

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590451

研究課題名(和文) エピジェネティクス機構による薬物代謝動態の変動要因の解明と個別化薬物治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic mechanisms on the regulation of drug metabolizing enzymes and its application to personalized drug therapy

研究代表者

幅野 渉 (HABANO, WATARU)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬物代謝酵素(DME)の発現変動におけるDNAメチル化の役割を網羅解析により探索した。その結果、DNAメチル化と発現量が関係するDME遺伝子が、正常肝組織において7種、肝癌細胞において5種、同定された。またUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1Aアイソザイムの組織特異的・年齢依存的なスプライシングがDNAメチル化と関係することも明らかになった。一部のDMEでは、DNAメチル化模様の特徴から癌抑制またはハウスキーピング遺伝子と同様の役割が推測された。網羅解析に基づくDNAメチル化模様の詳細な解析により、DME遺伝子の発現制御に関わるDNAメチル化の多様な役割を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the biological significance of DNA methylation in the regulation of drug metabolizing enzyme (DME) genes by genome-wide integrative analysis. Among normal livers, 7 DME genes showed significant inverse correlations between DNA methylation and mRNA expression. In hepatoma cells, treatment with a demethylating agent resulted in upregulation of 5 DME genes, which could be explained by DNA methylation status. Tissue-specific and age-dependent expression of UDP-glucuronosyl transferase 1A splicing variants could be explained by DNA methylation status. Interestingly, some DME genes had unique methylation features similar to those observed in tumor-suppressor or housekeeping genes. Analysis of the DNA methylation landscape facilitated elucidation of the role of DNA methylation.

研究分野：人体病理学

キーワード：薬物代謝変動 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

薬物応答性には著しい個体間変動が認められる。その多くは薬物動態の変動、すなわち吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) 過程における変動が原因となる。例えばシトクロム P450 (CYP) 分子種 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 が関わる薬物代謝では、遺伝子多型により代謝能の個体差を生じる。だが CYP3A4 のように、代謝活性の個体間変動を遺伝子多型で説明できない分子種も存在する。

薬物動態の変動は個体内でも変動する。例えば UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 1A には 9 種のアイソザイムが存在し、年齢依存的または組織特異的な可変プライシングにより発現が制御される。このような個体内の変動は遺伝子多型で説明することはできない。

我々はエピジェネティクス機構に着目し、薬物動態の変動に関わる可能性を探索してきた。そして大腸癌細胞において、DNA メチル化により *CYP1B1* および *PXR* 遺伝子の発現が制御抑制されることを見出した (文献 1、2)。他の研究を含めると、現在までに 50 種以上の ADME 関連遺伝子において、エピジェネティクス機構による発現制御が証明されている。だが大半の遺伝子は、癌細胞を対象に癌抑制遺伝子を探索する過程で付随的に発見されたものである。そのため、薬物動態の変動に焦点をあて考察された研究はほとんどない。したがって、ADME 関連遺伝子の発現制御に関わるエピジェネティクス機構の意義は、明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト正常組織 (肝臓、小腸、結腸) と肝臓癌細胞を対象に、DNA メチル化

および遺伝子発現の網羅解析を行う。GEO (Gene Expression Omnibus) に登録された同様のデータと統合し解析することにより、DNA メチル化により発現制御される薬物代謝酵素 (DME) 遺伝子を探索する。正常組織および癌細胞における薬物代謝酵素遺伝子の詳細な DNA メチル化の様相 (DNA methylation landscape) を調べることにより、個体間および個体内変動に関わる DNA メチル化の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞培養・薬剤処理

ヒト肝臓癌細胞 (HepG2、HuH7、JHH1) を 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地中で、5%CO₂ 存在下、37 °C で培養した。DNA の脱メチル化には、0.5 または 5 μ M の 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) を 72 時間、脱アセチル化の阻害には 200 nM (HepG2、HuH7) または 20 nM (JHH1) の Trichostatin A (TSA) を 24 時間、それぞれ処理した。

