九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ヒト　CYP3A4　遺伝子発現の個人差要因の解明を目指したエピジェネティック制御機構に基づくゲノム構造解析

江口，駿介

https://hdl.handle.net/2324/1500657

出版情報：九州大学，2014，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

ヒト *CYP3A4* 遺伝子発現の個人差要因の解明を目指した エピジェネティック制御機構に基づくゲノム構造解析

薬物動態学分野　3PS12018M　江口　駿介

【序論】

ヒト肝臓において cytochrome P450 3A4（CYP3A4）は薬物代謝酵素の中で最も多くに存在する CYP 分子種であり、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。しかし、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。このため、CYP3A4 の個人差要因の解明により医薬品の適正使用に大きく貢献できることが期待される。CYP3A4 活性の個人差要因は 60~90%が遺伝的要因だと言われている。しかし、その一方で *CYP3A4* 遺伝子の遺伝子多型解析において、その多型の頻度は非常に低く大きな個人差を説明するに至っていない。

当研究室のこれまでの検討により、ヒト肝臓においてエピジェネティック制御機構である DNA メチル化やヒストンアセチル化が CYP3A4 発現の個人差に深く関与していることが示されている。CYP3A4 発現との関連が示唆された DNA メチル化領域（Differentially methylated region, DMR）は *CYP3A4* 遺伝子より 5 Mb 離れた CpG アイランドに位置しており、既知の *CYP3A4* 遺伝子発現制御メカニズムでは非常に遠位に存在する DMR 領域が CYP3A4 発現を制御する機構は説明できない。本研究では、エピジェネティック制御機構に基づくゲノム構造の変化に着目し、*CYP3A4* 遺伝子発現メカニズムの解明を行うことを目的とした。

【方法】

<u>HepG2 細胞における DNA メチル化・ヒストンアセチル化の *CYP3A4* 遺伝子発現への影響の検討</u>: ヒト肝がん由来細胞の HepG2 細胞を DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)、またはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である Trichostatin A（TSA）を用いて処理した。回収した細胞の mRNA の抽出及び逆転写をした後に、CYP3A4 および CYP3A4 発現に関与する転写因子 PXR, VDR, PRMT の mRNA 発現量を quantitative real-time PCR 法により測定した。

<u>CpG アイランドの CYP3A4 転写活性への影響評価</u>: CYP3A4 発現量との間に強い相関を認めた CpG アイランド（DMR 領域）とその前後の CpG 領域を含むベクターをそれぞれ作成し、転写活性への影響を評価した。各ルシフェラーゼベクターには、CpG アイランドとルシフェラーゼ遺伝子との間に CYP3A4 発現とヒストンアセチル化に相関のあった *CYP3A4* 転写開始点近傍約 2 kb の領域が含まれている。ヒストンアセチル化状態での影響を評価するため、細胞には予めアセチル化促進剤である TSA 処理を行った。

<u>DMR 領域に結合する転写因子の同定</u>: *In silico* により予測された転写因子 9 種について、siRNA を用いた knockdown assay を行った。実験には 5-aza-dC を予め処置した HepG2 細胞を用いることで DMR 領域を脱メチル化状態として、転写因子の knockdown の影響を検討した。CYP3A4 発現と関連の認められた転写因子 GRα について、抗 GRα 抗体を用いた ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) assay と EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) により結合を確認した。

<u>GRα がヒストンアセチル化状態に及ぼす影響の評価</u>: GRα が *CYP3A4* 遺伝子近傍のヒストンアセチル化に及ぼす影響を評価するために、抗ヒストン 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、GRα あるいはネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションしたものを用いた。

CYP3A4 遺伝子周辺領域の立体構造解析: DMR 領域と *CYP3A4* 遺伝子の空間的距離を明らかにするため、ヒト肝臓を対象に CYP3A4 mRNA 発現量が既知の検体について 3C (Chromosome Conformation Capture) assay を行った。

【結果】

HepG2 細胞における DNA メチル化・ヒストンアセチル化の *CYP3A4* 遺伝子発現への影響の検討: 5-aza-dC を用いた DNA 脱メチル化により、転写因子の発現上昇を伴わずに *CYP3A4* 遺伝子の発現増加が認められた。また、TSA 処理によるヒストンアセチル化の促進による *CYP3A4* 遺伝子の発現上昇は認められなかった。

