

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08402

研究課題名(和文) ゲノム不安定化に着眼したミコフェノールモフェチル個別化薬物療法の構築

研究課題名(英文) Development of individualization drug therapy for mycophenolate mofechil focused on the DNA methylation of UGT (UDP-glucuronosyltransferase) 1A8

研究代表者

須野 学 (SUNO, MANABU)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20621189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、非メチル化配列をもつ患者はトラフMPA血中濃度が低くなる傾向にあることを明らかにした。UGT1A8 5' フランキング領域におけるメチル化情報は、MMF個別投与量の設定、MPA血中濃度モニタリング時には有用な情報となることを見出した。本研究の限界点として、UGT1A8発現量の評価まで至っていない、加えて、腸に発現するUGT1A8の影響は評価できていない点がある。今後は、リアルタイムPCRを用いUGT1A8メチル化情報とUGT1A8発現量の差異を明らかにする。さらには、肝移植症例における腸管および肝臓でのUGT1A8に及ぼすメチル化の影響について研究を展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、UGT1A8 5' フランキング領域中-228に非メチル化配列をもつ患者では、ミコフェノール酸トラフ血中濃度が低くなる傾向にあることを明らかにした。これまでUGT1A8の一塩基多型を用いた遺伝子多型別では説明ができなかったミコフェノール酸トラフ血中濃度の個体差を、エピジェネティック解析を行う、すなわち、UGT1A8 5' フランキング領域におけるメチル化情報を得ることによって患者個々のミコフェノール酸モフェチルの投与量を設定を可能にし、薬剤師が行うミコフェノール酸血中濃度モニタリング時には有用な情報となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The results in this study revealed that patients with non-methylated DNA sequences in UGT1A8 5' flanking region tended to have lower trough mycophenolic acid blood concentrations. The information on methylation at the UGT1A8 5' flanking region was found to be useful for individualisation of mycophenolate mofechil doses and mycophenolic acid plasma concentrations monitoring in clinical settings. Limitations of this study include, the UGT1A8 expression level evaluation has not been established, and the effect of UGT1A8 expressed in the intestine has not been evaluated. In future, using real-time PCR, we will clarify the difference between UGT1A8 methylation information and UGT1A8 expression level.

研究分野：医療薬学

キーワード：メチル化DNA 免疫抑制薬 ミコフェノール酸 UGT1A8

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

薬物治療では、患者ごとに薬物応答性を考慮した有効かつ安全な治療（個別化薬物療法）が求められる。薬物応答性の個体差を生じる主な原因としては、シトクロム P450 (CYP) や UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの薬物代謝に関連する酵素の遺伝子多型が関与することが知られている。しかしながら、これらの遺伝子多型情報では説明できない個体間の代謝変動も存在する。ミコフェノールモフェチル (MMF) は、臓器移植に用いられる免疫抑制薬である。臨床上的特徴としては、MMF 使用は、タクロリムス投与量を減じ、免疫抑制薬の継続的治療を容易にすることによって、移植片対宿主病をコントロールできることが挙げられる。しかしながら、MMF の副作用（下痢および消化器症状）発現頻度には大きな個体差があることが臨床問題となっている。MMF は生体内のエステラーゼ等により、活性体であるミコフェノール酸 (MPA) に速やかに代謝される。この MPA は、UGT1A8 あるいは UGT1A9 によって、グルクロン酸抱合を受け、MPA グルクロナイド体 (MPAG) として生体内より排出される。UGT1A8 および 1A9 酵素活性には遺伝子多型が存在し、MPA の代謝に影響を及ぼしていると考えられ、多く研究されているが MPA 体内動態と UGT1A8 遺伝子多型の関連についてはネガティブな結果が散見される。本研究でも LC-MSMS を用いた MPA および MPAG 測定方法を開発し、その解析に取り組んできたが、UGT1A8 遺伝子多型と MPA および MPAG 血中濃度推移には相関性を認めなかった。そこで、申請者はゲノム不安定化に注目した。ゲノム不安定化にはマイクロサテライト配列不安定、CpG アイランドメチル化があり、特に、DNA メチル化に関連するプロモーター領域の CpG アイランドは、UGT 内にも存在し、この DNA メチル化状態が異なる場合、UGT 発現量が影響を受け、MPA 血中濃度において個体間変動を生む要因となる可能性が高い。DNA メチル化により、その代謝変動要因を明らかにすることは移植時の免疫抑制薬治療において意義がある。

