

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659083

研究課題名（和文） コヒーシンモデルを導入した薬物トランスポーター遺伝子発現メカニズムの解明

研究課題名（英文） Cohesin-dependent regulation of the expression of drug transporter genes

研究代表者

家入 一郎 (IEIRI ICHIRO)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60253473

研究成果の概要（和文）：

ヒト小腸において CYP3A4 と ABCB1 発現量には検体間で数十から数百倍の大きな個体間変動が存在するものの、両者の間には有意な正相関が認められた。このことから、両遺伝子の発現制御には共通の制御機構が関与している可能性を想定した。染色体上において両遺伝子が局在する領域の間に位置する CpG island のメチル化状態は、一部の CG site において脱メチル化が生じていることが明らかとなった。これらの領域は CTCF 結合領域と考えられることから、同 CG site の脱メチル化がコヒーシンモデルによるループ構造を惹起するという発現制御機構が予想された。CYP3A4 と ABCB1 遺伝子発現に共通の機序の存在の可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Human intestinal CYP3A4 and ABCB1 mRNA expression levels showed large inter-individual differences and a significant association between them. The CpG island located in the region between CYP3A4 and ABCB1 genes locus were analyzed by bisulfite sequencing method. Some CG sites (No. 14-18) were partially demethylated in human intestinal samples. Since these regions include CTCF binding regions, demethylation in the CG sites (No. 14-18) are suggested to be important for cohesin mediating transcriptional insulation in CYP3A4 and ABCB1 gene locus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：オーダーメイド医療

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素 CYP3A4 は第 1 相反応への寄与が最も大きい代謝酵素であるが、その発現量には 50 倍もの個人差が存在する。テーラーメイド医療実現に最も重要な遺伝子の 1 つであるが個人差の原因は未だ明確になっていない。CYP3A4 遺伝子発現の個人差要因

解析は、これまで遺伝子多型を中心に、転写因子についても幅広い研究が行われてきた。しかし、いずれも頻度や寄与が小さく決定的な要因ではないと考えられている。これまでに、CYP3A4 発現には染色体間で発現に偏りがあり、偏りの程度と CYP3A4 mRNA 発現やその活性には強い相関があることを示し

てきた (Hirota, T. et al.: Hum Mol Genet. 13(23):2959-69, 2004)。しかしながら、現在まで染色体間の発現の偏りと CYP3A4 発現量の相関についてのメカニズムを同定するには至っていない。

一方、薬物トランスポーター ABCB1 は各種抗がん剤やジゴキシンなどの多く薬物の輸送に関与することが知られており、これまで多くの遺伝子多型について解析されてきたが機能的に重要な遺伝子多型は見つかっていない。CYP3A4 と ABCB1 は、臓器分布性 (小腸と肝臓に存在) と基質特異性が非常に類似しており、解毒の観点からは協奏的に働く。興味深いことに ABCB1 遺伝子は CYP3A4 遺伝子と染色体上の近傍に位置しており、共通のエピジェネティック機構が両遺伝子の発現制御に関与していることを想定した。今回我々は染色体上の遺伝子発現制御機構としてコヒーシオンモデルに着目した。コヒーシオンモデルでは、コヒーシンや CCCTC-binding factor (CTCF) による遺伝子のループ形成を通してエンハンサーとプロモーターが空間的に近傍に配置され、両領域が相互作用して遺伝子発現が調節されると考えられている。DNA メチル化の有無を介したコヒーシンや CTCF 結合の変化が CYP3A4・ABCB1 遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしているのではないかと考えヒト小腸における DNA メチル化解析ならびに CTCF 結合領域の同定を目指す。

本研究の達成により、これまで不明であった CYP3A4・ABCB1 遺伝子の個人差要因が解明されるだけでなく、本研究により用いられた手法を他の薬物動態関連遺伝子解析にも応用できることが予想され、普遍的な手法となる可能性がある。また、CYP3A4・ABCB1 活性予測の臨床での実現が期待され医薬品の適正使用の進展に貢献でき、医薬品開発においても、臨床試験時に事前にボランティアを活性予測により層別することで、ボランティアの安全性が高まると同時に試験自体の効率化が図れると考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒト小腸組織から抽出したゲノム DNA ならびに mRNA を用いて、DNA メチル化・ヒストンアセチル化、CYP3A4・ABCB1 発現量を定量的に評価する。以上の解析により DNA メチル化とコヒーシオンモデルとの関連を同定することで、CYP3A4・ABCB1 発現の個人差の原因を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) CYP3A4・ABCB1 遺伝子多型解析

#### ①CYP3A4

これまでに報告された CYP3A4 遺伝子多型はいずれも頻度が非常に低いことから、抽出し

たゲノム DNA について全 exon を対象に PCR、ダイレクトシーケンスを行い遺伝子多型の有無を解析した。

#### ②ABCB1

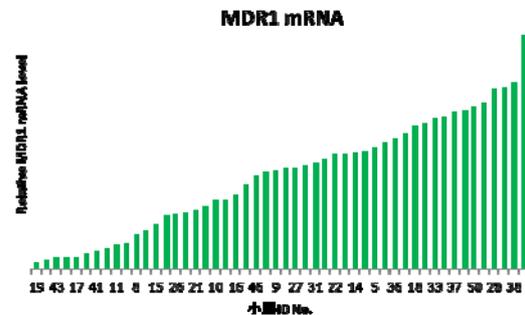
これまでに比較的頻度高い coding SNPs として報告されている ABCB1 C3435T と G2677T/A を対象に PCR-restriction enzyme fragment polymorphism 法またはダイレクトシーケンスにより遺伝子多型を同定した。

