

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：20790142

研究課題名(和文) 抗癌剤代謝酵素のエピジェネティクス解析による個人差解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulation of drug-metabolizing enzymes catalyzing anticancer drugs

研究代表者

佐々木 崇光 (SASAKI TAKAMITSU)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20382674

研究成果の概要(和文): 本研究は、抗癌剤代謝酵素 TPMT の発現調節機構に着目し、酵素活性の個人差を解明することで、安全且つ効果的な薬物療法を目指すことを目的に行った。TPMT と DNA メチル化及びマイクロ RNA の関連性を解析したところ、これらの機構による TPMT 発現制御は小さいものと考えられた。TPMT 活性の個人差は、ヒト肝臓を用いた検討から遺伝子多型による影響が最も大きいことが示唆された。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study was to investigate the regulatory mechanisms of TPMT gene expression and provide an information for future clinical studies regarding individual variations in drug efficacy and safety. We examined the relationship between TPMT activity and methylation of TPMT promoter or expression levels of microRNA. These results showed that TPMT activity was not significant effect on the regulatory mechanisms of methylation and microRNA. This study showed that individual variation of TPMT activity in human livers was associated with the present of genetic polymorphisms.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：医療系薬学

キーワード：TPMT、エピジェネティクス、DHPLC、抗癌剤代謝酵素、遺伝子多型、個人差、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

癌化学療法において繁用される抗癌剤(6-MP、5-FU等)の解毒酵素である TPMT 及び DPD は、その個人差の解明を目的に遺伝子多型解析が行われ、原因の一部が解明されてきた。しかし、いずれの場合においても著しい酵素活性の低下を引き起こす遺伝子多型に限定されるものである。抗癌剤感受性の個人差は、遺伝子多型を有さない患者あるいは

同一遺伝子多型を有する患者においても認められる。より厳密な薬剤の選択や投与量設計が必要な癌化学療法において、遺伝子多型のみでは説明出来ない個人差の原因を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は抗癌剤の解毒酵素である TPMT 及

び DPD に焦点を当て、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解明を行う。これらのエピジェネティクスを明らかにすることで、遺伝子多型のみでは説明できない抗癌剤代謝能の個人差の解明を目指す。

3. 研究の方法

各種ヒト癌化細胞からゲノム DNA を抽出し (QIAamp DNA mini kit) バイサルファイト処理を行った (BisulFast DNA Modification kit)。ターゲットは、TPMT の 5' 非翻訳領域からエクソン 1 の一部を含む約 1,000bp とし、数領域に分け PCR 増幅を行った。メチル化部位及びその程度はシーケンスあるいは DHPLC を用いて検出した。TPMT の mRNA 発現量はリアルタイム PCR (SYBR Green PCR Master Mix)、タンパク質発現量はウエスタンブロット、活性は HPLC (基質は 6-チオグアニン) 遺伝子多型は DHPLC を用いて測定した。また、ヒト肝臓組織 (HAB 研究機構から供与) についても、ヒト癌化細胞の解析と同様の方法で検討を行った。

次に TPMT に対するマイクロ RNA の関与について検討を行った。まず各種ヒト癌化細胞から RNA を抽出し (mirVana miRNA Isolation Kit) その発現量をリアルタイム PCR (TaqMan MicroRNA Assay) を用いて測定した。また、マイクロ RNA (Pre-miR miRNA precursor) を HepG2 細胞に導入 (siPORT Neo FX) して、その影響を確認した。

4. 研究成果

・ TPMT 遺伝子のエピジェネティクス解析
ヒト癌化細胞株の TPMT 活性及び mRNA 発現量

ヒト癌化細胞株 HepG2、HSC-2、PC-3、A549、HeLa、PK-1、HEK293 について 6-チオグアニンを基質とした TPMT 活性及び mRNA 発現量を測定した。その結果、活性と mRNA 発現量は、 $R^2=0.7045$ と良好な相関関係にあった (図 1)。

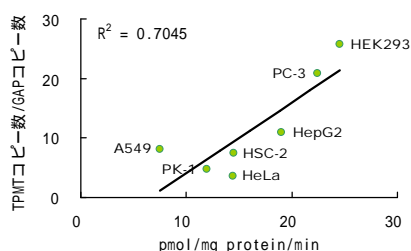


図 1 ヒト癌化細胞株の TPMT 活性と mRNA 発現量の相関性

DHPLC を用いた DNA メチル化検出系の構築

HepG2 細胞のゲノム DNA を抽出及びバイサルファイト処理後、TPMT のエクソン 1 及び転写開始部位を含む領域 (CpG36 個) とその 5' 上流領域 (CpG39 個) それぞれ約 300bp を PCR 増幅し、pCR2.1 ベクターにクローニング

を行った。これを鋳型として再度 PCR を行い、DHPLC の試料とした。ピークパターン等の溶出プロファイルは CpG のメチル化の程度によって明確に異なり、約 8 分程度で判定可能であった (図 2)。