(2)ゲノム DNA、total RNA の調製

肝臓癌細胞より、ゲノム DNA および total RNA を抽出した。ヒト各種組織、すなわち成人肝臓 (NLA、NL2)、胎児肝臓 (NLF)、成人小腸 (NSI) および成人結腸 (NC) の DNA および RNA は、購入したものをを用いた。

(3)DNA メチル化解析

各ゲノム DNA を sodium bisulfite 処理にて非メチル化シトシンをウラシルに変換した。HumanMethylation450 Bead Chip (イルミナ社) を用いて約 48 万箇所の CpG 部位のメチル化レベルを解析し、 β 値 ($0 < \beta < 1$) により評価した。このうち 55 種の CYP、62 種の第 II 相薬物代謝酵素 (PIIDME) およびコントロールとして 6 種 (*ACTB*、*GAPDH*、*BMP4*、

IGFBP3、MLH1、MGMT) のデータを抽出し、クラスター解析(Cluster 3.0)を行った。個別の遺伝子の DNA メチル化解析には、COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法を用いた。

(4)mRNA 発現量の解析

mRNA 発現量の網羅解析には、SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60K v2 microarray (アジレント社) を用いた。個別の遺伝子の発現量の解析には、リアルタイム定量 PCR 法を用いた。

(5)統合解析に用いた GEO データセット

ヒト正常肝臓組織 18 例を対象に同様の HumanMethylation450 を用いた解析データ (GSE48325) を GEO より得て我々のデータと統合した。このうち 10 例については、mRNA 発現量の網羅解析データも登録されており (GSE48452)、DNA メチル化と発現量の相関を評価するために用いた。

(6)DNA methylation mapping

20 例の肝臓組織間における各遺伝子の DNA メチル化レベルの変動の大きさは、methylation mapping により評価した。まず各 CpG 部位における DNA メチル化レベル(β 値) の個体間変動を箱ひげ図で表した。次に各遺伝子につき、5'非翻訳領域の中で β 値の最大値と最小値の差が最大となる CpG 部位を選出し、その値を β_R 値と定義して、変動の大きさの指標とした。さらに、組織・細胞間で DNA メチル化レベルの異なる CpG 部位を探索するために、各 CpG 部位の距離を考慮した折れ線グラフを作成した。

4. 研究成果

(1)DNA メチル化プロファイル

クラスター解析の結果、肝臓、小腸、結腸

および肝臓癌細胞の間で、DNA メチル化状態は著しく異なった。20 例の肝臓組織の DNA メチル化状態はよく類似したが、差の大きい CpG 部位も散見された (図 1)。

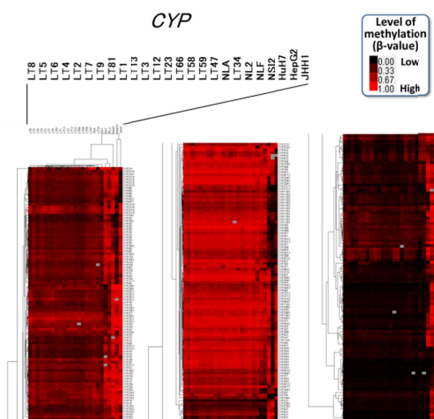


図 1 クラスター解析によるヒートマップ

そこで methylation mapping により算出した β_R 値を用いて各遺伝子のメチル化レベルの変動の大きさを評価した。DNA メチル化の変動が小さいコントロールとして、個体間での発現量の差が小さいと予測されるハウスキーピング遺伝子、癌抑制遺伝子、DNA 修復遺伝子を用いた。調べた 6 種のコントロールの中では IGFBP3 遺伝子の β_R 値が 0.296 で最大であった。そこで、 β_R 値がこれよりも大きい 37 種 (32%) の DME 遺伝子が、DNA メチル化の変動が大きいと判断した (図 2)。

