

平成23年6月6日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21790165

研究課題名(和文)

薬物動態関連遺伝子の量的多様性発現への肝転写因子HNF3およびHNF6の関与

研究課題名(英文) Associations of hepatocyte nuclear factors HNF3 and HNF6 to quantitative variation of drug metabolizing enzymes

研究代表者

大関 健志 (OZEKI TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝情報解析チーム・研究員

研究者番号： 30334402

研究成果の概要(和文)：

本研究では、HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域における遺伝的多型を探索し、各転写因子の機能におよぼす質的あるいは量的な影響を考察することを目的とした。当該遺伝子を含む領域における tag-SNPs を HapMap より抽出し、抗癌剤であるドキソルビシン投与による消化器毒性の発現を指標とした関連性解析を行った。その結果、HNF3 γ 遺伝子 5'-上流領域において 2 箇所、HNF6β 遺伝子 3'-非翻訳領域において 1 箇所の、ドキソルビシンによる消化器毒性発現と関連性が認められる SNPs を同定した。

研究成果の概要(英文)：

In the present study, I investigated genetic polymorphisms of the HNF3 and HNF6 genes, and carried out an association study. Tag-SNPs containing the HNF3 and HNF6 genes were chosen by using a HapMap database, and performed an association study concerned with the appearance of the digestive organ toxicity by the doxorubicin. As a result, 2 SNPs located in the 5'-flanking region of the HNF3 gamma gene and a SNP in the 3'-downstream region of the HNF 6 beta gene showed significant associations with the digestive organ toxicity by the doxorubicin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：遺伝子、発現制御、薬剤反応性、転写因子

1. 研究開始当初の背景

医薬品の代謝に個体差が存在することは以前から知られている。その個体差の原因としては、薬物代謝酵素の酵素活性が、遺伝、薬物投与、年齢、性、人種、妊娠、疾病、食餌、化学物質への曝露など様々な因子によって影響を受けることが挙げられている。これらの因子のうち、遺伝的な多型によるものについては、主にチトクローム P450 (cytochrome P450、CYP)、グルタチオン S-転移酵素 (glutathione S-transferase、GST)、N-アセチル転移酵素 (N-acetyltransferase、NAT) および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronyltransferase、UGT) などにおいて様々な知見が得られている。

これまでに明らかにされてきた薬物代謝酵素の遺伝的多型による個体差発現の分子機構は、主に 3 種類に分類される。すなわち、1) 遺伝子の翻訳領域あるいはイントロンにおける塩基置換もしくは塩基の欠失による異常酵素の産生 (CYP2A6、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5、NAT1 および NAT2 遺伝子など)、2) 遺伝子全翻訳領域の欠失による酵素欠損 (CYP2A6、CYP2D6、GSTM1 および GSTT1 遺伝子など)、さらに、3) 遺伝子の転写調節領域における塩基置換もしくは塩基挿入による転写活性の低下 (UGT1A1 遺伝子など) である。また、薬物投与、食餌あるいは化学物質への曝露によって酵素の発現が誘導されることが、薬物代謝酵素の活性における個体差発現の原因の一つであると考えられている。その例としては、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A4 および CYP4A11 などが挙げられる。

申請者らはこれまで、肝において大きな量的個体差を示す薬物代謝酵素であるジヒドロジオール脱水素酵素 (DD4) の個体差発現の分子機構の解析を行い、上述の既知の機序に加えて、新しい分子機構として、同酵素の量的個人差が、DD4 遺伝子の調節に関わる転写因子である hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α 、HNF4 α および HNF4 γ に認められる協調的な量的差異により引き起こされていることを提唱している (Ozeki, T. *et al.*, Pharmacogenetics, 13 (1) 49-53 (2003))。興味深いことに、HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ は、CYP および UGT 各分子種の肝における構成的発現に関わる転写因子であることが知られており、これらの各転写因子と CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 および UGT2B7 mRNA の発現との間における量的協調性を示唆する知見も得られている。

HNF1 α および HNF4 α の発現量を規定する因子としては、転写因子 HNF3 および HNF6 が挙げられる。これまでの申請者らによる予備的検討により、HNF1 α および HNF4 α 遺伝子

