

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293121

研究課題名(和文) DNAメチル化頻度をバイオマーカーとしたCYP3A4活性評価の臨床応用

研究課題名(英文) DNA methylation biomarkers for estimation of the activity of CYP3A4 in human livers

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝臓においてCYP3A4は現在の臨床現場で用いられる薬物の半数以上の代謝に関わっているが、酵素活性においては数十倍もの個人差が認められている。本研究より、CYP3A4遺伝子発現制御には、エピジェネティック制御機構に基づくゲノム構造変化が重要な役割を果たしていることが示され特に、DMR領域がCYP3A4遺伝子に立体的に近接しG を起点としたenhancer-promoter間の相互作用やクロマチンの構造変化を含むダイナミックなゲノム構造変化がCYP3A4発現制御に大きく寄与していることを明らかにした。また血液中から肝由来細胞の分離を確認し、バイオマーカーとして利用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：CYP3A4 is the major CYP isozyme in adult human liver, small intestine and other extrahepatic tissues. A wide inter-individual variation exists in levels of expression of CYP3A4. The basis of this variation is not yet understood but may be due to genetic factors. However, the allelic frequencies of SNPs and/or the available functional data indicate a limited role of these variants in the inter-individual variability of CYP3A4 expression and activity. We analyzed the epigenetic mechanisms to regulate the transcription of CYP3A4 gene. Our results showed the relationship between CYP3A4 expression and the status of DNA methylations in human liver, and the conformation around CYP3A locus has the cohesin loop model based on the G binding complex. In addition, we established the method to isolate the circulating cells in human blood, and the isolated hepatic cells from peripheral blood showed the expression of human miR-122 which is expressed only in human livers.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬剤反応性 ゲノム CYP3A4 コヒーシンモデル

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素 CYP3A4 はヒト肝臓において最も多く発現する CYP 分子種であり、現在臨床現場において用いられる医薬品の半数以上を基質としている。また、その発現量には約 50 倍、活性には数十倍の個人差が認められており、薬物の応答性や毒性を決定するうえで重要な因子の一つであると考えられる。CYP3A4 発現の個人差は食事や年齢、性別といった非遺伝的な要因に比べ、cis-element や trans-acting factor による遺伝的要因が主であり、約 90 %を占めることが報告されている。しかしながら、CYP3A4 遺伝子に関してこれまでに数多くの遺伝子多型が同定されているものの、活性に影響を及ぼす多型は少なく、またほとんどの多型について頻度が非常に低いことが分かっている。さらに CYP3A4 の転写因子として広く知られている PXR や CAR の遺伝子多型に関しても解析が行われており、個人差に一部寄与する可能性が示唆されているものの、その大部分については未解明なままである。このような実情から、遺伝子多型以外の側面から個人差解明に向けたアプローチをしていく必要があると考えられる。

遺伝子発現の個人差に影響を及ぼす因子の一つとして、近年エピジェネティクスが注目されている。エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一つである DNA メチル化は、DNA 配列中の CG sites という cytosine (C)、guanine (G) ジヌクレオチドの C の 5 位炭素がメチル化される現象であり、ヒトにおいては 60-90 %の CG sites で認められている。また、ゲノム上で CG sites が高密度に存在する CpG island と呼ばれる領域が存在し、この領域の DNA メチル化によって遺伝子の発現が抑制されることが知られている。これまでに多くの CYP に関してエピジェネティクスによる遺伝子発現制御を受けているとの報告がなされており、このことから CYP3A4 についてもその制御下にある可能性が考えられる。2014 年、Zhiyun らは CYP3A4 mRNA に作用する miRNA に関してその発現への影響を網羅的に解析し、4 種の miRNA 発現量と CYP3A4 翻訳効率に有意な相関があったと報告している。しかしながら、同定されたいずれの miRNA に関して発現量の個人差は非常に小さく、また翻訳効率との相関も弱いものであった。また、CYP3A4 は mRNA とタンパクの発現量との間に強い相関関係があることが知られていることから、転写後の翻訳抑制に働く miRNA の個人差への寄与は大きくないことが想定される。2006 年、Dannenbergl らはヒト肝がん細胞である HepG2 細胞に対して DNA 脱メチル化剤である 5-aza-dC を処理することにより、CYP3A4 mRNA 発現量が有意に上昇したと報告しており、このことから CYP3A4 発現に DNA メチル化が関与している可能性が考えられる。ヒト肝がん細胞における検討を受けて、2012