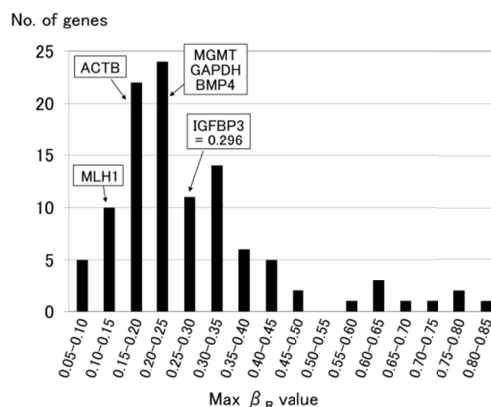


図 2 β_R 値の分布

(2) 肝臓組織での DME 遺伝子の発現制御

DME 遺伝子の多くは、10 例の肝臓組織間での mRNA 発現量の変動が大きかった。DNA メチル化レベルと mRNA 発現量が逆相関する DME 遺伝子として 7 種 (*CYP1A2*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*GSTA4*、*GSTM5*、*GSTT1*、*SULT1A1*) が同定された (図 3)。これらの DME 遺伝子は、DNA メチル化により発現が抑制され、個体間の発現変動の原因となる可能性が示唆された。

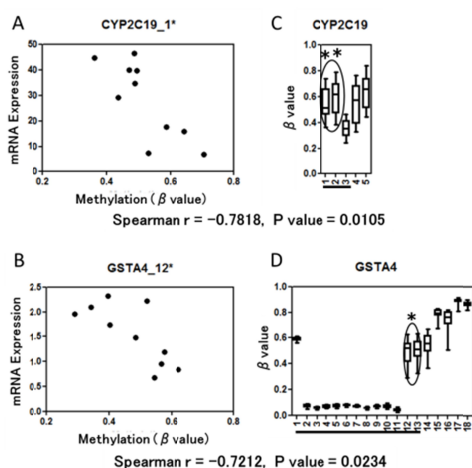


図 3 メチル化と mRNA 発現量の相関

(3) 肝臓癌細胞での DME 遺伝子の発現制御

正常肝組織 (NL2) と比べ肝臓癌細胞において過剰にメチル化された DME 遺伝子は 36 種検出された。また、脱メチル化剤 DAC の処理により、44 種の DME 遺伝子の mRNA 発現量が増加した。これらの発現量の増加を DNA メチル化で説明できる遺伝子として 5 種 (*CYP1B1*、*CYP8B1*、*GSTM2*、*GSTP1*、*UGT3A2*) が同定された。これらの DME 遺伝子の DNA メチル化状態と mRNA 発現量は、COBRA 法とリアルタイム定量 PCR によっても確認された。すなわち、5 種の DME 遺伝子は、肝臓癌細胞において DNA メチル化により発現が制御されることがわかった。

(4) UGT1A アイソザイムの発現制御

ヒト組織 RNA を対象にリアルタイム定量 PCR を行った結果、UGT1A アイソザイムは肝臓特異的発現タイプ (*UGT1A1*、*UGT1A3*、*UGT1A4*、*UGT1A6*、*UGT1A9*) と小腸特異的発現タイプ (*UGT1A5*、*UGT1A7*、*UGT1A8*、*UGT1A10*) に分類された。この UGT1A の組織特異的な発現は、各アイソザイムの第 1 エクソンの DNA メチル化状態とよく相関した (図 4)。

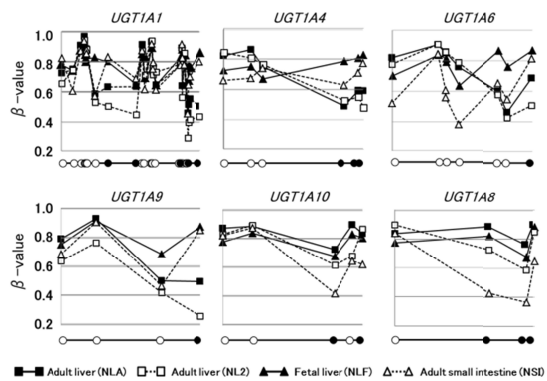


図 4 UGT1A 遺伝子の DNA メチル化

また、肝臓特異的発現タイプの UGT1A 遺伝子では、胎児肝臓細胞においてより高い DNA メチル化レベルが検出された。すなわち UGT1A の組織特異的および年齢依存的な選択スプライシングの違いが、DNA メチル化により制御される可能性が示唆された。