CpG アイランドの CYP3A4 転写活性への影響評価: レポーターアッセイの結果、CYP3A4 発現量と相関を認めた CpG アイランドを含むベクターにおいてのみコントロールと比べて TSA 存在下で転写活性の有意な上昇を示し、約 34 倍の転写活性であった。前後の CpG 領域を含むベクターにおいては TSA による転写活性の有意な変化を認めなかった (**Figure 1**)。

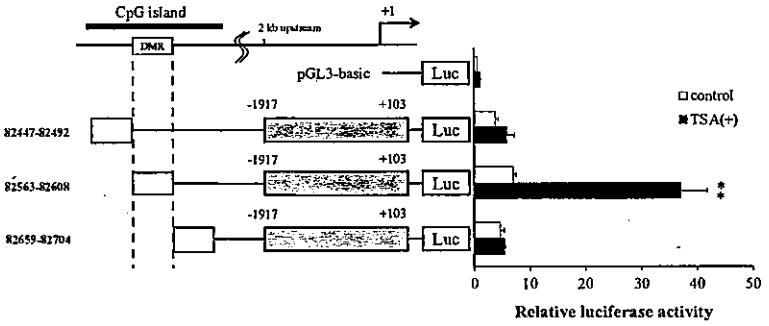

Figure 1. Identification of essential region for the transcriptional activation by HDAC (TSA) inhibitor

Data represents mean ± S.D. and luciferase values are normalized to pGL4.70 vector and the mean value obtained with the pGL3-Basic vector as 100%. **, $p < 0.01$: statistically analyzed using paired *t* test.

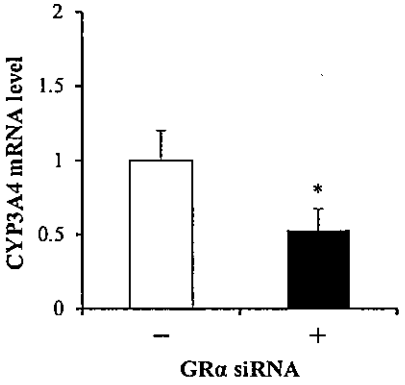

Figure 2. Effect of GRα knockdown on CYP3A4 mRNA expression in HepG2 cells

The data represent the mean ± S.D. of three independent experiments.*, $p < 0.05$: statistically different from negative control.

DMR 領域に結合する転写因子の同定: 転写因子予測ツールを用いて予測された 9 種の転写因子について、siRNA を用いた knockdown assay を行った。その結果、GRα の knockdown により CYP3A4 mRNA 発現の有意な減少が認

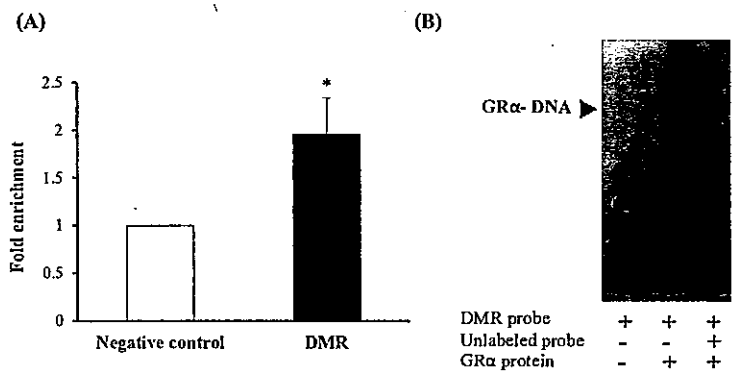

Figure 3. ChIP (A) and EMSA (B) for identification of DNA binding sites of GRα

(A) Effect of DNA demethylating agent on GRα binding frequencies at the DMR. All mean ± S.D. were calculated from triplicated a representative experiment and analyzed using paired t test .*, $p < 0.05$: statistically different from negative control. (B) Gel mobility shift assay using biotin-labeled probes including the predicted GRα motif sequence and GRα protein.