### (2) DNA メチル化解析

抽出したゲノム DNA について CpGenome™ DNA Modification Kit (CHEMICON) を用いて、製品添付のプロトコールに従って処理し、ゲノム上の unmethylated-cytosine (C) を uracil (U) に変換修飾した。CG site のメチル化解析は、Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法により行った。bisulfite 処理後のゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行い、メチル化 CG site を認識配列に含む制限酵素により処理した。制限酵素認識配列を有さない CG site についてはクローニング、ダイレクトシーケンスを行うことでメチル化頻度を同定した。

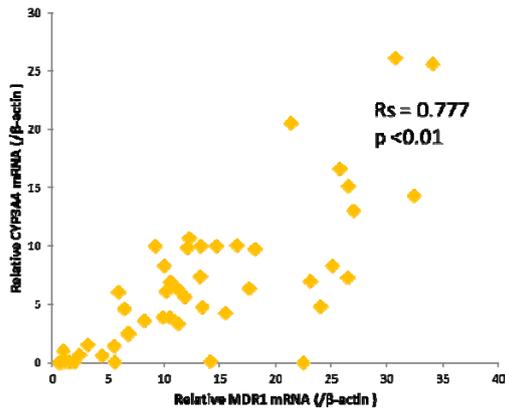
## 4. 研究成果

### (1) ヒト小腸における CYP3A4, MDR1 mRNA 発現量



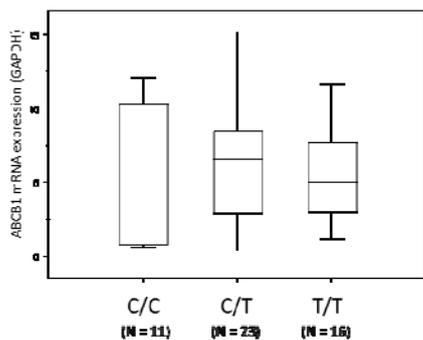
両遺伝子の発現量定量的結果、MDR1 mRNA 約 40 倍、CYP3A4 mRNA 数百倍の個体間変動が認められた。

(2) ヒト小腸における CYP3A4, MDR1 mRNA 発現量相関分析



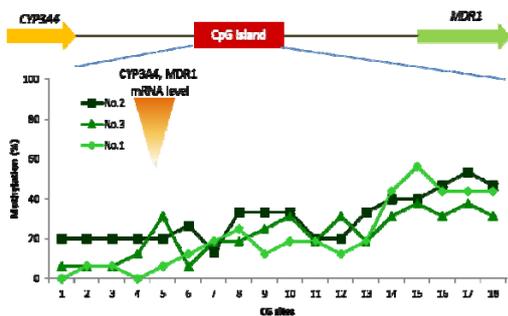
ヒト小腸において CYP3A4, MDR1 mRNA 発現量は有意な正の相関が認められた。

(3) ヒト小腸における ABCB1 exon26 C3435T 遺伝子多型解析



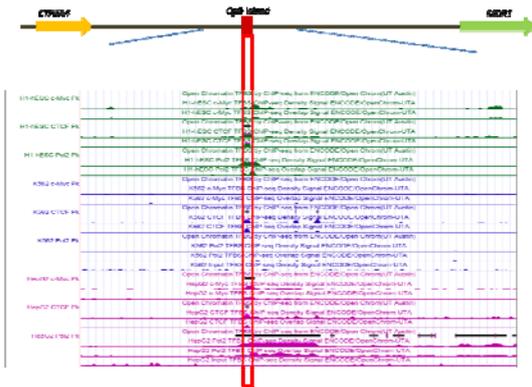
ヒト小腸において C3435T 遺伝子多型の ABCB1 mRNA 発現量への影響は認められなかった。

(4) ヒト小腸における DNA メチル化解析



DNA メチル化解析の結果、CG site No.14-18 において脱メチル化が一部存在していた。

(5) CTCF の結合領域の同定



オンラインデータベース ENCODE consortium in the UCSC Genome Browser を用いて、コーヒンと共局在することが知られている CTCF の結合領域について調べた。その結果、今回解析対象とした CpG island において CTCF が結合していることが示された。

以上の研究結果より、CpG island における脱メチル化が CTCF 結合を介してコーヒンによるループ構造の形成に関与している可能性が示唆された。

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)

(1) 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. 2011;100(9):3875-83. doi: 10.1002/jps.22595.

[学会発表] (計 1 件)

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、横浜、3 月 28 日、2013 年。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家入 一郎 (IEIRI ICHIRO)  
九州大学・薬学研究院・教授  
研究者番号: 60253473

(2) 研究分担者

廣田 豪 (HIROTA TAKESHI)

Pdf 化により図が不鮮明になるため、下記に  
拡大版を作成し、提示した。