2. 研究の目的

本研究では、これまで検討されていない、がん細胞や DNA の発現量調節などに関わっていることが知られているエピジェネティックな情報、すなわちメチル化を解析することにした。哺乳動物のゲノム DNA では DNA メチルトランスフェラーゼの働きによって CpG 部位 (5' -CG-3') のシトシン (C) がメチル化される。この CpG 部位は主に 5' フランキング領域に多くみられる。CpG 部位がメチル化されることによって遺伝子の転写が抑制されることが知られている [9]。本研究は、UGT1A8 遺伝子の 5' フランキング領域の CpG 部位（転写開始部位を+1 として -228, -50, -10, +33, +56 におけるメチル化が、MPA 血中濃度に対してどのように影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とした。本研究は、MPA 血中濃度個体差の原因が MPA の代謝酵素である UGT1A8 の DNA メチル化レベルにあることを追及する。UGT1A8 の DNA メチル化レベルによって、MPA および MPAG の薬物動態パラメーターの差異を評価する。副作用発現頻度は異なることを明らかにする。以上の結果を統合し、MMF の新規投与プログラムの構築に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 患者データ

肺移植を行った 8 名（男性 7 名、女性 1 名）、年齢は平均 38.7 歳（28 歳～60 歳）を対象とした。

(2) 試薬および測定機器

QIAamp Blood Mini Kit, PCR clean up Gel extraction Nucleospin Gel and PCR clean-up,

NucleoSpin Plasmid Quick Pure は Qiagen 社, Methyl Easy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit は Human Genetic Signatures 社, TaKaRa EpiTaq™ HS はタカラバイオ株式会社, pGEM-T (Easy) Vector はプロメガ社, BIG DYE Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit は Thermo Fisher Scientific 社からそれぞれ購入した。遺伝子増幅装置は T100™ Thermal Cycler (BIO RAD 社), シーケンス解析装置は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。

(3) メチル化判定

UGT1A8 のメチル化状態解析はウェブツール QUMA (http://quma.cdb.riken.jp/top/quma_main_j.html) (QUantification tool for Methylation Analysis) を用いた。

(4) DNA 抽出とバイサルファイト処理

DNA は QIAamp Blood Mini Kit を用いて全血サンプルから精製した。Methyl Easy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit を用いてバイサルファイト処理した。バイサルファイト処理済み DNA の *UGT1A8* の 5'フランキング領域を, TaKaRa EpiTaq HS を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によって遺伝子を増幅した (1st PCR)。1st PCR 産物をさらに PCR 法によって増幅した (2nd PCR)。プライマー対は 1st PCR では 1st primer セット, 2nd PCR では 2nd primer セットを使用した (図 1)。

