

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07013

研究課題名（和文）RNA修飾による薬物代謝酵素発現制御

研究課題名（英文）Regulation of expression of drug metabolizing enzymes by RNA modification

研究代表者

中野 正隆（Nakano, Masataka）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00816225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：医薬品による薬効や副作用の個人差は、医薬品成分の血中濃度や反応性代謝物生成など、薬物動態の違いに起因する場合が多い。特に、肝臓に発現する薬物代謝酵素の活性や発現量の差が薬物動態に与える影響が大きいことが知られている。本研究では、アデノシン6位メチル化（m6A修飾）が、ヒト肝における薬物代謝酵素の発現を制御することを明らかにし、薬物代謝に起因する薬効や副作用の個人差の最小化に向けた基礎情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物治療において問題となる医薬品による薬効や副作用の個人差の一因として、転写後修飾の一つであるアデノシン6位メチル化（m6A修飾）による、ヒト肝における薬物代謝酵素の発現制御の可能性を明らかにした。本研究成果は個別化医療の実現に向けた有用な基盤情報となることが期待される。また、m6A修飾が転写後レベルのみではなくクロマチン構造などの制御を介した様々なメカニズムによって、薬物代謝酵素の発現を調節することが明らかになり、分子生物学的にも有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Interindividual differences in the expression and activity of drug metabolizing enzymes including cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase, and esterases cause variable therapeutic efficacy or adverse events of drugs. The present study revealed that methylation of adenosine at the N6 position on RNA have emerged as a novel regulator of drug metabolism potency. Elucidation of the significance of N6-methyladenosine in the regulation of drug metabolizing enzymes is expected to lead to a deeper understanding of interindividual variability in the therapeutic efficacy or adverse effects of medicines.

研究分野：分子生物学

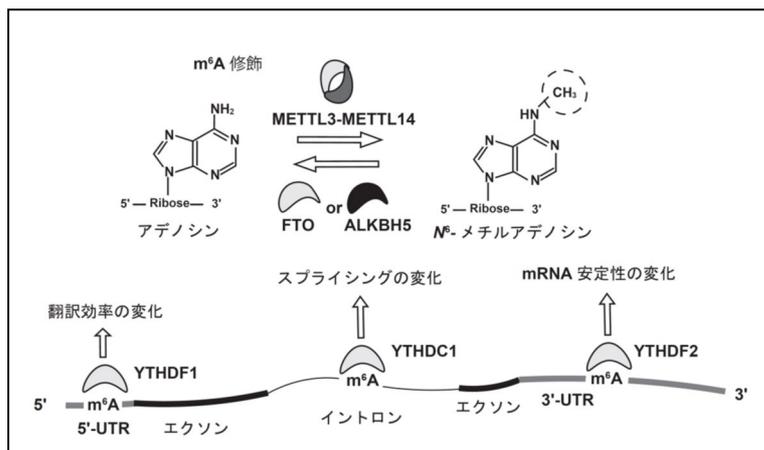
キーワード：薬物代謝 m6A修飾 転写後遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物治療において、期待される薬効や副作用には大きな個人差が認められる。それは医薬品成分の血中濃度や反応性代謝物生成など、薬物動態の個人差に起因する場合が多い。薬物動態を規定する薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量や機能には 50-100 倍の大きな個人差が認められることが多く、特に肝臓に発現するシトクロム P450 (P450, CYP) などの薬物代謝酵素の活性や発現量の差が薬物動態に与える影響が大きい。薬物代謝酵素の発現制御に関して、従来の研究では転写調節機構に焦点が当てられてきた。しかし、P450 分子種の中には、複数の個人肝検体における mRNA とタンパク質発現量の間に関連が認められないものもあり、転写後調節もまた P450 の肝臓中発現量を規定する発現制御機構と考えられる。

