

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790151

研究課題名 (和文) インスレーターモデルに基づく CYP3A4 活性の個人差要因解明

研究課題名 (英文) Epigenetic regulation of CYP3A4 gene and individual phenotypic status

研究代表者

廣田 豪 (HIROTA TAKESHI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80423573

研究成果の概要 (和文)：

CYP3A4 遺伝子発現の個人差の要因解明を目的に本研究を行った。脱メチル化処理細胞における CYP3A4 遺伝子発現やヒストンアセチル化状態への影響を検討したところ、脱メチル化により CYP3A4 発現の上昇ならびにヒストンアセチル化の亢進を認めた。Chromosome Conformation Capture (3C) アッセイにより周辺領域の高次構造の検討したところ、CYP3A4 エンハンサー領域と同遺伝子の転写開始点が近傍に位置していることが示された。以上よりエンハンサー領域のメチル化を介して、CYP3A4 遺伝子発現の個人差が引き起こされていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We show that DNA methylation in CYP3A4 enhancer region is critically involved in determining the individual hepatic CYP3A4 mRNA level. Chromosome Conformation Capture assay suggested long-range *cis*-interaction between the enhancer region and the transcription start site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

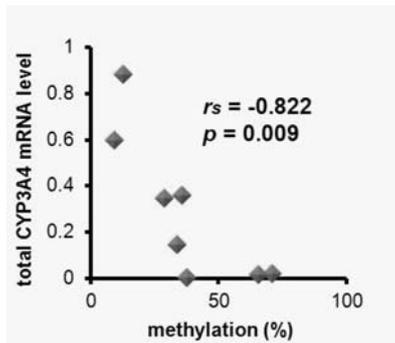
キーワード：エピジェネティクス・発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

CYP3A4 は、抗がん剤や免疫抑制剤を始めとする臨床使用される 60%以上の医薬品の代謝に関与する重要な代謝酵素であるが、その機能には大きな個人差が見られる。翻訳領域並びに 5' 上流域の遺伝子多型解析により個人差要因の解明が試みられているが、同定された変異の頻度は著しく低いことから、未

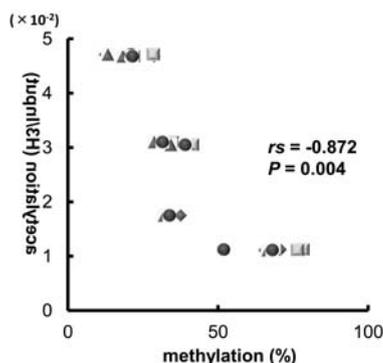
だにその原因は明らかとなっていない。従来行われてきた遺伝子多型からのアプローチでは個人差解明は困難と考えられる。一方、CYP3A4 活性の個人差の 60～90%は遺伝的要因によることと (Ozdemir V. et al., 2000)、CYP3A4 遺伝子の発現における個人差が個人間変動に重要であるという報告があることから (Sy SK. et al., 2002)、個人差要因解

明には遺伝子変異の解析に加えて遺伝子の発現に着目した攻略方法が必要である。エピジェネティックとは DNA の塩基配列の変化なしに、遺伝的しかも可逆的に遺伝子機能の発現が変化する現象である。表現型に多様性をもたらす遺伝子発現メカニズムとしてエピジェネティックメカニズムの1つであるゲノムインプリンティングが知られている。ゲノムインプリンティングとは、父親と母親由来の遺伝子が異なる発現レベルを示す現象である。さらにインプリント遺伝子ではないが、同一遺伝子上の2つのアリルが不均等な発現を示し、その程度が個体間で異なる現象が報告された。また近年、インプリンティングの重要な制御機構としてインスレーターによる遺伝子発現調節領域の制御が報告されている。インスレーターモデルを含むエピジェネティックメカニズムにフォーカスを当て、CYP3A4 遺伝子発現や機能の個人差解明を試みた。これまでに、CYP3A4 遺伝子の 5' 上流域の enhancer 領域における DNA メチル化と CYP3A4 mRNA 発現量との間に有意な相関を認めたことから (下図)、本領域における DNA メチル化に注目して解析を行った。