(5) DNA メチル化状態による DME の分類

DNA メチル化模様を考慮すると、DME 遺伝子を 3 つのタイプに分類することができた (図 5)。第 1 のタイプは、正常肝組織におけるメチル化レベルの変動が大きく ($\beta_R > 0.296$)、mRNA 発現量と逆相関する (2) で検出された 7 種の遺伝子である (HVM type)。いずれも重要な薬物を代謝する DME であり、代謝変動が大きいことが臨床問題となっている。その原因が DNA メチル化である可能性を見出

した本研究の意義は大きい。第2のタイプは、正常肝組織でのDNAメチル化の変動は小さいが、肝癌細胞におけるDNAメチル化による発現抑制が証明された(3)の5種の遺伝子である(TSG type)。正常および癌細胞におけるDNAメチル化の様子が癌抑制遺伝子のそれと極めて類似することから、DME遺伝子が癌抑制遺伝子様のはたらきをする可能性が示唆された。第3のタイプは、正常および癌細胞のいずれにおいてもDNAメチル化が低レベルで保持される遺伝子で、*CYP2R1* と *CYP46A1* が検出された(HKG type)。

興味深いことに、HMV typeには主に外因性基質を代謝するDMEが多く含まれた。薬物の暴露(環境変化)に応じてDNAメチル化を柔軟に書き換えることのできる”plastic”な変化が備わり、個体間変動が大きくなった可能性が考えられる。一方、HKG typeは主に内因性基質を代謝するDMEであった。ハウスキープ遺伝子の役割を考えると、その発現はDNAメチル化により厳格に制御される必要がある。そのためDNAメチル化は”rigid”に保持されているのかも知れない。

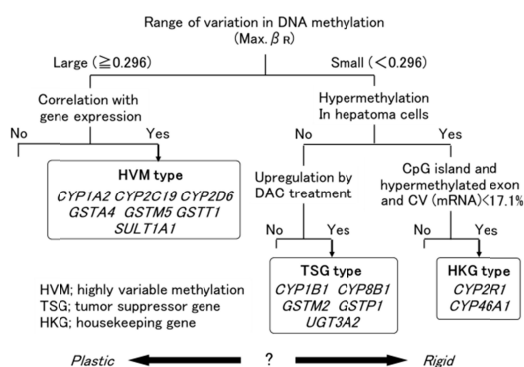


図5 DNAメチル化模様によるDMEの分類

DNAメチル化模様を眺めることにより、DMEの未知の機能を推測できる可能性があり、今後のさらなる研究が必要と思われた。

<引用文献>

- 1) Habano et al. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. BMC Cancer. 2011;11:81.
- 2) Habano et al. CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. Int J Oncol. 2009;34(4):1085-91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Gamou T et al. A CAR-responsive enhancer element locating approximately 31 kb upstream in the 5'-flanking region of rat cytochrome P450 (CYP) 3A1 gene. Drug Metab Pharmacokinet. 2015;30(2):188-97.
- 2) Terashima J et al. An aryl hydrocarbon receptor induces VEGF expression through ATF4 under glucose deprivation in HepG2. BMC Mol Biol. 2013;14:27.
- 3) Nemoto K et al. Change in the gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit by dietary β -naphthoflavone, indole-3-carbinol, or acetaminophen in the rat liver. J Toxicol Sci. 2013;38(4):611-7.

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 幅野 涉、小澤正吾 DNAメチル化機構に着目した薬物代謝変動要因の探索(第87回日本生化学会大会シンポジウム、京都、2014年)
- 2) 幅野 涉 オミクス情報を活用した薬物代謝変動要因の探索(第46回日本臨床検査医学会東北支部総会、盛岡、2014)

3) Habano W, Ozawa S. DNA methylation profile of ADME- related genes and its implications in pharmaceuticals. (日本薬物動態学会第 28 回年会、東京 2013 年)

〔図書〕(該当なし)

〔産業財産権〕(該当なし)

〔その他〕

ホームページ <http://www.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

幅野 渉 (HABANO, Wataru)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332979

(3)連携研究者

菅井 有 (SUGAI, Tamotsu)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号・20187628