真核生物の RNA は、100 種類以上の化学修飾を受けている。中でも頻繁に認められるのは、アデノシンの 6 位メチル化 (m^6A 修飾) である。この塩基修飾は、methyltransferase-like (METTL) 3、METTL14 などからなる RNA メチルトランスフェラーゼ複合体によって触媒され、fat mass and obesity-associated protein (FTO) や AlkB homolog 5、RNA demethylase (ALKBH5) によって脱メチル化される可逆的な塩基変化である。 m^6A 修飾は、スプライシングを受ける前の pre-mRNA において、主にストップコドン周辺や 5' -非翻訳領域、イントロン中の DRACH (D = A/G/U; R = A/G; H = A/C/U) モチーフで起こる。 m^6A を含む mRNA は、YTHDC1 B homology (YTH) containing proteins などの種々の reader タンパクによって認識されることで、スプライシング、核外移行、mRNA 安定性や翻訳効率などが変化する。 m^6A の存在は 1970 年代には確認されていたが、その分子生物学的意義はこれまでほとんど明らかにされていなかった。近年、 m^6A に対する抗体を用いた RNA の免疫沈降に続く次世代シーケンズ解析により、ヒトにおいて 50 万箇所近くのアデノシンがメチル化されていることが明らかになってきた。



スプライシングを受ける前の pre-mRNA において、主にストップコドン周辺や 5' -非翻訳領域、イントロン中の DRACH (D = A/G/U; R = A/G; H = A/C/U) モチーフで起こる。 m^6A を含む mRNA は、YTHDC1 B homology (YTH) containing proteins などの種々の reader タンパクによって認識されることで、スプライシング、核外移行、mRNA 安定性や翻訳効率などが変化する。 m^6A の存在は 1970 年代には確認されていたが、その分子生物学的意義はこれまでほとんど明らかにされていなかった。近年、 m^6A に対する抗体を用いた RNA の免疫沈降に続く次世代シーケンズ解析により、ヒトにおいて 50 万箇所近くのアデノシンがメチル化されていることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

ヒト肝臓における m^6A 修飾の機能的意義を明らかにすることを目的に m^6A 研究に着手し、複数検体のヒト正常肝試料において METTL3 のタンパク質発現量に 100 倍以上の大きな個人差が存在することが見出された。肝臓は薬物・異物代謝に重要な臓器であることから、本研究では P450 の発現や機能の個人差に対する m^6A 修飾の寄与を明らかにし、個別化医療の実現に向けた基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

P450 mRNA 上で認められた m^6A 修飾が、その発現に影響を与えるか調べるために、薬物代謝酵素の発現量がヒト肝細胞に近い唯一の細胞株であるヒト肝がん由来 HepaRG 細胞に m^6A 修飾阻害剤である 3-deazaadenosine (DAA) を処置した。METTL3、METTL14、FTO、ALKBH5 もしくは YTHDC2 の発現を siRNA の導入によってノックダウンすることで m^6A 修飾の程度を変化させ、薬物代謝酵素や転写因子の mRNA とタンパク質発現量を real time RT-PCR およびウエスタンブロット解析により評価した。さらに、各薬物代謝酵素に特異的な基質を用いて酵素活性を評価し、 m^6A 修飾が P450 の機能にまで影響を及ぼすか調べた。

m^6A 修飾が脂質蓄積に影響を与えるか、METTL3、METTL14、FTO もしくは ALKBH5 の発現を siRNA の導入によってノックダウンした HepG2 細胞に遊離脂肪酸を処置し、oil red O 染色を行った。

ヒト肝臓組織やヒト肝由来細胞株に発現している P450 mRNA 上に m^6A 修飾が認められるか、methylated RNA immunoprecipitation 法を用いて明らかにした。すなわち、 m^6A に対する抗体を用いた免疫沈降により濃縮したメチル化 RNA を用いて real time RT-PCR を行い、薬物代謝酵素の mRNA 上で、どの領域が高くアデノシンメチル化を受けているのか解析した。

