剤の輸送・代謝に関与する遺伝子の Copy number は mRNA の発現に直接的な影響は与えない可能性が考えられる。

(2) miRNA

miRNA は一般に標的遺伝子の 3' UTR に結合し、標的 mRNA の切断あるいは翻訳抑制を行う。近年、miRNA の target 認識に、target mRNA 側の SNPs が影響する可能性が示唆されているため miRNA の結合領域である DPYD 3' UTR の SNPs 状況を明らかにした。その結果 T3352C、G3651A、G3846A、C3858T の比較的頻度の高い 4 つの SNPs が見つかった。Haplotype 解析を行った結果、日本人と白人では主要な Haplotype パターンは異なり、人種差が認められた。DPYD 3' UTR を target site とする miRNA をデータベースによって検索した結果、hsa-miR-27a、hsa-miR-27b、hsa-miR134、hsa-miR-582-5p が結合すると予測された。Haplotype を考慮した Luciferase assay の結果、miR-27a、miR-27b、miR-134、miR-582-5p は DPYD 3' UTR を target とする可能性が示された。

さらに内在性 DPD 発現に miRNA が影響するかの検討を行った結果、miR-27a、miR-27b、miR-134、miR-582-5p は DPD protein を有意に減少させ、miR-27b、miR-134 での DPD protein 抑制効果は

DPD mRNA の抑制効果より大きかった (Fig. 3)。

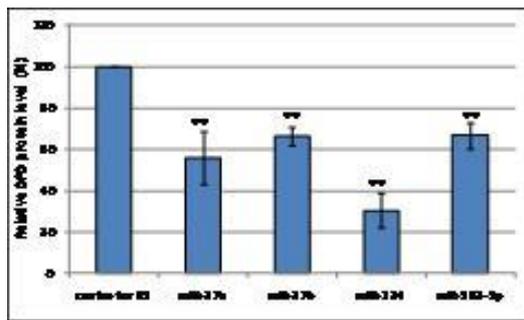


Fig. 3

Figure MIAPaCa-2 細胞における内在性 DPD protein に miR-27a、miR-27b、miR-134、miR-582-5p が与える影響

miRNA は組織特異的な発現を示し、ガン組織においてはさらに miRNA の expression が正常組織とは全く異なっていることも多い。正常肺組織とガン部肺組織における DPD 発現量と miRNA 発現量を定量し、DPD と miRNA の関係性を検討した。DPD protein はガン部において有意に高い発現を示し、正常肺組織とガン部肺組織において、各 miRNA の発現量を定量したところ、ガン部では miR-27b、miR-134 が有意に減少していた。正常組織において、各 miRNA 発現量と DPD protein の相関解析を行ったところ、miR-27b は DPD protein と負の相関傾向にあったが、miR-27a、miR-134、miR-582-5p との相関はみられなかった。ガン部において同様の検討を行ったが、4 つの miRNA はいずれも DPD protein との相関が認められなかった。正常組織では miR-27b によって発現制御されていた DPD が、ガン化により miR-27b の発現低下、DPD protein の高発現につながったと考えられる。本研究結果は、ガン化によって miR-27b による DPD 発現制御機構が破たんし、DPD 高発現につながる可能性を示した最初の報告である。近年では、血中で miRNA が非常に安定であり定量可能だということがわかってきた。今後組織と血中の miRNA との関係性が認められれば、血液サンプルから DPD 活性を予測できる可能性があり、抗腫瘍効果予測や、副作用予測の一助となることが期待される。

(3) インプリンティング

ヒト OCT2 遺伝子はインプリント遺伝子であり、一部の検体で Loss of imprinting (LOI) を示す両アレルの発現が認められた。

Table 1. Allelic expression of OCTs genes

Tissue	Transporter	Allele expression	
		MAE	BAE
Japanese Placenta	OCT1	6	9
	OCT2	4	8
	OCT3	0	7

MAE, Mono-allelic expression; BAE, Bi-allelic expression.

さらに片アリル発現検体と比較し、有意に発現量が高く (Fig. 4)、ヒストンメチル化と負の相関にあった (Fig. 5)。

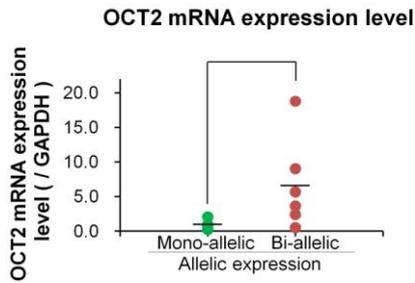


Fig. 4
片側アリル発現検体と両側アリル発現検体における OCT2 mRNA 発現量の比較

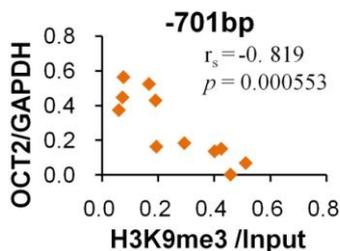


Fig. 5
ヒト胎盤におけるヒストンメチル化と OCT2 mRNA 発現量との関連

ヒト OCT2 遺伝子発現量の個人差は、LOI により生じていることが示唆された。またヒストンアセチル化は遺伝子のアリル発現活性に、ヒストンメチル化は発現抑制に働くことが示された。これまで、マウス Airn 遺伝子や他のインプリント遺伝子は、ヒストン修飾を介してクラスター内遺伝子の発現を制御していることが報告されており、OCT2 遺伝子はヒストン修飾を介して発現制御される可能性が示唆された。

(1)、(2)、(3) の結果より、コピーナンバ多型については遺伝子機能の個人差への影響を認めなかったが、miRNA とゲノムインプリンティングについてはその重要性が明らかとなった。従来からの遺伝子多型による遺伝子機能の個人差要因の解析に加えて、miRNA やインプリンティングを含むエピジェネティクスの変動を解析因子に加えることが薬物療法の個別適正化に向けて非常に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 齊藤順平

ヒト胎盤における OCT 遺伝子のインプリント解析と個人差に関する検討

日本薬学会第 130 年会

平成 22 年 3 月 28 日

岡山

② 伊達祐子

microRNA によるヒト DPD (*DPYD*) 個人差要因解明

日本薬学会第 130 年会

平成 22 年 3 月 28 日

岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 駿 (HIGUCHI SHUN)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40218699

(2) 研究分担者

家入 一郎 (IEIRI ICHIRO)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60253473

廣田 豪 (HIROTA TAKESHI)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80423573