められた（**Figure 2**）。また、抗 GRα 抗体を用いた ChIP assay により DMR 領域への DNA メチル化依存的な結合が確認できた（**Figure 3-A**）。さらに、EMSA により DMR 領域中の予測配列に GRα が結合することが示唆された（**Figure 3-B**）。

<u>GRα がヒストンアセチル化状態に及ぼす影響の評価</u>: GRα の knockdown により解析対象領域である *CYP3A4* 遺伝子転写開始点及び 2 kb 上流域アセチル化ヒストン H3 の結合量が有意に減少した（**Figure 5**）。

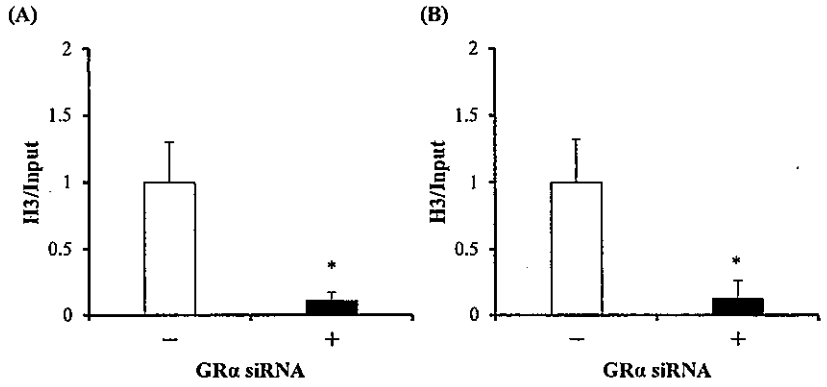

Figure 5. Effect of GRα knockdown on acetyl-histone H3 binding frequencies at the 2 kb upstream region from *CYP3A4* gene (A) and the TSS of *CYP3A4* gene (B)
All mean ± S.D. were calculated from triplicated a representative experiment and analyzed using paired t test *, $p < 0.05$: statistically different from cells treated with vehicle alone.

<u>*CYP3A4* 遺伝子周辺領域の立体構造解析</u>: DMR 領域より直線的に遠ざかるにつれ、結合頻度の減少が確認でき、約 60 kb 離れた領域ではそれが検出されなかった。一方、直線的には 5 Mb 離れた *CYP3A4* 遺伝子近傍ではどの領域においても interaction が検出できた。DMR 領域と *CYP3A4* 遺伝子とその 2 kb 上流域において近接効果を認め、CYP3A4 の発現量の高い肝臓検体では、発現量の低い検体と比べ有意に高い結合頻度を示した（**Figure 4**）。

【考察】

培養細胞におけるエピジェネティック制御機構の影響を評価した結果、5-aza-dC 濃度依存的な *CYP3A4* 遺伝子の発現増加が認められた。また、CYP3A4 発現に関連する転写因子である PXR, VDR, PRMT の発現誘導は認められなかった。このことから、DNA 脱メチル化による CYP3A4 発現上昇は、転写因子の誘導によるものではなく、*CYP3A4* 遺伝子自体の脱メチル化に起因することが示唆された。

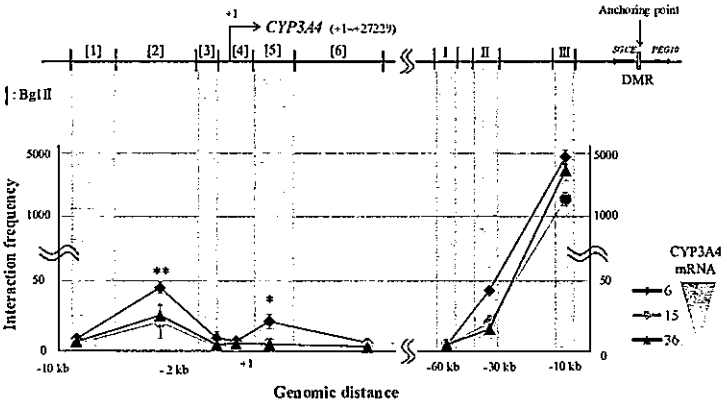

Figure 4. 3C assay of the human *CYP3A4* gene locus
Relative interaction frequencies between *PEG10/SGCE* anchor fragment and BglII fragments within the *CYP3A4* gene locus. Data represent the mean ± S.D. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$: statistically analyzed using Dunnett's test.

