

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390035

研究課題名(和文) 遺伝子空間的転写モデルに基づいたCYP3A4代謝活性の個人差解明とその臨床展開

研究課題名(英文) Analysis of cohesin model in CYP3A4 gene and individual phenotypic status

研究代表者

家人 一郎 (IEIRI, ICHIRO)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3A4遺伝子発現の個人差の要因解明ならびにCYP3A4遺伝子発現予測バイオマーカーの確立を試みた。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。ヒト末梢血の遠心分離とそれに引き続く肝特異的膜タンパクを利用した免疫沈降を行い、ヒト肝特異的なmiR-122を発現する細胞の分離に成功し、同細胞から分離したDNAのDNAメチル化状態の解析も可能であったことからバイオマーカーの分離解析手法を確立することができたと思われる。

研究成果の概要(英文)：We showed that DNA methylation in CYP3A4 enhancer region is critically involved in determining the individual hepatic CYP3A4 mRNA level. Chromosome Conformation Capture (3C) assay suggested long-range cis-interaction between the enhancer region and the transcription start site. It is well known that miR-122 shows specific expression in human liver and asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) is a liver-specific protein. We established the method using immuno-precipitation with polyclonal antibody against ASGP-R, to isolate the circulating cells showing miR-122 expression from peripheral blood. These results suggest that the isolated cells is from human liver cells. The established method can be used for the detection of human liver DNA methylation status using peripheral blood.

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

1. 研究開始当初の背景

CYP3A4 は、臨床で使用される 60%以上の医薬品の代謝に關与する最も重要な代謝酵素の一つであるが、その機能には大きな個人差が存在する。網羅的な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、幅広い個人差の原因は明らかとなっていない。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発現の制御機構に着目した検討が重要である。

近年、新たな遺伝子発現制御機構としてエピジェネティクスが注目されている。エピジェネティクスとは DNA の塩基配列によらない遺伝子発現制御機構であり、体細胞においてはその記憶が伝承される。代表的なものには、DNA メチル化やヒストンアセチル化が挙げられる。DNA メチル化は、CG ジヌクレオチドの C の 5 位炭素にメチル基が付加するもので、遺伝子の転写制御に関わっている。近年、ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞において、DNA 脱メチル化剤である、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理により CYP3A4 mRNA の発現量が有意に増加したという報告がある (Dannenbergl O. et al., 2006)。また、CYP3A4 mRNA 発現が低いヒト結腸がん由来細胞である Caco-2 細胞や、ヒト結腸腺がん細胞である HT29 細胞においても、DNA 脱メチル化に伴う CYP3A4 mRNA 発現上昇がみられたという報告が行われている (Habano W. et al., 2011)。これらの知見から、DNA のメチル化が CYP3A4 発現に關与している可能性が考えられる。

これまでの当研究室の研究により、ヒト肝臓において、CYP3A4 遺伝子転写開始点 5 Mb 下流に、メチル化に個人差がみられる differential methylated region (DMR) (82563-82608, GenBank Accession No.AC069292) が存在していることが確認された。また、この領域における DNA メチル化頻度と CYP3A4 遺伝子転写開始点 2 kb 上流域におけるヒストンアセチル化、及び CYP3A4 mRNA 発現レベルの三者にそれぞれ相関がみられることが確認されている (図 1、2)。すなわち、DMR におけるメチル化頻度が高い場合は、2 kb 上流のヒストンが脱アセチル化状態となることで、転写が抑制されるために CYP3A4 の mRNA 発現レベルは低くなり、逆に DMR におけるメチル化頻度が低い場合には、ヒストンがアセチル化されることにより転写が活性化されて、CYP3A4 の mRNA 発現レベルは高くなっていた。このことから、DMR のメチル化と 2 kb 上流域のヒストンアセチル化が、CYP3A4 mRNA の発現制御に關与している可能性が示唆さ