転写阻害剤 actinomycin D を処置した後、経時的に mRNA 発現量を測定することで、薬物代謝酵素の mRNA 安定性を評価した。

YTHDC2 が CES2 mRNA に結合しているか、RNA 免疫沈降を行った。

CES2 の 5' -非翻訳領域もしくはラストエクソンを含むルシフェラーゼプラスミドを用いたレポーターアッセイを行った。

CYP2B6 上流領域の H3K9me2 レベルをクロマチン免疫沈降法によって評価した。

4. 研究成果

(1) m⁶A 修飾による薬物代謝酵素 CYP2C8 発現制御

m⁶A 修飾が P450 の発現を制御するか調べるために、HepaRG 細胞に DAA を処置して各 P450 の mRNA 発現量を評価したところ、CYP1A2、CYP2B6 および CYP2C8 mRNA 発現量の発現増加が認められた。さらに、DAA 処置による CYP2C8 タンパク質発現量ならびに CYP2C8 が触媒するアモジアキン N-脱エチル化酵素活性の増加が認められた。m⁶A 修飾酵素である METTL3 のノックダウンにより CYP2C8 mRNA ならびにタンパク質発現量の増加が、脱メチル化酵素である FTO のノックダウンにより低下が認められた。以上の結果から、CYP2C8 の発現量は m⁶A 修飾により負に制御されていることが明らかになった。

ヒト肝臓組織と HepaRG 細胞を用いて methylated RNA immunoprecipitation 法を行ったところ、CYP2C8 mRNA 上の特にラストエクソンにおいて高い m⁶A レベルが認められた。Actinomycin D を用いた転写阻害実験において、METTL3 のノックダウンによって CYP2C8 mRNA 安定性の増加が、FTO ノックダウンによって低下が認められた。また、m⁶A を認識し mRNA を不安定化するリーダータンパク質である YTHDC2 のノックダウンによって、CYP2C8 mRNA ならびにタンパク質発現量の増加が認められた。以上より、m⁶A 修飾は mRNA の不安定化を介して CYP2C8 の発現量を負に制御することが明らかになった (Nakano et al., *Biochem Pharmacol* 171: 113697, 2020)。

(2) m⁶A 修飾による第 II 相薬物代謝酵素 UGT2B7 発現制御

主要第 II 相薬物代謝酵素である UDP-glucuronosyltransferases (UGT) の発現が m⁶A 修飾によって制御される可能性を調べるために、DAA を処置した HepaRG 細胞における UGT 各分子種の mRNA 発現量を評価したところ、UGT2B7 において顕著な発現増加が認められた。また、METTL3 のノックダウンにより UGT2B7 発現量の増加が、FTO もしくは ALKBH5 のノックダウンにより低下が認められた。このとき、UGT2B7 の発現を制御する転写因子として知られている hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) の発現量も同様の変動を示していた。以上の結果から、m⁶A 修飾は HNF4 の発現制御を介して、UGT2B7 の発現を負に制御していることが明らかになった (Ondo et al., *Biochem Pharmacol* 189: 114402, 2021)。

(3) m⁶A 修飾による薬物・脂質代謝酵素 CES2 発現制御

Carboxylesterase 2 (CES2) は、薬物やトリグリセリドなどの内因性化合物を代謝する加水分解酵素である。m⁶A 修飾が CES2 の発現を制御するか調べるために、m⁶A 修飾関連酵素をノックダウンした HepaRG 細胞における CES2 発現量を評価したところ、CES2 mRNA およびタンパク質発現量は、METTL3 と METTL14 のダブルノックダウンにより増加し、FTO もしくは ALKBH5 のノックダウンにより低下した。このとき、CES2 が触媒する 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin (CPT-11) の加水分解酵素活性も同様の変動を示したことから、m⁶A 修飾は CES2 の発現を負に制御し、その制御は薬物代謝活性にまで影響することが示された。このとき、METTL3 と METTL14 のダブルノックダウンによって遊離脂肪酸処置による脂質蓄積の促進が、FTO もしくは ALKBH5 ノックダウンによる抑制が認められた。したがって、m⁶A 修飾による CES2 発現制御は脂質蓄積にまで影響することが明らかになった。