年に Kacevska らはヒト肝組織を用いて CYP3A4 遺伝子 12 kb 上流までの領域に関して DNA メチル化解析を行った。しかしながら、CYP3A4 発現の個人差要因の特定には至っておらず、解析領域をコーディング領域や 3' 非翻訳領域まで拡大していく必要があると考察している。

我々は、CYP3A4 遺伝子を含むヒト染色体 7q.21 に着目した。マウスの 6 番染色体には、ヒト染色体 7q.21 と相同な領域が存在しており、この領域内に存在している SGCE-PEG10 遺伝子間の CpG 領域が DNA のメチル化状態によって周辺の遺伝子発現を制御する imprinting control region (ICR) であることが報告されている。このことから、CYP3A4 遺伝子もこの領域の DNA メチル化によって発現を制御されている可能性を考え、検討を進めてきた。当研究室ではヒト肝組織を用いて CYP3A サブファミリー近傍、及び ICR 内に存在する計 7 つの CpG island に関して DNA メチル化解析を行い、ICR 内の CpG island のうち 4 か所の CG site における DNA メチル化頻度に大きな個人差が認められる領域を同定した (以後この DNA メチル化頻度に個人差の認められた領域を differentially methylated region : DMR とする)。また本領域の DNA メチル化頻度は CYP3A4 mRNA 発現量と有意な負の相関関係にあった (Figure 1)。

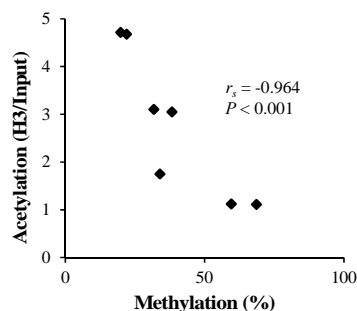


Figure 1 Relationship between CYP3A4 expression and epigenetic regulation in human liver

また同メチル化頻度は CYP3A4 遺伝子の 2 kb 上流域におけるヒストンアセチル化状態とも強い相関が認められた。すなわち、CG site の DNA メチル化頻度が高い検体では、2 kb 上流域のヒストンが脱アセチル化状態であり CYP3A4 mRNA の発現量が低く、一方で CG site の DNA メチル化頻度が低い検体においては、2 kb 上流域のヒストンがアセチル化されており CYP3A4 mRNA 発現量が高かった。これらの事象から、CYP3A4 発現制御には DNA メチル化、及びヒストンアセチル化が寄与している可能性が考えられる。さらに当研究室では、DNA メチル化やヒストンアセチル化がどのように CYP3A4 遺伝子発現を制御しているのかを調べるため、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて in vitro での検討も行っている。これまでの検討により、

CYP3A4 発現機構において DNA メチル化がヒストンアセチル化よりも高位の制御メカニズムとして働くこと、CYP3A4 遺伝子から非常に遠位に存在する DMR がゲノムループ構造を形成することで物理的に CYP3A4 遺伝子近傍に近接し、enhancer として転写活性化に寄与している可能性を示した (Figure 2)。

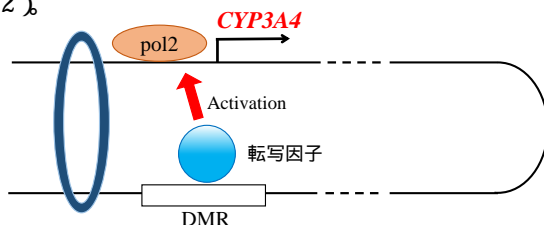


Figure 2 ゲノムループ構造による DMR を介した CYP3A4 発現制御機構

本研究では、HepG2 細胞を用いて DMR が enhancer として機能する際に、同領域に結合する転写因子の同定、及びその因子が CYP3A4 遺伝子の転写を活性化するメカニズムに関して検討を行うとともに、DNA メチル化をバイオマーカーとした CYP3A4 活性評価の臨床応用を試みた。