においては、これらの転写因子の量的多様性を説明し得る遺伝的多型は認められなかった一方、HNF3 遺伝子の転写調節領域において、同遺伝子の転写活性に影響を及ぼす可能性のある遺伝的多型を見出している。以上の背景より、申請者は HNF3 および HNF6 遺伝子の転写調節機構、またその変動要因を解析することで、肝における転写因子の協調的発現調節を介した薬物動態関連遺伝子の個体差発現機構を明らかにするための知見が得られると考え、当該研究を立案した。

HNF1 α 遺伝子の転写は、HNF4 α および HNF4 γ によって調節されると考えられている。すなわち、HNF4 α および HNF4 γ は HNF1 α の上位に位置する転写因子であるとされている。また、申請者による以前の検討においても、ヒト肝において HNF4 α mRNA 量と HNF1 α mRNA 量との間に、また HNF4 γ mRNA 量と HNF1 α mRNA 量との間に高い相関性が認められた。一方、その詳細な機構は未知であるが、ラットにおいて、血漿浸透圧の減少時に HNF4 α の発現量が増加し、その発現量とアルブミン mRNA の発現量が有意な相関性を示すことが報告されている。ラットアルブミン遺伝子は HNF1 α および C/EBP によって転写調節を受けることが知られているため、HNF4 α の変動との直接的な関係は無いと思われる。しかし、HNF4 α 遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討により、HNF4 α の発現を欠失させると肝における HNF1 α およびアルブミン mRNA の発現もまた消失することが示されていることを考えると、ラットアルブミン遺伝子の転写活性は、HNF4 α の発現量が変動すると HNF1 α の発現量の変動を介して変動することが推測される。これらの知見と併せて考えると、肝における CYP および UGT 各分子種の転写活性もまた HNF4 α および HNF4 γ 、さらにこれらの転写因子の制御を受ける HNF1 α の発現量によって規定されているというモデルが考えられる。

HNF3 および HNF6 はマウス HNF4 α 遺伝子の転写調節に関与していることが報告されている。転写調節機構の解明は未だ成されていないものの、ヒト HNF4 α および HNF4 γ 遺伝子においても各遺伝子転写調節領域中の HNF3 および HNF6 結合配列は良く保存されていることより、これらの転写因子の両遺伝子の転写調節への関与が推測される。したがって、当該研究の一連の検討により HNF4 α および HNF4 γ 遺伝子の、HNF3 および HNF6 による転写調節機構が解明されることにより、HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ の被制御遺伝子と考えられている CYP および UGT 各分子種などの薬物動態関連遺伝子の肝における発現量の変動要因が明らかとなることを期待している。

2. 研究の目的

当該研究において、申請者は以下のことを明らかにしていくことを目的とした。

- (1) ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の遺伝的多型の

探索

ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域における遺伝的多型を探索し、各転写因子の機能に及ぼす質的あるいは量的な影響を考察する。

3. 研究の方法

(1) ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の遺伝的多型の探索

ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域における遺伝的多型を探索し、各転写因子の機能に及ぼす質的あるいは量的な影響を考察するために、申請者は以下の実験を行った。

①ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域を単離し、塩基配列を解析する。

②認められた遺伝的多型が翻訳領域のものであった場合、当該多型を有する cDNA より発現プラスミドを構築し、培養細胞内で強制発現させた際の HNF4・HNF1 mRNA 発現量への影響を、定量的 RT-PCR 法により検討する。

③認められた遺伝的多型が非翻訳領域のものであった場合、当該多型を有する 5'-上流領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、肝癌由来 HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行うことにより、転写調節への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の遺伝的多型の探索

①ヒト HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域の単離および塩基配列の解析

HNF3 および HNF6 遺伝子の全翻訳領域および 5'-上流領域における遺伝的多型を探索し、各転写因子の機能に及ぼす質的あるいは量的な影響を考察するために、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 、HNF6 α および HNF6 β 遺伝子を含む各領域における tag-SNPs を HapMap より抽出し、抗癌剤であるドキシソルビシン投与による消化器毒性の発現を指標とした関連性解析を行った。

その結果、HNF3 γ 遺伝子 5'-上流領域において 2 箇所 ($P = 8.1 \times 10^{-3}$, Odds ratio (OR) = 3.8 および $P = 6.5 \times 10^{-3}$, OR = 4.9)、HNF6 β 遺伝子 3'-非翻訳領域において 1 箇所 ($P = 2.6 \times 10^{-2}$, OR = 8.3) の、ドキシソルビシンによる消化器毒性発現と関連性が認められる SNPs を同定した (表 1)。

表 1. 関連解析 (HNF3 γ および HNF6 β)