ヒト肝 CYP3A4 mRNA 発現量と enhancer 領域における DNA メチル化頻度との関連

興味深いことに、enhancer 領域の DNA メチル化頻度と promoter 領域のヒストンアセチル化状態との間には非常に強い正相関を認めた。これら領域が連携して CYP3A4 遺伝子の発現制御を行っている可能性が考えられるため、promoter 領域のヒストンアセチル化について検討に加えた。



CYP3A4 遺伝子の promoter 領域のヒストンアセチル化と enhancer 領域における DNA メチル化頻度との関連

また、DNA メチル化を含む epigenetic メカニズムの他の薬物動態関連遺伝子への影響を検討するため OCT2 遺伝子 (SLC22A2) についての検討も同時に行った。

## 2. 研究の目的

インスレーターモデルを想定し、enhancer 領域における DNA メチル化と CYP3A4 遺伝子の発現調節メカニズムとの関係を明らかにすることで、その発現量の個人差要因を解明する。

## 3. 研究の方法

### 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理細胞における各遺伝子の発現量の測定

ヒト肝癌細胞を脱メチル化剤である 5-aza-dC を 0, 0.5, 1.0, 2.0 μM の各濃度の条件下で 72 時間培養した後、回収し RNA 抽出・逆転写反応を行った。CYP3A4 および CYP3A4 遺伝子の転写に関わる転写因子 PXR, VDR, PRMT の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

### 5-aza-dC 処理細胞におけるヒストンアセチル化状態の測定

上記細胞に対し、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた Chip assay を行い、CYP3A4 遺伝子上流域のヒストンアセチル化状態を測定した。

### Luciferase assay を用いた CYP3A4 遺伝子 5' 上流域の機能解析

CYP3A4 遺伝子上流域を含むベクターならびにエンハンサー領域を近接させたベクターを作成し、HepG2 細胞にトランスフェクトした後、転写活性を測定した。同時にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) 処理することで、ヒストンアセチル化が転写活性に与える影響を検討した。

### Chromosome Conformation Capture (3C) アッセイによる高次構造の解析

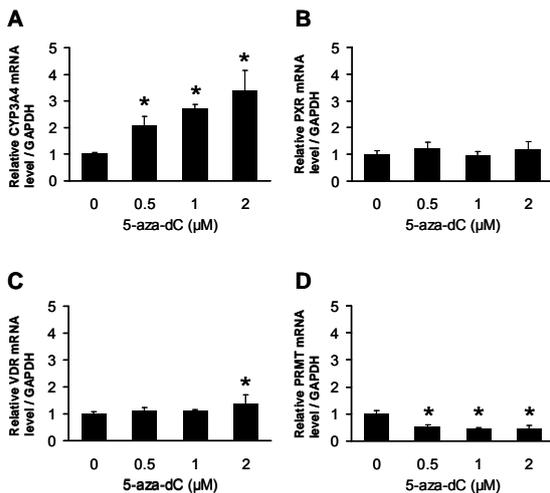
CYP3A4 mRNA 発現量の高い検体と低い検体を用いて CYP3A4 近傍を含む 3C ライブラリーとコントロール 3C ライブラリーを作成し、リアルタイム PCR 法によりその近接効果を定量的に測定した。

## 4. 研究成果

《5-aza-dC 処理による CYP3A4 遺伝子発現への影響》

DNA メチル化が CYP3A4 遺伝子の転写活性に影響を与えるか否かを検討するため、ヒト肝臓ガン細胞である HepG2 細胞を用いて解析を行った。HepG2 細胞を DMSO に溶解した DNA 脱メチル化剤、5-aza-dC を含む培地で 3 日間培

養した後、RNA を抽出し Real-time PCR により mRNA の定量を行った。各濃度 (0.5~2  $\mu$  M) の 5-aza-dC を用意する際、溶媒の影響を除くため各溶液の DMSO 最終濃度を 0.025% に統一した。また DMSO のみを含む培地で培養したものをコントロールとして用意した。CYP3A4 遺伝子のほか、CYP3A4 遺伝子上流域へ作用し転写活性を制御する転写因子 PXR、VDR、PRMT 遺伝子を測定対象とした。コントロールの mRNA 発現量を 1 としたとき、CYP3A4 遺伝子は 0.5、1、2  $\mu$  M の 5-aza-dC 処理によりそれぞれ 2.1 倍、2.7 倍、3.4 倍と濃度依存的な mRNA 量の増加を示した (Fig. 1-A)。すなわち脱メチル化が起きやすい環境にあるほど、CYP3A4 mRNA 発現量が増加していた。一方、転写因子である PXR において 5-aza-dC 処理による mRNA 量の変化は観察されなかった (Fig. 1-B)。5-aza-dC 2  $\mu$  M 処理における VDR、および全濃度における PRMT は DMSO 処理のみの細胞に対して有意差を示したが、その変化は CYP3A4 mRNA の増加に比べ、非常に小さいものだった (Fig. 1-C~D)。