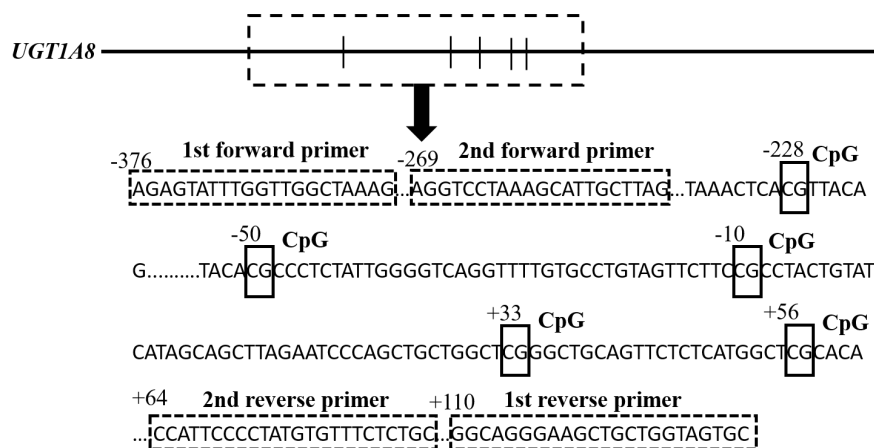


図 1. *UGT1A8* 5'フランキング領域における CpG 配列と primer 設定位

転写開始部位を+1として, -228, -50, -10, +33, +56の5箇所CpG配列が存在する。1st primer セットによって 519 bp, 2nd primer セットによって 367 bp の配列が増幅される。

(5) TA クローニングおよびシーケンス解析

PCR clean up Gel extraction Nucleospin Gel and PCR clean-up を用いてカラム精製した 2nd PCR 産物を pGEM-T (Easy) Vector に組み込み, コンピテントセルに導入した。コンピテントセルを培養し, NucleoSpin Plasmid Quick Pure を用いてプラスミド抽出を行った。そのプラスミドを TaKaRa EpiTaq HS を用いて PCR-RFLP 法によって増幅した。プライマーは Sp6 および T7 を用いた。PCR clean up Gel extraction Nucleospin Gel and PCR clean-up を用いてカラム精製した PCR 産物を, BIG DYE Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit にて解析を行った。反応温度条件は, 95 °C で 4 分間に続き, 95 °C, 1 分間, 52 °C, 1 分間, 72 °C, 1 分間を 30 サイクルののち, 72 °C で 1 分間とした。この BIG DYE 反応後のサンプルをエタノール

沈殿し、シーケンス解析に用いた。

(6) MPA 血中濃度測定

MPA 濃度は患者の血漿サンプルを用いて、LC-MS/MS により当研究室で確立した方法で測定した。

4. 研究成果

バイサルファイト処理済み DNA を用いて行った PCR の結果、図 1 のプライマー設定と同じように、1st PCR では 519 bp 付近、2nd PCR では 367 bp 付近にバンドがみられた (図 2)。シーケンス解析の結果、CpG 部位ではメチル化されている配列とメチル化されていない配列が検出された (図 3)。-228, -50, -10, +33, +56 のメチル化結果を QUMA を用いて解析したところ、8 例中 5 例はすべてメチル化されており、残りの 3 例はいずれも -228 が非メチル化であった。8 例、40 か所の CpG 部位でのメチル化率は 92.5% だった。また、各サンプルのメチル化状況と MPA 濃度の比較をしたところ、非メチル化配列をもつ患者は投与量-体重補正した MPA 血中濃度が低い傾向を認めた (図 4)。

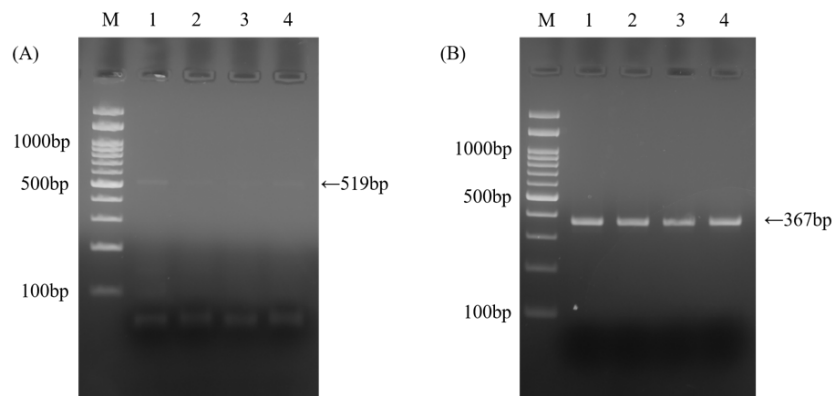


図 2 バイサルファイト処理後の PCR 産物の電気泳動結果

(A) 1st PCR 産物の泳動結果. 519 bp 付近にバンドがみられる。 (B) 2nd PCR 産物の泳動結果. 367 bp 付近にバンドがみられる。 M ; マーカー, 1, 2, 3, 4 ; サンプル