2. 研究の目的

DNA メチル化を介して CYP3A4 発現制御機構を明らかにすること、DNA メチル化を CYP3A4 活性評価のバイオマーカーとして確立することを目的とした。

3. 研究の方法

CYP3A4 遺伝子発現に寄与する転写因子の同定: DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を処理した HepG2 細胞と非処理細胞に対し、in silico にて DMR への結合が示唆された転写因子 glucocorticoid receptor (GR) の siRNA を用いて同因子をノックダウンした。GR 及び CYP3A4 の mRNA を real-time PCR 法により測定しノックダウンによる影響を評価した。

DMR に対する転写因子結合の確認: CYP3A4 発現との関連が認められた GR について、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)、及び抗 GR 抗体を用いた Chromatin Immunoprecipitation (ChIP assay) により結合を確認した。

DNA 脱メチル化に伴うヒストンアセチル化への影響評価: HepG2 細胞に 5-aza-dC 処理を行った後、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP assay を行った。CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域を増幅する primer を作成し、DMR の DNA 脱メチル化に伴うアセチル化ヒストン H3 の結合量変化を real-time PCR 法により測定した。

GR がヒストンアセチル化状態に及ぼす影響の評価: GR が CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域のヒストンアセチル化状態に及ぼす影響を

評価するために、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP assay を行った。細胞は 5-aza-dC 処理を行った後に、GR あるいはネガティブコントロール siRNA をトランスフェクトしたものをを用いた。

4. 研究成果

DMR に結合する転写因子の同定

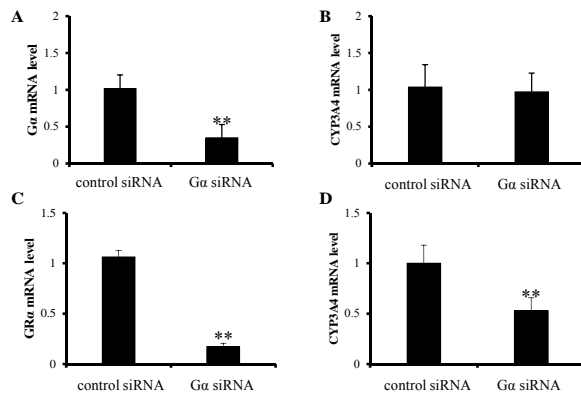
(1) DMR に結合する転写因子の探索

これまでの検討により CYP3A4 遺伝子から 5 Mb 離れた DMR の DNA メチル化が CYP3A4 発現に関連していることが示されている。DNA メチル化は転写因子の結合を阻害する遺伝子発現制御機構であるため、より詳細なメカニズムを明らかにするためには DNA メチル化により結合が阻害される転写因子の同定が必要である。そこで本項では、まず DMR に作用する転写因子の解析を行った。In silico 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 に結合が予測される候補転写因子として glucocorticoid (G) が挙げられた。

siRNA を用いて G が CYP3A4 発現に与える影響について評価した。HepG2 細胞ではこれまでの検討により DMR が高度にメチル化されていることが分かっている。そこで本検討では、DMR が DNA メチル化された状態と非メチル化状態それぞれにおいて G が CYP3A4 発現に与える影響を評価するために、DNA 脱メチル化剤 5-aza-dC 処置細胞と非処置細胞に対して G のノックダウンアッセイを行った。HepG2 細胞に 5-aza-dC を 0 μ M (Figure 3-A, B)、5 μ M (Figure 3-C, D) それぞれ加え培養したものを用意し、G siRNA をトランスフェクト後、G mRNA 発現量、CYP3A4 mRNA 発現量を定量した。Figure 3-A, C に G の siRNA ノックダウン効果を示した。DNA メチル化状態、脱メチル化状態いずれにおいても十分に siRNA のノックダウン効果が得られた ($p < 0.01$)。Figure 3-B, D には G ノックダウン効果による CYP3A4 mRNA 発現量変化を示した。DNA メチル化状態においては 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 G 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 ($p < 0.01$)。