れたが、これらの領域がどのように作用して転写を制御しているかは未だ不明である。

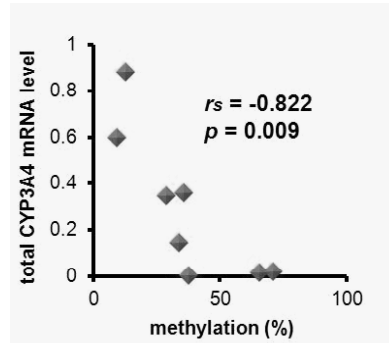


図 1 .ヒト肝 CYP3A4 mRNA 発現量と DMR における DNA メチル化頻度との関連

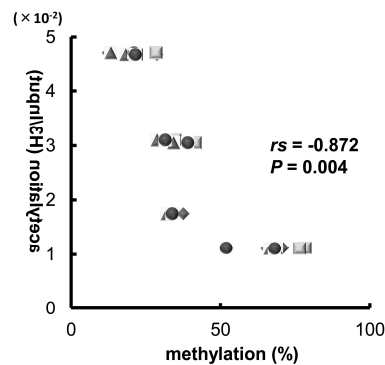


図 2 . CYP3A4 遺伝子の promoter 領域のヒストンアセチル化と DMR における DNA メチル化頻度との関連

DMR は CYP3A4 転写開始点から 5 Mb と非常に離れた場所に座位している。このように転写開始点から離れた位置で転写を制御する element として、enhancer が挙げられる。Enhancer は、転写開始点から数 kb、数 Mb 離れた位置からでも遺伝子発現制御を行うことが報告されており (Krivega I. et al., 2012, Long X. et al., 2007, Dekker J., 2008)、またその配列が種間で保存されるという特徴を有している (de la Calle-Mustienes E. et al., 2005)。以前の当研究室の研究によって DMR の配列は多くの種間で高度に保存されていることが確認されており、DMR が enhancer としての機能の一端を有していることが示唆される。

DMR と 2 kb 上流域のように、非常に離れた位置に存在している二つの領域が相互作用して転写を制御するメカニズムとして cohesin によるゲノムループ構造を介した空間的な制御が報告されている (de la Calle-Mustienes E. et al., 2005, Ball AR Jr. et al., 2013)。Cohesin には、遠位に存在する enhancer と promoter を空間的に近接させることにより転写を活性化するメカニズムが提唱されており、またエピジェネティクスとの関与も示唆されている (Chien R. et al., 2011) (図 3)。このような空間的近接性を確認する方法として、近年 chromosome

conformation capture assay (3C assay) が注目を集めている。この手法は、最初にホルムアルデヒドを用いてクロマチンを固定化した後、制限酵素を用いてクロマチンを切断し、断片化したものを分子内で再結合させることにより、直線状では離れているが空間的に近接している DNA 断片は互いに結合することができる (de Wit E. et al., 2012)。

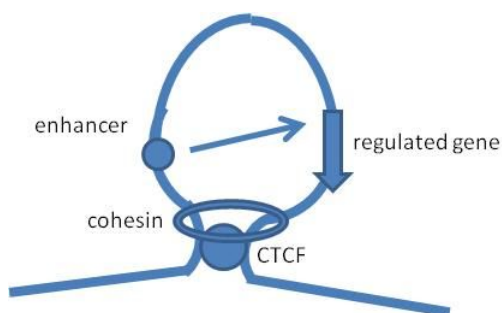


図3. コヒーシンによるエンハンサーメカニズム (Uhlmann, F.: *Nature*. 451:777-8, 2008 より一部改変)

そこで本研究では、この DMR、2 kb 上流域を介した CYP3A4 遺伝子の空間転写メカニズムの解明を目的とし 3C assay を行った。

また、これまでに得られた知見を臨床展開するため、ヒト末梢血を試料としたヒト肝における CYP3A4 発現量予測のためのバイオマーカーを探索もあわせて解析することとした。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト CYP3A4 遺伝子の制御機構解明を目的に遺伝子の高次構造解析を行った。また、臨床展開を視野に CYP3A4 機能予測バイオマーカーの確立も試みた。

3. 研究の方法

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。

ChIP assay を用いた CYP3A4 遺伝子の空間転写関連因子の解析

HepG2 細胞に 5-aza-dC 処理を行い、cohesin 形成タンパクの一つである rad21 を標的とした抗 rad21 抗体を用いて ChIP assay を行った。また、ポジティブコントロールとして転写開始に必要なタンパク質である RNA polymerase 2 (pol2) についても検討を行った。

GR のノックダウンによる CYP3A4 発現への影響解析

In silico 解析において転写因子の探索ツールの一つである ALGGEN-PROMO を用いて

DMR に結合すると予測される転写因子の探索を行った。その結果、DMR に結合すると予測された転写因子として GR が候補として挙げられた。siRNA を用いて GR がメチル化状態、脱メチル化状態のそれぞれにおいて CYP3A4 発現に与える影響について評価した。HepG2 細胞に脱メチル化剤である 5-aza-dC を 0 μ M、5 μ M それぞれ加え培養したものを用意し、GR の siRNA を transfect 後、GR mRNA 発現量、CYP3A4 mRNA 発現量を定量した。

DMR における GR の結合確認

GR が脱メチル化状態において DMR と相互作用しているかを検討するために、HepG2 細胞に 5-aza-dC 処理を行い、抗 GR 抗体を用いて ChIP assay による解析を行った。対象領域を DMR 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。