レポーターアッセイの結果より、DMR 領域を含んだレポーターベクターにおいて TSA 処理による有意な転写活性の上昇を示した。この結果は、これまでヒト肝臓において CYP3A4 発現量と相関を認めた CpG アイランドの重要性を示す結果と一致するものであった。

DMR 領域に作用する転写因子を解析したところ、siRNA を用いた knockdown assay により GRα の関与が示唆された。また GRα は DNA メチル化依存的に DMR 領域に結合していることが ChIP assay により明らかとなった。さらに DMR 領域中の GRα 結合予測配列への EMSA の結果から示唆されたことから、GRα が DMR 領域に結合し CYP3A4 発現に関与する転写因子であると考えられる。

GRα が *CYP3A4* 遺伝子近傍のヒストンアセチル化に及ぼす影響を評価した結果、GRα の knockdown により遺伝子上流のヒストンアセチル化状態の低下が確認できた。このことは GRα が DMR を介して、*CYP3A4* promoter と作用して近傍のヒストンアセチル化状態を亢進させることが考えられる。今後は GRα がリクルートする HAT（histone acetyltransferase）タンパク質の同定が GRα の機能を明らかにする上で重要であると考えられる。

3C assay により DMR 領域が立体的に *CYP3A4* 遺伝子に近傍し、相互作用を行っていることが示唆された。さらに CYP3A4 発現量の高い検体は発現量の低い検体に比べ有意に高い結合頻度を示したことから、CYP3A4 発現量の高い検体程、DMR 領域が *CYP3A4* 遺伝子に立体的に近づいていることが考えられる。また、ゲノムの高次構造形成に必要なタンパク質である cohesin タンパク質の結合が、enhancer である DMR 領域及び promoter である *CYP3A4* 遺伝子上流域で確認されたことから（data not shown）、ゲノムがループ状に束ねられ両領域が近接していることが考えられる。

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た。特に、*CYP3A4* 遺伝子から 5 Mb 離れた領域にある DMR 領域が *CYP3A4* 遺伝子に立体的に近接することで遺伝子発現を制御しているという全く新規のメカニズムが示された。GRα 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が考えられる。**Figure 6** に本研究で明らかとなった *CY3A4* 遺伝子発現メカニズムを示す。今後、本研究で焦点を当てた DNA メチル化やヒストンアセチル化といったエピジェネティック修飾が、ヒト肝における CYP3A4 機能予測のバイオマーカーとなることが考えられ、CYP3A4 基質薬物における薬物治療の個別適正化の一助となることが期待できる。

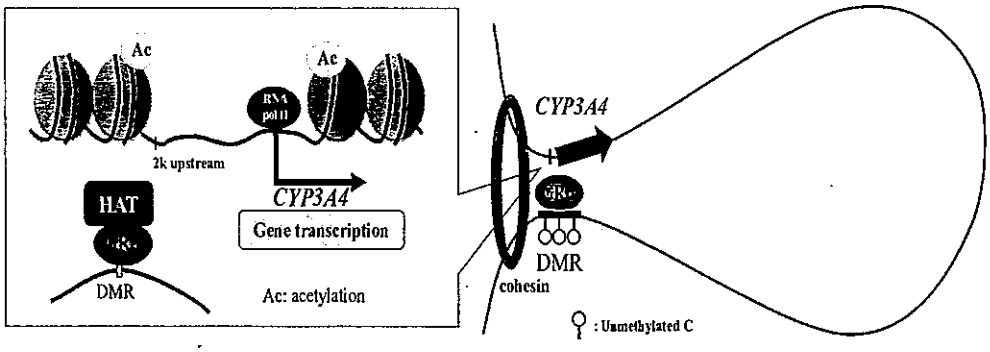

Figure 6. The *CYP3A4* locus in a hepatic tissue that highly expresses the gene

【引用文献】

Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol genet*, **13**(23):2959-69 (2004).