Figure 3 The effect of G knockdown on G and CYP3A4 mRNA expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with DMSO (A, B) or 5 μ M 5-aza-dC (C, D) 72 hr before harvest. And each cell was transfected with either G siRNA or negative control siRNA for 48 hr. After the treatment of 5-aza-dC and siRNA as described in Methods, mRNA expression levels of target genes were determined using real-time PCR and normalized to GAPDH gene. Each mRNA expression is presented as fold increase to the control sample. The data represent

the mean \pm S.D. of three independent experiments. **, $p < 0.01$: statistically analyzed using student's t test.



(2) Electrophoresis Mobility Shift Assayを用いた G 結合状態の確認

ノックダウンアッセイの結果より、CYP3A4 発現に G が寄与している可能性が示唆された。次に G の DMR への結合を確認するため、DMR の G 結合予測配列をプローブとして Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を行った。G 結合予測配列を含む DMR 25 bp の 3' 末端ビオチン標識 2 本鎖 DNA プローブを用いた。また、精製タンパク質である G リコンビナントタンパク質を用いることで直接的にその結合を確認した。

結果を Figure 4 に示す。Free DMR プローブを泳動した Lane 1 に対し、G タンパクを含んだ中央のレーンでは図の黒矢印に示される DNA とタンパク質の複合体によるバンドのシフトが認められた (Lane 2)。さらに右端のレーンにおいて、標識プローブの 200 倍量の非標識 DMR プローブを添加した競合実験を行った場合にそのバンドが消失した (Lane 3)。これらの結果から DMR 中の結合予測配列への G の結合が示唆された。また、図の白矢印で示した DNA とタンパク質複合体も、非標識 DMR プローブを添加した競合実験により消失したことから、多量体を形成した G が DMR プローブと複合体を形成したものであると考えられる。

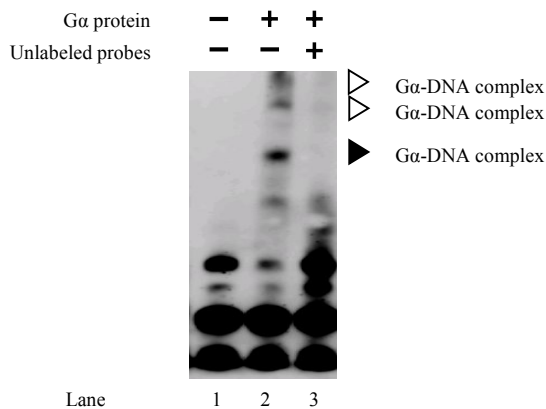


Figure 4 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) using biotin-labeled probes including the predicted G motif sequence

and G protein. Electrophoresis Mobility Shift Assays were performed with a labeled DMR probe and recombinant G proteins. Increased binding of G to the DMR sequence was detected with recombinant G (Lane 2). The use of 200-fold unlabeled probes blocks G binding (Lane 3).

(3) 5-aza-dC 処理下における DMR への G 結合量変化

EMSA の結果から G が DMR に結合可能であることが示唆された。ノックダウンアッセイの結果より、G は DNA 脱メチル化状態において CYP3A4 発現に影響することが示唆されていることから、DMR の DNA 脱メチル化に伴い G の DMR に対する結合量が増加することで CYP3A4 発現を上昇させるメカニズムが予測される。そこで DMR の DNA 脱メチル化が G の結合量変化に与える影響を評価した。

5-aza-dC 処理を行った HepG2 細胞と非処理細胞について、抗 G 抗体を用いて ChIP assay を行った。解析対象領域は DMR に加えて、ネガティブコントロールとして G の非結合領域である ABCA7 遺伝子のプロモーター領域における結合量を算出した。Ct 法を用いて免疫沈降前の input 分画に対する免疫沈降後の分画 (IP) の比 (IP/Input) を求めた。脱メチル化非処理細胞の IP/Input の値で、5-aza-dC 処理を行った細胞の IP/Input の値を除することで、5-aza-dC 処理による G 結合の変化量を求めた。ネガティブコントロールである ABCA7 に対する G の結合比を 1 とした時、DMR における G 結合比が約 1.7 倍増加した (Figure 5)。すなわち DMR の DNA 脱メチル化により、DMR への G 結合量が増加することが示唆された。