血液から分離した細胞の肝由来の確認

A) GSTP1 プロモーター領域のメチル化解析

Ficoll-Paque による遠心分離と ASGPR による磁気分離によって得られた細胞が、肝由来細胞であるかを確認するために、プロモーター領域が肝特異的にメチル化されているとの報告がある GSTP1 遺伝子に関して、bisulfite sequence 法を用いメチル化解析を行った。報告において、肝特異的なメチル化が認められているのは GSTP1 遺伝子の転写開始点から -7 ~ +4 番目の CG site であるので、それらの CG sites についてそれぞれ 10 個のクローンを解析した。

B) SmartFlareTM RNA 検出プローブを用いた確認

末梢血由来の細胞が、肝由来細胞であるか確認するもう一つのアプローチとして、SmartFlareTM RNA 検出プローブを用いた確認を行った。RNA 検出プローブは標的の RNA と結合することにより蛍光プローブを放出することにより標的 RNA が細胞内に存在しているかを視覚的に判断することができる。今回蛍光プローブとして、いずれの配列も認識しない scramble control (ネガティブコントロール)、ほとんど全ての細胞に発現している GAPDH mRNA (ポジティブコントロール)、肝細胞特異的に発現している microRNA-122 (miR-122)、肝細胞には発現しておらず血球細胞に発現している microRNA-137 (miR-137) を用いて観測を行った。

4. 研究成果

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

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 (図4)。

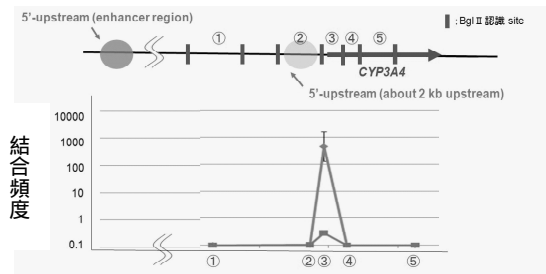


図4. enhancer 領域と CYP3A4 遺伝子近傍配列の結合頻度

ChIP assay を用いた CYP3A4 遺伝子の空間転写関連因子の解析

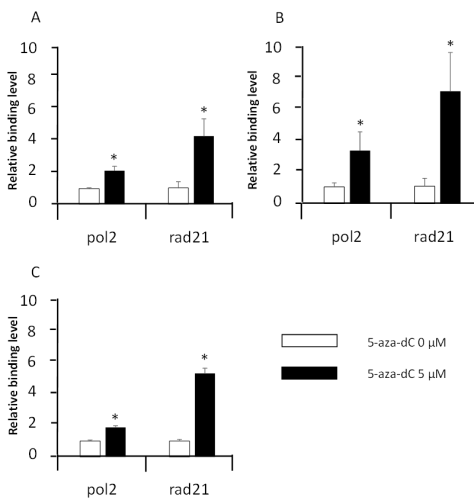


図5. ヒト肝がん由来 HepG2 細胞における脱メチル化処理による DMR における rad21 の結合変化

rad21, pol2 についてそれぞれ 5-aza-dC 処理を行った細胞で、いずれの領域においても結合量の増加が認められた ($p < 0.05$, 図5)。GR のノックダウンによる CYP3A4 発現への影響解析

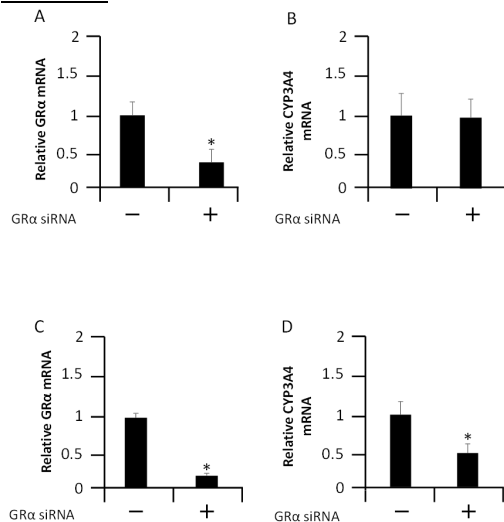


図6. GR のノックダウンによる CYP3A4 遺伝子発現への影響評価。

脱メチル化未処理細胞における GR (A), CYP3A4 (B)発現量

脱メチル化処理細胞における GR (C), CYP3A4 (D) 発現量

脱メチル化未処理細胞においては CYP3A4 mRNA 発現量に変化は認められなかった。一方で、DNA 脱メチル化処理を行った細胞においては GR のノックダウンにより有意な CYP3A4 mRNA 発現の減少が認められた ($p < 0.05$, 図6)。