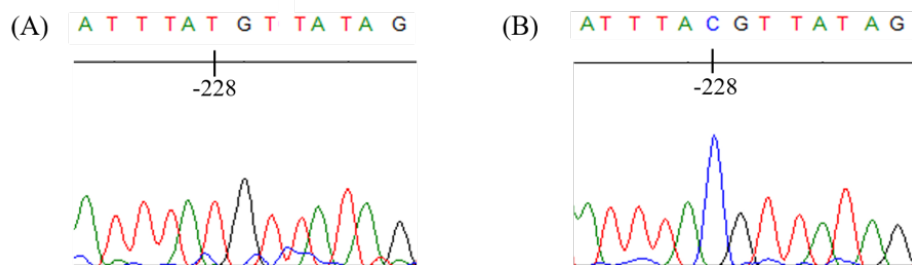


図 3 *UGT1A8* の 5' フランキンング領域におけるメチル化 DNA (-286) のシーケンス解析結果

例として -228 の結果を示した。A: アデニン, C: シトシン, G: グアニン, T: チミン

(A) 非メチル化配列. バイサルファイト処理によって非メチル化シトシン(C)はウラシルに変換されるため、PCR 増幅後は T として検出される。

(B) メチル化配列. メチル化シトシン(^mC)はバイサルファイト処理により変換されず、C として検出される。

バイサルファイト処理済み DNA を用いた PCR において、2 nd プライマーを設計し、1st PCR に加えて 2 nd PCR を行った。これは *UGT1A8*、*1A9* および *1A10* の遺伝配列が類似していること、加えてバイサルファイト処理によってメチル化シトシンはウラシルに変換され、PCR 増幅後にはチミンとなることから *UGT1A8*、*1A9* および *1A10* の相同性がさらに高くなり、非特異増幅を引き起こしてしまうことが考えられた。今回、バイサルファイト *UGT1A8* に特異的な 2nd Primer を設計、用いたことによって図 2 に示すようにプライマー設定と 367 bp のバンドが得られ、シーケンス結果からもバックグラウンドの影響なく *UGT1A8* の配列が得られたことから、*UGT1A8* を特異的に増幅させることが出来たと考えられる。これまで明らかとなっていないヒト末梢血抽出 DNA を用いた *UGT1A8* 5'フランキンング領域には非メチル化配列が存在することを明らかにした。