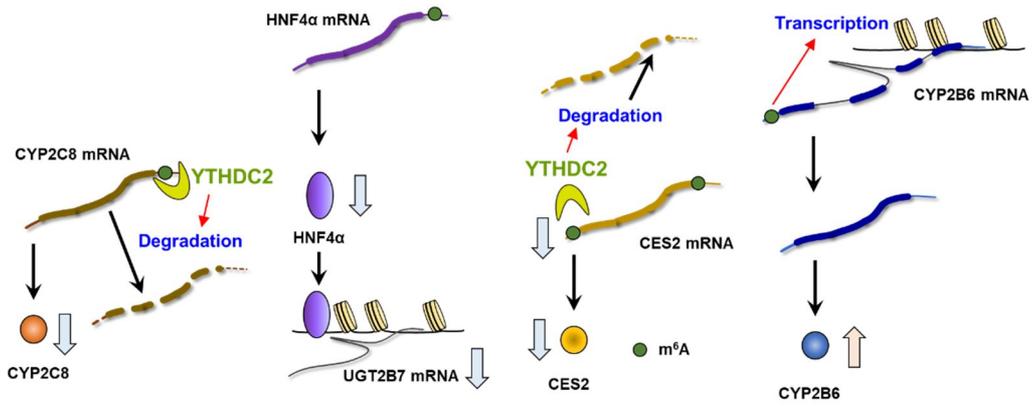
Methylated RNA immunoprecipitation 法を行ったところ、CES2 mRNA 上の 5' -非翻訳領域とラストエクソンにおいて高い m⁶A レベルが認められた。RNA 免疫沈降法によって YTHDC2 が CES2 mRNA に直接結合することが示された。YTHDC2 ノックダウンによって CES2 発現量の増加が認められた。また、CES2 の 5' -非翻訳領域もしくはラストエクソンを含むルシフェラーゼプラスミドを用いたレポーターアッセイによって、YTHDC2 による CES2 の負の制御は 5' -非翻訳領域を介したものであることが示された (Takemoto et al., *Biochem Pharmacol* 193: 114766, 2021)。

(4) m⁶A 修飾による薬物代謝酵素 CYP2B6 発現制御

m⁶A 修飾が CYP2B6 の発現を制御する可能性を詳細に明らかにするために、METTL3 と METTL14 の発現をノックダウンした HepaRG 細胞における CYP2B6 発現量を評価したところ、CYP2B6 mRNA 発現量の低下ならびに CYP2B6 が触媒するプロピオン水酸化酵素活性の低下が認められたことから、m⁶A 修飾は CYP2B6 の発現を正に制御することが明らかになった。このとき、CYP2B6 mRNA の安定性には影響を与えなかったことから、m⁶A 修飾は転写後レベルで CYP2B6 の発現を制御しないことが示された。クロマチン免疫沈降法によって転写抑制ヒストンマーカーである H3K9me2 レベルを評価したところ、METTL3 および METTL14 のノックダウンによる CYP2B6 上流領域のクロマチン構造の凝集が認められた。以上より、m⁶A 修飾はクロマチン構造の制御を介して CYP2B6 の発現を制御することが明らかになった (Isono et al., *Biochem Pharmacol* 205: 115247, 2022)。