DMR における GR の結合確認

脱メチル化処理による GR の結合量変化について比較検討を行ったところ、GR の DMR に対する結合量に有意な増加が認められた ($p < 0.05$, 図7)。

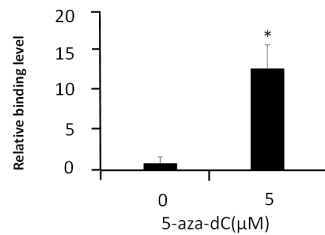


図7. 脱メチル化処理による DMR における GR の結合変化。

血液から分離した細胞の肝由来の確認

A) GSTP1 プロモーター領域のメチル化解析

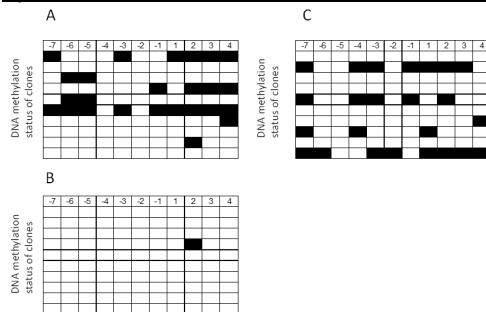


図8. GSTP1 の 5'上流域のメチル化解析

A, ヒト肝組織, B, 末梢血リンパ球, C, 末梢血から分離した肝由来細胞

正常肝組織において GSTP1 プロモーター領域はメチル化されていた (図8A)。また遠心分離後磁気分離は行わなかった末梢血由来細胞において DNA メチル化は認められなかったのに対し、遠心分離後 ASGPR により磁気分離を行った細胞において GSTP1 プロモーター領域はメチル化されていた (図8B, C)。B) SmartFlare™ RNA 検出プローブを用いた確認

末梢血由来細胞を ASGPR により磁気分離した細胞について RNA の検出を行った。Scramble control, miR-137 では蛍光が確認されなかったのに対し、GAPDH, miR-122 では蛍光が確認された (図9)。

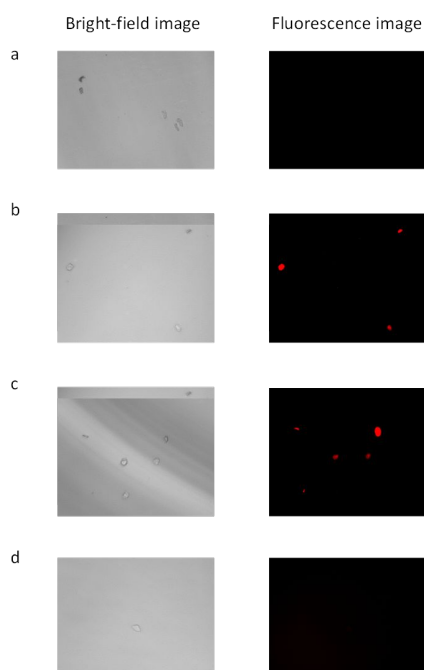


図 9, 血液から分離した肝由来細胞の SmartFlare RNA 検出
a, miRNA scramble、b, GAPDH mRNA、c, miR-122、d, miR-137

A), B)の結果から、末梢血から特異的に肝由来細胞を分離されたことが確認できた。

以上の結果より、CYP3A4 遺伝子発現制御機構にはコヒーシンの関連した高次構造が重要な働きを持つことが示唆され、GR が介在する転写因子として検出された。また、血液中から肝由来細胞を分離する方法が確立できたことから、当該細胞よりゲノム DNA を抽出し DMR における DNA メチル化を解析することで CYP3A4 機能予測バイオマーカーに展開していくことが可能であると思われる。

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)

[学会発表](計 3 件)

藤田 麻里絵、江口 駿介、廣田 豪、家入 一郎

エピジェネティック制御機構に基づく CYP3A4 遺伝子発現制御メカニズムの解析
第 30 回日本薬学会九州支部大会,
2013.12.08.

江口 駿介、廣田 豪、舞 彩華、家入 一郎

ヒト CYP3A4 遺伝子発現のゲノム空間構造解析に基づく個人差解明
日本薬学会 第 133 年会, 2013.03.28

江口 駿介、廣田 豪、家入 一郎
CYP3A4 遺伝子発現の個人差解明を指向したエピジェネティック解析
第 28 回日本薬学会九州支部大会,
2011.12.10

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野
Publication
<http://doutai.phar.kyushu-u.ac.jp/6.publications/publications.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

家入 一郎 (IEIRI, Ichiro)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60253473

(2)研究分担者

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