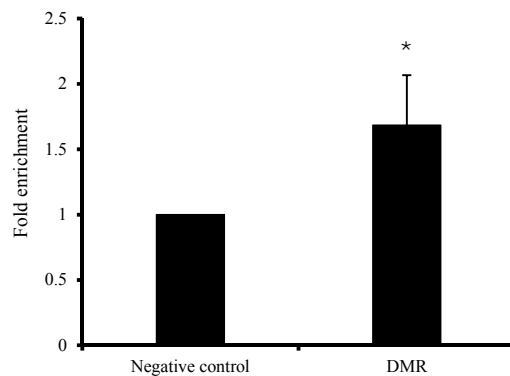


Figure 5 The effect of DNA demethylating agent on G binding frequencies at the DMR.

HepG2 cells were treated with DMSO or 5 μ M 5-aza-dC for 72 hr before harvest. Formaldehyde cross-linked chromatin was incubated with an antibody for anti-G. Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR with primers specific DMR and ABCA7 promoter as a negative control. Fold enrichment were calculated with the ratio from DMSO control cell lines. All mean \pm S.D. were

calculated from triplicated a representative experiment and analyzed using student's t test. *, p < 0.05: statistically different from negative control.

DNA 脱メチル化に伴うヒストンアセチル化の変動評価

(1) 5-aza-dC 処理によるアセチル化ヒストン H3 の結合量変化

以前のヒト肝組織を用いた検討において、DMR の DNA メチル化頻度と CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域におけるアセチル化ヒストン状態に負の相関関係が得られている。そこで、HepG2 細胞における 5-aza-dC 処理に伴う DMR のメチル化頻度の低下が、CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域のヒストンアセチル化状態に与える影響について評価した。これまでと同様の条件で HepG2 細胞に対して 5-aza-dC 処理の後 DNA を抽出し、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。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、脱メチル化非処理細胞の 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 結合量が増加することが示された (Figure 6)。すなわち、HepG2 細胞においては DNA 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 上流のヒストンアセチル化が亢進することが明らかとなった。

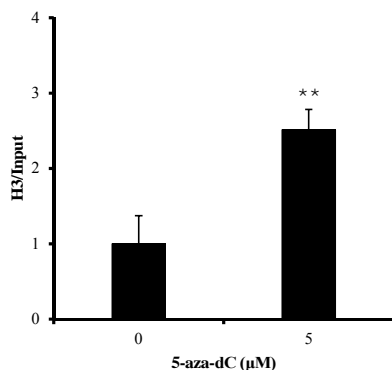


Figure 6 The effect of DNA demethylating agent on acetyl-histone H3 binding frequencies at the 2 kb upstream region from CYP3A4. HepG2 cells were treated with DMSO or 5 μM 5-aza-dC for 72 hr before harvest. Formaldehyde cross-linked chromatin was incubated with an antibody for anti-acetyl-histone H3. Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR with primers specific the 2 kb upstream region from CYP3A4 gene. Parallel PCR reaction were performed with input DNA. All mean ± S.D. were calculated from triplicated a representative experiment and analyzed

using student's t test **, p < 0.01: statistically different from cells treated with vehicle alone.

(2) G ノックダウンによるアセチル化ヒストン H3 の結合量変化

これまでの検討により DNA 脱メチル化に伴う G の DMR への結合量増加が CYP3A4 遺伝子発現を活性化させていることが考えられる。Figure 6 の結果より、DMR の DNA 脱メチル化は CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域のヒストンアセチル化の亢進にも関与していたこと、G が histone acetyltransferase (HAT) をリクルートすることが知られていることから、CYP3A4 遺伝子上流域のヒストンアセチル化の亢進に DMR へ結合した G が関与している可能性が考えられる。5-aza-dC を処置した後に G のノックダウンを行った HepG2 細胞を用いて、G knockdown 前後におけるヒストンアセチル化状態を解析することで、G が CYP3A4 遺伝子上流域のヒストンアセチル化状態に及ぼす影響を評価した。これまでと同様に、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP assay を行い、解析対象領域である CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域に 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。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、脱メチル化非処理細胞の H3/input を 1 として比較したところ、G のノックダウンによりアセチル化ヒストンの結合量が有意に減少した (Figure 7)。すなわち、G の発現量の減少に伴い CYP3A4 遺伝子 2 kb 上流域のヒストンアセチル化状態が低下することが示唆された。