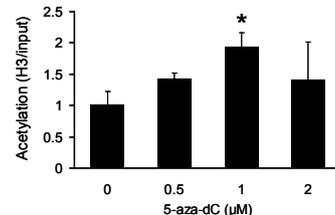


**Fig. 1** The effect of 5-aza-dC on CYP3A4, PXR, VDR, and PRMT in HepG2 cells, tested by quantitative real-time PCR analysis. HepG2 cells were treated with 5-aza-dC (0.5, 1, and 2  $\mu$ M) for 72 hr before harvest. mRNA expression of tested genes was determined using real-time PCR and normalized to GAPDH gene. The effect of 5-aza-dC on CYP3A4 (A), PXR (B), VDR (C), and PRMT (D) mRNA expression is presented as fold increase to the control (vehicle alone) cells. All mean  $\pm$  S.D. were calculated from triplicates of a representative experiment and analyzed using Dunnett's test\*.  $p < 0.05$ ; statistically different from cells treated with vehicle alone.

#### 《5-aza-dC 処理によるアセチル化ヒストン H3 結合量の変化》

HepG2 細胞に対して脱メチル化処理を行った際の、CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域におけるアセチル化ヒストン H3 結合量について検討した。Fig. 1 と同様の条件で HepG2 細胞に対して 5-aza-dC 処理を行い DNA を抽出した後、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いて ChIP assay を行った。対象領域を CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域とした primer を作製し、ChIP assay により免疫沈降した分画および免疫沈降前の input 分画に対して Real-time PCR を行った。

$\Delta\Delta$ Ct 法を用いて input 分画に対する免疫沈降後の分画 (H3) の比 (H3/input) を求め、DMSO 処理のみを行った細胞の H3/input を 1 として比較したところ 5-aza-dC 処理によりアセチル化ヒストン H3 結合量が増加する傾向をみせた (Fig. 2)。すなわち、脱メチル化状態が促進される環境において、CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域のヒストンアセチル化が亢進する傾向にあることを示した。



**Fig. 2** ChIP assay of the acetylated-histone H3 binding to 2 kb of CYP3A4 5'-flanking region in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with 5-aza-dC (0, 0.5, 1, and 2  $\mu$ M) for 72 hr before harvest. Formaldehyde cross-linked chromatin was incubated with an antibody for anti-acetyl-Histone H3. Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR with primers specific to the 8569-8661 (AF185589) region. Parallel PCR reactions were performed with input DNA. All mean  $\pm$  S.D. were calculated from triplicates of a representative experiment and analyzed using Dunnett's test\*.  $p < 0.05$ ; statistically different from cells treated with vehicle alone.

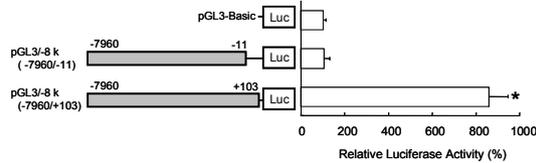
#### 《Luciferase assay を用いた CYP3A4 遺伝子 5' -上流域の機能解析》

これまでの研究により、CYP3A4 mRNA 発現量と CYP3A4 遺伝子 enhancer 領域に存在する CG site のメチル化頻度、2 kb 上流域のヒストン H3 アセチル化状態との間に相関が得られている。そこで、それぞれの CYP3A4 遺伝子上流域配列が実際に転写活性に与える影響について、Luciferase assay により検討を行った。目的とする CYP3A4 遺伝子各上流域を luciferase 遺伝子の 5' 上流に挿入した reporter vector を作製し、HepG2 細胞にトランスフェクトした後 luciferase 活性を測定した。なお、CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域に対するヒストンアセチル化の関与を検討するため、HDAC i である TSA 処理を行った。TSA 処理の有無により、ヒストンアセチル化状態が目的とする配列の転写活性へ与える影響について評価を行った。また、enhancer 領域の DNA メチル化の影響を検討するため、同領域の CG site をメチル化酵素によりメチル化した reporter construct を作製し、メチル化がヒストンアセチル化と共に転写活性へ与える影響を評価した。