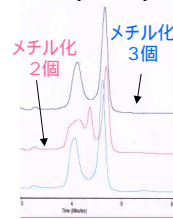


図 2 DHPLC におけるメチル化の程度による溶出パターンの違い

TPMT 遺伝子におけるメチル化部位の同定

TPMT mRNA 発現量が高かった HepG2、HEK293 及び発現量が低かった A549、PK1 のゲノム DNA を用いて TPMT 遺伝子におけるメチル化の有無を確認した。その結果、A549 においてメチル化は検出されたものの、他の細胞では認められなかった。

ヒト肝臓組織の TPMT 活性

ヒト肝臓組織 40 検体の TPMT 活性及びタンパク質発現量を測定した結果、低活性検体は遺伝子多型によるタンパク質安定性の低下が主な要因 (図 3) で、DNA メチル化等の他の因子の関与は低いことが明らかになった。

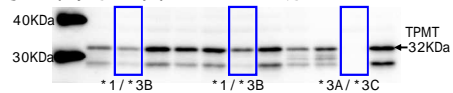


図 3 ヒト肝臓検体のウエスタンブロットと TPMT genotype

以上のことから、TPMT 活性及び mRNA 発現量は良好な相関関係が認められているものの、転写を抑制的に制御する DNA メチル化は、mRNA 発現量、即ち TPMT 活性への影響は小さいものと考えられた。

・ TPMT mRNA あるいはタンパク質に対するマイクロ RNA の関与

ヒト癌化細胞株の TPMT 活性とマイクロ RNA 発現量

TPMT mRNA の 3' 非翻訳領域に対するデータベース解析から、TPMT mRNA と結合する可能性が高い数種類のマイクロ RNA を同定した。その中でも最も結合性が高いと推測される has-miR-24 を対象として、HepG2、HSC-2、PC-3、A549、HeLa、PK-1、HEK293、LNCap FGC、Caco-2 から small RNA を抽出し、その発現量の定量を行った。その結果、ヒト前立腺癌由来細胞株を除く他の細胞株ではその TPMT 活性と has-miR-24 発現量の間良好な逆相関関係が認められた ($R^2=0.5486$ 、図 4)

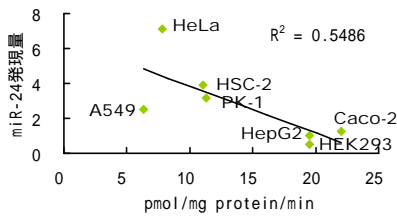


図 4 ヒト癌化細胞株の TPMT 活性と has-miR-24 発現量の相関性

ヒト肝臓組織の TPMT 活性とマイクロ RNA 発現量

ヒト肝臓組織 40 検体のうち遺伝子多型を有さない検体について、has-miR-24 発現量を測定したところ、ヒト癌化細胞株と同様に TPMT 活性と逆相関傾向が確認された ($R^2=0.4205$ 、図 5)。

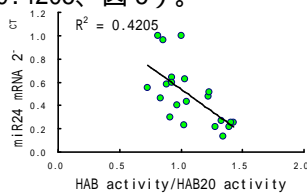


図 5 ヒト肝臓検体の TPMT 活性と has-miR-24 発現量の相関性

has-miR-24 前駆体の導入による TPMT 活性及び mRNA 発現量への影響

has-miR-24 が、実際、TPMT 活性に影響を及ぼすか否かを検討するため、HepG2 細胞を用いてマイクロ RNA 導入実験を行った。has-miR-24 の前駆体を導入することで、HepG2 細胞における has-miR-24 発現量は未導入細胞と比較して約 160 倍の発現量増大を確認したが、TPMT mRNA 発現量及び酵素活性共に低下は認められなかった。

以上のことから、has-miR-24 は TPMT 活性に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。他のマイクロ RNA についても発現量解析を行ったが、has-miR-24 で確認された TPMT 活性との良好な逆相関関係は認められなかったため、マイクロ RNA 等の翻訳後調節機構の関与は小さいことが推察された。

6-メルカプトプリン代謝酵素群の遺伝子多型解析及び酵素機能解析

6-MP の代謝酵素群に着目して、ITPase、HGPRT、IMPDH、GMPS の SNP スクリーニングを行い、6-MP 療法に影響を及ぼす可能性がある新規 SNP を IMPDH2 において 1 種類同定 (1534C>T、Arg512Trp) した。この変異型 IMPDH2 タンパク質を作成し、IMP を基質とした速度論的解析を行ったところ、野生型と比較して k_m 値の上昇及びクリアランスの低下が認められた。

Arg512 は、生物間で高度に保存されていることから、本研究結果はこれを支持するものである。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

S Sakaguchi, S Takahashi, T Sasaki, T Kumagai, K Nagata, Progression Alcohol and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 26, 2011, 30-46

M Kudo, T Sasaki, M Ishikawa, N Hirasawa, M Hiratsuka, Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the xanthine oxidase gene. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 25, 2010, 599-604