(5) まとめ

本研究を通して、 m^6A 修飾が薬物代謝酵素 CYP2C8、UGT2B7、CES2 および CYP2B6 の発現を制御することを明らかにした (Nakano M et al., Drug Metab Dispos 50:624-633, 2022)。本研究成果は個別化医療の実現に向けた有用な基盤情報となることが期待される。また、 m^6A 修飾は転写後レベルのみではなくクロマチン構造などの制御を介した想定していない様々な制御メカニズムによって、薬物代謝酵素の発現を制御することが明らかになったことから、分子生物学的にも有用な知見を得ることができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemoto Seiya, Nakano Masataka, Nozaki Kaori, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 37
2. 論文標題 Adenosine deaminases acting on RNA modulate the expression of the human pregnane X receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100367 ~ 100367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Masataka, Iwakami Chika, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of miRNAs that regulate human CYP2B6 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100388 ~ 100388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ondo Kyoko, Isono Motoki, Nakano Masataka, Hashiba Shiori, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 189
2. 論文標題 The N6-methyladenosine modification posttranscriptionally regulates hepatic UGT2B7 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114402 ~ 114402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2020.114402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemoto Seiya, Nakano Masataka, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 193
2. 論文標題 m6A modification impacts hepatic drug and lipid metabolism properties by regulating carboxylesterase 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114766 ~ 114766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Masataka, Nakajima Miki	4. 巻 -
2. 論文標題 A-to-I RNA editing and m6A modification modulating expression of drug-metabolizing enzymes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.121.000390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ondo Kyoko, Isono Motoki, Nakano Masataka, Hashiba Shiori, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 -
2. 論文標題 The N6-methyladenosine modification posttranscriptionally regulates hepatic UGT2B7 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114402 ~ 114402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2020.114402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Masataka, Ondo Kyoko, Takemoto Seiya, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 171
2. 論文標題 Methylation of adenosine at the N6 position post-transcriptionally regulates hepatic P450s expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 113697 ~ 113697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2019.113697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Isono Motoki, Nakano Masataka, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 205
2. 論文標題 Adenosine N6-methylation upregulates the expression of human CYP2B6 by altering the chromatin status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115247 ~ 115247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.115247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Masataka, Nakajima Miki	4. 巻 50
2. 論文標題 Adenosine-to-Inosine RNA Editing and N6-Methyladenosine Modification Modulating Expression of Drug Metabolizing Enzymes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 624 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.121.000390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitamura Rei, Nakano Masataka, Isono Motoki, Kurosawa Kiamu, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 51
2. 論文標題 NEAT1_2 and DAZAP1, Paraspeckle Components, Interact with PXR to Negatively Regulate CYP3A4 Induction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 1230 ~ 1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.122.001065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa Kiamu, Nakano Masataka, Yokoseki Itsuki, Nagaoka Mai, Takemoto Seiya, Sakai Yoshiyuki, Kobayashi Kaoru, Kazuki Yasuhiro, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 215
2. 論文標題 ncBAF enhances PXR-mediated transcriptional activation in the human and mouse liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115733 ~ 115733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2023.115733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 磯野 元輝、中野 正隆、深見 達基、中島 美紀
2. 発表標題 RNAメチル化転移酵素によるヒトCYP2B6の発現制御
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuto Inamoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 m6A modification enhances sensitivity of human lung cancer A549 cells to paclitaxel by attenuating MRP7 expression.
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Nakano, Masataka, Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 m6A modification-related enzymes METTL3 and ALKBH5 modulate CYP1A1 induction by upregulating ARNT expression in human lung cells.
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiya Takemoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima.
2. 発表標題 Effects of m6A modification on hepatic drug and lipid metabolism properties by regulation of carboxylesterase 2.
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Nakajima and Masataka Nakano.
2. 発表標題 Epitranscriptional regulation of drug-metabolizing enzymes.
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯野 元輝、中野 正隆、深見 達基、中島 美紀
2. 発表標題 RNAメチル化がヒト肝におけるCYP2B6発現量に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Takeuchi, Masataka Nakano, Seiya Takemoto, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 Hepatic CYP3A4 expression is modulated by m6A modification.
3. 学会等名 第37回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 慎之介、中野 匠、中野 正隆、深見 達基、中島 美紀
2. 発表標題 m6A修飾によるヒト抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1の発現制御
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masataka Nakano and Miki Nakajima
2. 発表標題 microRNAs as regulators of human drug-metabolizing enzymes.
3. 学会等名 The 39th Annual Meeting of KSOT/KEMS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学薬物代謝安全性学研究室
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------