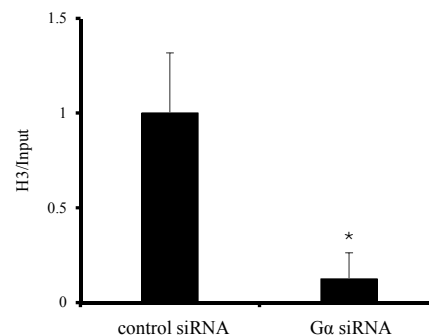


Figure 7 The effect of G knockdown on acetyl-histone H3 binding frequencies at the 2 kb upstream region from CYP3A4 gene. 5-aza-dC treated HepG2 cells were transfected with either control siRNA or G siRNA for 48 hr. After the treatment with siRNA as described in Method, formaldehyde cross-linked chromatin was incubated with an antibody for anti-acetyl-histone H3. Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR with primers specific the 2 kb upstream region from

CYP3A4 gene. Parallel PCR reaction were performed with input DNA. All mean \pm S.D. were calculated from triplicated a representative experiment and analyzed using student's t test *, $p < 0.05$: statistically different from cells treated with vehicle alone.

以上の研究結果より、CYP3A4 遺伝子の転写活性化には DMR の DNA 脱メチル化に伴う G の結合量増加とそれに付随したヒストンアセチル化の亢進が重要であることが明らかとなった。

DNA メチル化と CYP3A4 活性評価のバイオマーカー解析

ASGPR は肝細胞表面特異的に発現しており、血清タンパクの肝代謝に関与している。また、肝臓がんやその他の肝疾患においてその発現量が減少することから肝機能の指標として期待されている。この ASGPR のリガンドである asialofetuin をビオチン化し、磁気ビーズをつけた抗体で免疫沈降したものを磁気分離することにより肝由来細胞を採取することとした (Figure 8)。次にこの分離によって得られた細胞が、肝由来なものであるかを確認するために RNA 検出プローブを用いて肝特異的に発現している microRNA の蛍光を測定することにより肝由来細胞が分離できているかの確認を行った。

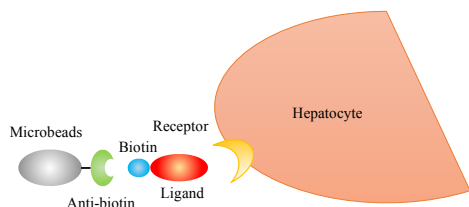


Figure 8 The strategy of separating hepatocytes from peripheral blood. Cells were incubated with biotinylated asialofetuin as a ligand of ASGPR. After washing with dilution buffer, cells were incubated with anti-biotin microbeads. Then cells were washed and resuspended in dilution buffer. Labeled cells were isolated by magnetic separation.

分離した細胞において肝特異的な microRNA を認め、血球に強く発現する microRNA が検出されなかったことから、肝特異的な細胞の分離に成功したことが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 家入 一郎, Pharmacogenomics 研究: 手法と進め方, 日本 TDM 学会・学術大会, 2016.05.29. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)

2. 小野 祐子, 廣田 豪, 家入 一郎, LC-MS/MS 法を用いたミダゾラム及びその代謝物の同時測定法の構築と活用, 第 32 回日本薬学会九州支部大会, 2015.12. 九州保健福祉大学 (宮崎県延岡市)

3. 家入 一郎, Value and limitations of cutting-edge science (e.g., gene therapy and pharmacogenomics) to patient care here and now, FIP's World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2015.09.30. Düsseldorf (Germany)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://doutai.phar.kyushu-u.ac.jp>

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・准教授
研究者番号: 80423573

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()