

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）



氏 名	江口 駿介
論 文 名	ヒト <i>CYP3A4</i> 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
論文調査委員	主 査 家入 一郎 教授 副 査 山田 英之 教授 副 査 大戸 茂弘 教授 副 査 石井 祐次 准教授

論文審査の結果の要旨

【背景】

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存在する CYP 分子種である。しかし、肝臓における代謝活性には数十倍の個人差が存在しており、その個人差要因については未だ不明な点が多い。

当該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て実施された。

【研究結果】

5-Aza-dC を用いた DNA 脱メチル化により、CYP3A4 mRNA 発現量の有意な上昇が認められた。また、CYP3A4 発現に関連する転写因子 PXR、VDR、PRMT の 5-aza-dC による各 mRNA の発現上昇は認められなかったことから、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、DMR 領域の脱メチル化に起因することが示唆された。

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アセチル化促進剤である TSA (Trichostatin A) 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。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。

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められた。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。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。

3C assay の結果、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 領域は *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。このことから、*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。

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。これは GRα が enhancer である DMR 領域を介して、*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。

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。

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。本研究成果は 博士 (創薬科学) の学位に値すると認める。