SNP	Case, genotype			Control, genotype			P value (Fisher)		
	11	12	22	11	12	22	1 vs 2	vs 11	vs 22
HNF3 γ -1	1	11	16	4	33	13	3.48E-02	6.49E-01	8.07E-03
	0.04	0.39	0.57	0.08	0.66	0.26			
HNF3 γ -2	0	4	24	0	23	28	1.49E-02	1.00E+00	6.53E-03
	0.00	0.14	0.86	0.00	0.45	0.55			
HNF6 β -1	14	13	1	17	22	12	2.70E-02	1.58E-01	2.63E-02
	0.50	0.46	0.04	0.33	0.43	0.24			

②当該多型の HNF4・HNF1 mRNA 発現量への影響

①において認められた遺伝子多型は、いずれも翻訳領域には位置していなかったことから、当該検討は実施しなかった。

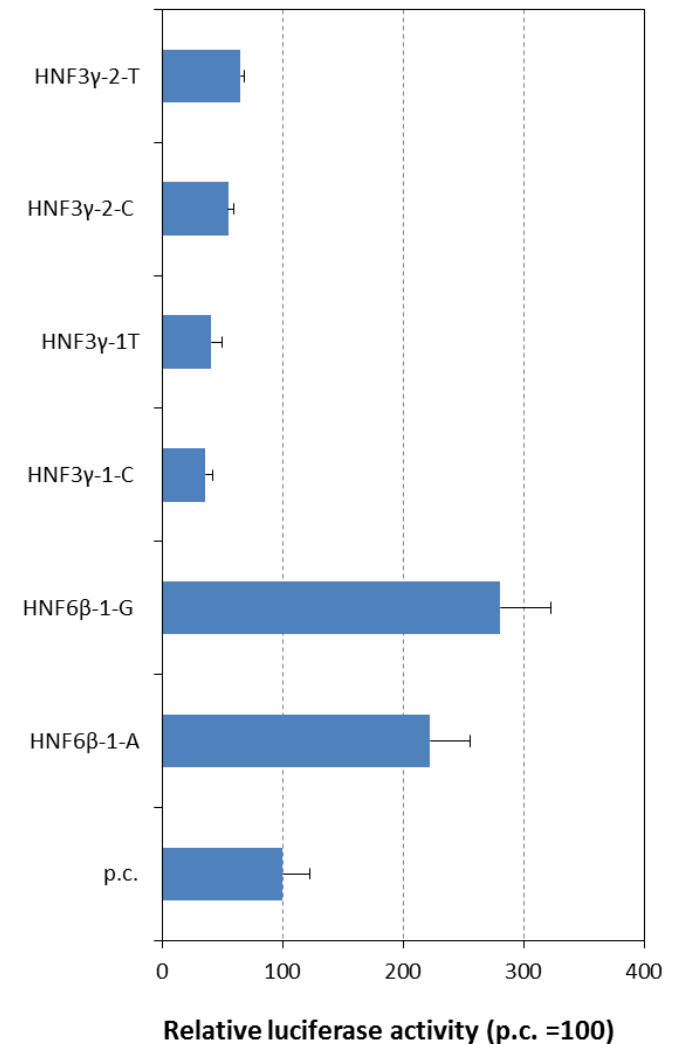


図 1. ルシフェラーゼアッセイ

p.c.、ポジティブコントロール (pGL4.23) (平均値 \pm S.D.)

③当該多型を有する 5' -上流領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドによるルシフェラーゼアッセイ

上記の SNP はいずれも、非翻訳領域に存在していた。そこでこれらの各 SNP をそれぞれ minimal promoter の上流に連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞にてルシフェラーゼアッセイを行い、各 SNP が転写活性に与える影響を検討した (図 1)。

各 SNP を含む領域は、minimal promoter に対して正もしくは負の調節能を示したが、SNP 間での調節能の違いは認められなかった。

したがって、これらの SNP は、連鎖不平衡にある別の SNP を介して間接的に HNF3 γ および HNF6 β の機能に影響をおよぼしている可能性が示された。

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 1 件)

①大関健志、蒔田泰誠、鎌谷直之、中村祐輔、ネフローゼ症候群患者における糖質コルチコイド感受性と NR3C1 遺伝子多型との関連性、日本人類遺伝学会第 55 回大会、2010 年 10 月 28 日、大宮

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大関 健志 (OZEKI TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝情報解析チーム・研究員

30334402