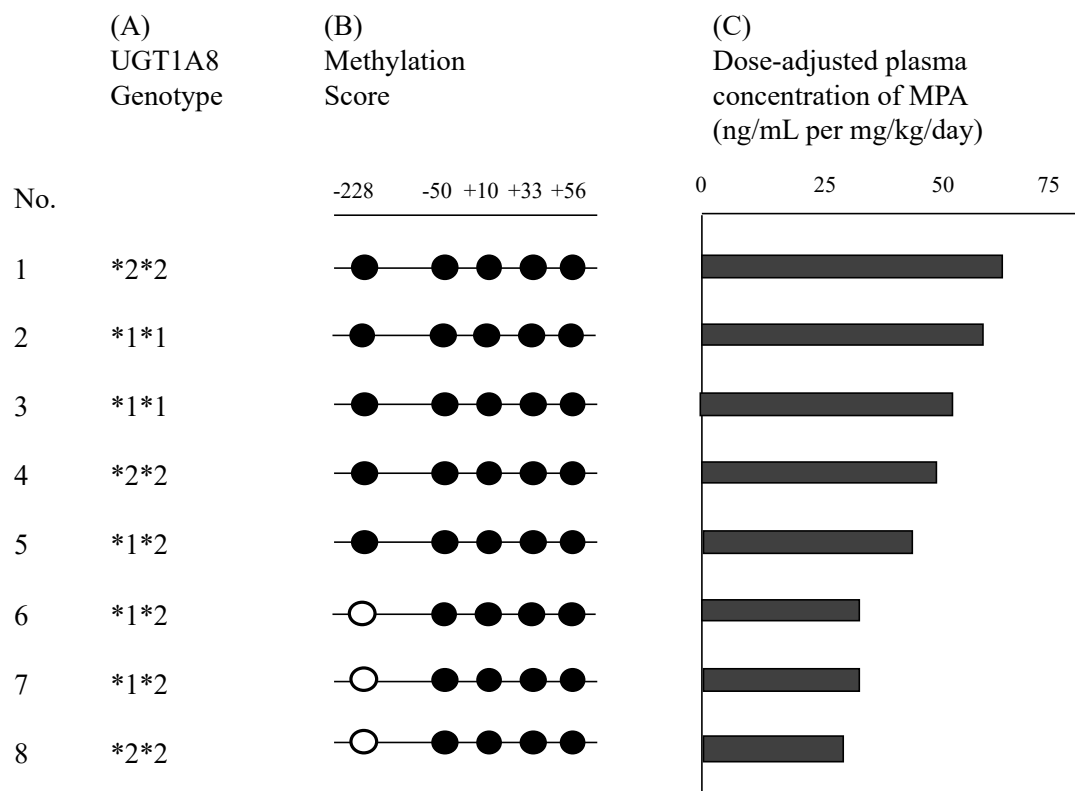


図 4. *UGT1A8* の遺伝多型とメチル化とトラフ MPA 濃度の比較

サンプル No.1-8 について、(A)各サンプルの *UGT1A8* 遺伝子多型、(B)各サンプルのメチル化状況 (○は非メチル化、●はメチル化)、(C)各サンプルの投与量-体重補正トラフ MPA 濃度の (ng/mL/mg/kg)を表す。

図 4 には、8 症例の *UGT1A8* 遺伝子多型、メチル化状況および投与量-体重補正トラフ MPA 血中濃度を示した。この 8 例の MMF 投与量は 17.94 ± 1.82 (mg/kg/day)と有意差はなかったが、投与量-体重補正トラフ MPA 血中濃度には約 2 倍の個体差を示した。この投与量-体重補正トラフ MPA 血中濃度順にならべたところ、低い 3 例ではいずれも非メチル化を認めた。UGT メチル化との関与が示された。同様に、トラフ MPAG 濃度についても非メチル化を有する 3 例で高い傾向を認めた。これは、メチル化率によって *UGT1A8* の発現が異なり、非メチル化配列を持つ症例では *UGT1A8* による MPA から MPAG への変換が増加し、血中 MPA 濃度が低くなったことが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計2件）

- (1) 須野学 他, 肺移植患者における血中ミコフェノール酸トラフ濃度/投与量比に与えるUGT1A8の影響について（日本薬学会第138年会, 2018年）
- (2) 須野学 他, 肺移植患者におけるCYP3A4およびCYP3A5遺伝子多型の組み合わせがタクロリムス血中トラフ濃度/投与量比に及ぼす影響について（第27回日本医療薬学会, 2018年）

〔その他〕

特筆なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大谷 真二

ローマ字氏名：Otani Shinji

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：10770779

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：永坂 岳司

ローマ字氏名：Nagasaka Takeshi

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30452569

(3) 研究分担者

研究分担者氏名：有吉 範高

ローマ字氏名：Ariyoshi Noritaka

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：00243957

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。