#### 1. reporter assay に用いる挿入配列範囲の検討

CYP3A4 遺伝子上流域の転写活性を評価する際、vector へ挿入する領域を選択する必要がある。これまでに遺伝子 5' 上流域の評価を行うため reporter assay を行った報告には、挿入フラグメントの 3' 末端を転写開始点 (+1) より上流に設定したものと、下流に設定したものが存在する [37, 38]。今回目

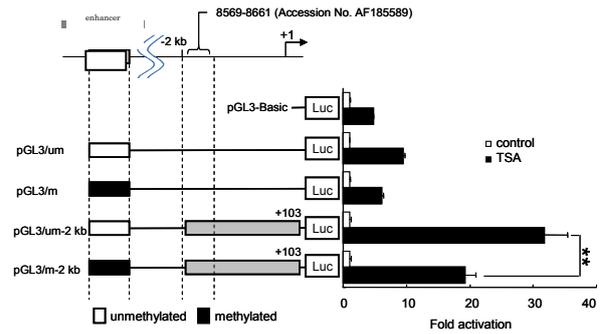
的とする領域の評価を行うにあたり適当な範囲を選択するため、両パターン of vector を作製し転写活性の違いを検討した (Fig. 4)。その結果、転写開始点よりも下流までの領域を含む vector (-7960/+103) のみが活性を示した。基本的な転写活性を評価するうえで +103 までの領域を含める必要があるという結果を示したため、以後の結果で示す vector は +103 までの領域を含むよう設計した。



**Fig. 4 Identification of the region essential for constitutive activity in CYP3A4 5'-flanking region.**  
The indicated positions are relative to the transcription initiation site. Chimeric CYP3A4 5'-flanking region about 8 kb-luciferase (Luc) reporter gene constructs contain sequence of -11 to +103 or not were generated as described in *methods*. HepG2 cells were transiently transfected with these constructs and cultured for 77 hr. Luciferase values are normalized to pGL4.70 vector and the mean value obtained with the pGL3-Basic vector as 100%. Data represent the mean  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments performed in triplicate and analyzed using Dunnett's test. \*,  $p < 0.05$ ; statistically different from empty vector (pGL3-Basic).

2. DMR 領域の DNA メチル化が与える CYP3A4 上流 2 kb のヒストンアセチル化による転写活性への影響

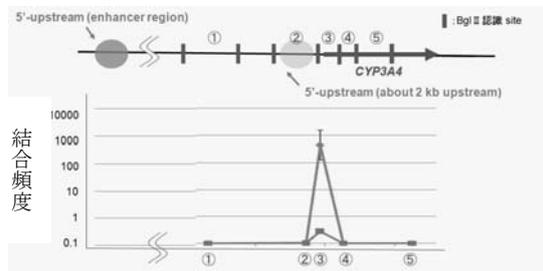
Cohesin モデルは、cohesin や CTCF が遺伝子をループ状に束ねることで、数 Mb もの離れた領域に存在する enhancer と promoter を空間的に近傍に存在させ、遺伝子の発現を制御すると考えられているモデルである。CYP3A4 の発現制御がこのようなメカニズムによるものかどうかを検討するため、enhancer として仮定する DMR 領域と、promoter として仮定する 2 kb 上流域とを実際に近傍に存在させた reporter vector を作製し、TSA 処理を行った環境下で luciferase assay を行った。また 2 kb 上流域のヒストンアセチル化による転写活性へ、DNA メチル化が与える影響を検討するため、メチル化酵素を用いて DMR 領域を特異的にメチル化、あるいは非メチル化状態とした reporter vector を作製した。pGL3/-2 kb vector に、非メチル化状態の enhancer 領域をつなげた vector (pGL3/um-2 kb) は TSA 存在下で 31.9 倍の転写活性上昇を示した (Fig. 5)。一方、enhancer 領域を特異的にメチル化した vector (pGL3/m-2 kb) の転写活性の上昇は 19.2 倍であり、pGL3/um-2 kb に比べ有意に値が低下していた。同時に enhancer 領域をメチル化/非メチル化状態とした配列のみを挿入した vector の活性も測定したところ、メチル化状態 (pGL3/m) では 6.2 倍、非メチル化状態 (pGL3/um) では 9.5 倍の上昇を示した。全 vector のなかで、非メチル化状態とした enhancer 領域を、上流 2 kb までを含む領域へつないだ pGL3/um-2 kb vector が最も高い転写活性の上昇を示した。