M Kudo, T Sasaki, M Ishikawa, N Hirasawa, M Hiratsuka, Kinetics of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 25, 2010, 361-366

T Watanabe, K Sakuyama, T Sasaki, Y Ishii, M Ishikawa, N Hirasawa, M Hiratsuka, Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28 expect CYP2B6.22). Pharmacogenet. Genomics., 査読有, 20, 2010, 459-462

W Sato, H Suzuki, T Sasaki, T Kumagai, S Sakaguchi, M Mizugaki, S Miyairi, Y Yamazoe, K Nagata, Construction of a system that simultaneously evaluates CYP1A1 and CYP1A2 induction in a stable human-derived cell line using a dual reporter plasmid. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 25, 2010, 180-189

H Suzuki, T Sasaki, T Kumagai, S Sakaguchi, K Nagata, Malondialdehyde-modified low density lipoprotein (MDA-LDL)-induced cell growth was suppressed by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Toxicol. Sci., 査読有, 35, 2010, 137-147

M Kudo, Y Saito, T Sasaki, H Akasaki, Y Yamaguchi, M Uehara, K Fujikawa, M Ishikawa, N Hirasawa, M Hiratsuka, Genetic Variations in the HGPRT, ITPA, IMPDH1, IMPDH2, and GMPS genes in Japanese Individuals. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 24, 2010, 557-564

K Sakuyama, T Sasaki, S Ujiie, K Obata,

M Mizugaki, M Ishikawa, M Hiratsuka, Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). Drug Metab. Dispos., 査読有, 36, 2008, 2460-2467

S Ujiie, T Sasaki, M Mizugaki, M Ishikawa, M Hiratsuka, Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). Pharmacogenet. Genomics, 査読有, 18, 2008, 887-893

T Sasaki, M Horikawa, K Orikasa, M Sato, Y Arai, Y Mitachi, M Mizugaki, M Ishikawa, M Hiratsuka, Possible relation between the risk of Japanese bladder cancer cases and CYP4B1 genotype, Jpn. J. Clin. Oncol., 査読有, 38, 2008, 634-640

〔学会発表〕(計 16 件)

福土素子、CYP3A4 転写活性に影響を与える FBS 中成分の同定、第 49 回日本薬学会東北支部大会、2010 年 10 月 24 日、福島

沼田喜弘、MRP3 における新規転写誘導機構の解明、第 49 回日本薬学会東北支部大会、2010 年 10 月 24 日、福島

田巻祐一郎、薬物代謝酵素遺伝子多型と肺がんリスクとの関連、第 49 回日本薬学会東北支部大会、2010 年 10 月 24 日、福島

作山佳奈子、タモキシフェンの薬効発現に影響を及ぼす CYP2D6 バリエーション酵素の in vitro、第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10 月 18 日、仙台

工藤 睦、キサンチンオキシダーゼ活性の個人差に影響を及ぼす遺伝子多型、第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10 月 18 日、仙台

佐藤 渉、CYP1A1, CYP1A2 誘導スクリーニングのための in vitro 同時評価系の構築、第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10 月 18 日、仙台

高橋昌悟、アデノウイルスベクターを用いた薬物代謝・毒性評価系の確立、第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10 月 18 日、仙台

庄司理恵、多環芳香族炭化水素類による CYP3A4 転写活性化分子機構の解析、第 48 回日本薬学会東北支部大会、2009 年 10 月 18 日、仙台

作山佳奈子、タモキシフェン代謝における CYP2D6 バリエーション酵素の機能解析、第 30 回日本臨床薬理学会年会、2009 年 12 月 3 日、横浜

工藤 睦、キサンチンオキシダーゼ活性の個人差に影響を及ぼす遺伝子多型、第 30 回日本臨床薬理学会年会、2009 年 12 月 3 日、

横浜

工藤 睦、Xanthine oxidase 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型解析、第 129 回日本薬学会、2009 年 3 月 28 日、京都

渡邊卓嗣、塩酸セレギリンを用いた CYP2B6 バリエーションの酵素速度論的解析、第 129 回日本薬学会、2009 年 3 月 28 日、京都

齋藤友香、6-mercaptopurine 代謝に関与する酵素群の遺伝子多型解析、第 129 回日本薬学会、2009 年 3 月 28 日、京都

作山佳奈子、日本人における CYP2D6 バリエーション酵素の機能解析、第 29 回日本臨床薬理学会、2008 年 12 月 4 日、東京

渡邊卓嗣、FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUMAN CYTOCHROME P450 2B6 ALLELIC VARIANTS、第 23 回日本薬物動態学会、2008 年 10 月 31 日、熊本

氏家秀太、Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24)、第 23 回日本薬物動態学会、2008 年 10 月 31 日、熊本

〔図書〕(計 1 件)

佐々木崇光、永田 清、金芳堂、創薬研究のストラテジー上、2011、187-193

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 崇光 (SASAKI TAKAMITSU)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20382674

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：