**Fig. 5 Influence of *in vitro* methylation on differentially methylation region (DMR) to transactivation of CYP3A4 5'-flanking region by TSA.**  
Both DMR-supecifically methylated construct and unmethylated control construct were used directly for luciferase assay without any amplification in *Escherichia coli*. Open and filled box represent the unmethylated and methylated region of DNA, respectively. After transfection into HepG2 cells, cultured and treated with TSA (5  $\mu$ M) as described in *methods*. Data represents mean  $\pm$  S.D., and luciferase values are normalized to pGL4.70 vector and expressed as activity obtained with TSA relative to untreated control. \*\*,  $p < 0.01$ ; statistically analyzed using unpaired *t* test.

### 《3C アッセイによる CYP3A4 遺伝子近傍の高次構造解析》

3C アッセイは enhancer 領域ならびに CYP3A4 遺伝子近傍について行った。その結果、CYP3A4 発現量の高い肝検体において enhancer 領域は CYP3A4 遺伝子の転写開始点と近接状態にあり発現量が低い検体ではその強い近接状態を認めなかった。転写開始点以外の領域においてはいずれの検体においても高次構造の変化はなかった (Fig. 6)。



**Fig. 6 enhancer 領域と CYP3A4 遺伝子近傍配列の結合頻度**

### 《OCT2 遺伝子の 5' 上流域の epigenetic 解析》

OCT2 遺伝子の 5' 上流域のヒストンアセチル化・ヒストンメチル化解析を行った。その結果、ヒストンアセチル化と OCT2 mRNA 発現量との間には有意な相関を認めなかったが (Fig. 7A)、ヒストンメチル化状態との間には有意な負の相関を認めた (Fig. 7B)。このことから、OCT2 遺伝子の発現量の個人差には OCT2 遺伝子の 5' 上流域のヒストンメチル化が作用していることが示された。

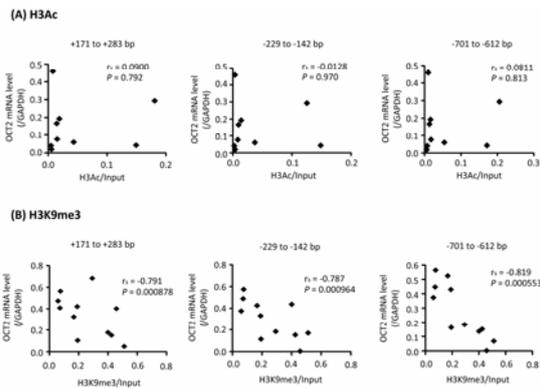


Fig. 7 Correlation between histone modifications and mRNA levels in human placental samples.

以上より、enhancer 領域の DNA メチル化が CYP3A4 遺伝子の発現調節に重要であり、同領域は CYP3A4 遺伝子近傍を含む非常に幅広い領域において大きな高次構造の変化を伴うことにより転写活性に影響を与えている可能性が示唆された。

本研究結果はこれまで不明であった CYP3A4 遺伝子の個人差要因について epigenetic メカニズムを含む DNA メチル化が重要であることを初めて明らかにした。また、CYP3A4、OCT2 両遺伝子とも genetic な制御のみならず epigenetic な機構が重要であることが示されたことから、両遺伝子以外の薬物動態関連遺伝子の解析に epigenetic 研究の推進が必須であると思われる。

## 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 1 件)

Saito J, Hirota T, Kikunaga N, Otsubo K, Ieiri I.

Interindividual differences in placental expression of the SLC22A2 (OCT2) gene: Relationship to epigenetic variations in the 5'-upstream regulatory region.

Journal of Pharmaceutical Sciences

査読有

[Epub ahead of print]

2011

[学会発表] (計 1 件)

Junpei Saitoh, Takeshi Hirota, Naomi Kikunaga, Ichiro Ieiri

Imprinting Analysis of OCTs Genes in Human Placenta

18<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations

May 16-20, 2010

Beijing, China

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣田 豪 (HIROTA TAKESHI)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80423573