

DNAメチル化解析によるヒト肝における薬物動態関連 遺伝子発現の個人差要因の解明

田中, 駿大

<https://hdl.handle.net/2324/1806964>

出版情報：九州大学, 2016, 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（3）

DNA メチル化解析によるヒト肝における薬物動態関連遺伝子発現の個人差要因の解明

薬物動態学分野 3PS14010M 田中 駿大

【序論】

薬物の体内動態には、腸管や肝臓、腎臓などの様々な臓器に発現する代謝酵素やトランスポーターが関与しており、薬物動態関連遺伝子発現の個人差は、薬物の体内動態や応答性の個人差を生む要因の一つとされる。これまでに、医薬品の適正使用に向けた薬物動態関連遺伝子の個人差解明のために、一塩基多型 (SNPs) を中心とした多くの研究がなされてきた。しかし、同一遺伝子型内においても、個体間に無視のできない個人差が存在するなど、遺伝子型だけでは説明のできない個人差が多く存在し、薬物治療におけるバイオマーカーとしての利用を困難なものにしている。この問題を解決しない限り、薬物動態関連遺伝子機能を指標とした薬物の個別適正使用のための事前診断は実現不可能であるように思われる。

近年 SNPs に代わる新たなアプローチとして、DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を制御するエピジェネティクスが注目されている。中でもゲノム DNA のメチル化は最も研究が盛んに行われており、遺伝子転写開始点上流域に存在する CpG 配列の集まり (CpG island) のメチル化は、遺伝子の発現を抑制する。すでにかんなどの疾患においては、疾患特異的な異常 DNA メチル化をバイオマーカーとする研究が進められている。一方で、現状では正常組織における DNA メチル化の知見が少なく、薬物の個別適正使用に DNA メチル化を指標として用いるためには、正常組織における遺伝子発現の個人差に関連する情報の蓄積が必要である。以上の背景から、本研究では正常組織における遺伝子発現の個人差と DNA メチル化に焦点を当て、薬物動態関連遺伝子の個人差に寄与する DNA メチル化領域の同定を目的に検討を行った。

【方法】

ヒト正常肝臓組織を用いた DNA メチル化解析

1. 薬物動態関連遺伝子転写開始点上流 30 kbp の CpG island 探索

肝臓に発現しているトランスポーター10種、代謝酵素 CYP5種の計15種の遺伝子を解析対象とし、CpG island searcher [<http://cpgislands.usc.edu/>] を用いて CpG island の探索を行った。解析領域は各遺伝子の転写開始点上流・30 kbp までとした。

2. 薬物動態関連遺伝子の mRNA 発現量の測定

ヒト正常肝臓より total RNA を抽出し、転写開始点上流に CpG island が存在した遺伝子について mRNA 発現量を定量 real-time PCR 法で測定した。

3. 薬物動態関連遺伝子における CpG island のメチル化頻度と mRNA 発現量との相関解析

ヒト正常肝臓由来 genomic DNA より、メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質を用いてメチル化 DNA を濃縮した。各 CpG island に primer を設計し、定量 real-time PCR 法でメチル化頻度を測

定後、各遺伝子 mRNA 発現量との相関解析を行った。

SLC47A1 遺伝子発現における CpG island の機能評価

1. 培養細胞における DNA 脱メチル化剤の影響評価

4種の培養細胞を DNA 脱メチル化剤である 5-aza-dC を含む培地で 3日間培養した後、RT-PCR により MATE1 mRNA 発現量の測定を行った。

2. CpG island が遺伝子の転写活性に与える影響の評価

mRNA 発現量と相関を認めた CpG island が *SLC47A1* 遺伝子の転写活性に与える影響を評価するため、CpG islands の配列と *SLC47A1* 遺伝子のプロモーター領域を同時に組み込んだレポーターベクターを作製し、ヒト肝がん細胞 HepG2 細胞に transfect 後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

3. *SLC47A1* 遺伝子近傍領域におけるゲノム立体構造解析

CpG island と *SLC47A1* 遺伝子転写開始点との物理的近接の有無を明らかにするため、遺伝子の立体構造解析手法である 3C (chromosome conformation capture) assay により、*SLC47A1* 遺伝子周辺領域のゲノム構造解析を行った。結合頻度の測定には定量 real-time PCR 法を用いた。

4. CpG island 欠損細胞の作製と遺伝子発現の変動評価

SLC47A1 遺伝子発現に対する CpG island の寄与を評価するため、CRISPR/Cas9 system を用いて CpG island を欠損したヒト肝がん由来細胞 HepG2 を作成し、欠損細胞における MATE1 mRNA 発現量を定量 real-time PCR 法により測定した。

【結果】

ヒト正常肝臓組織を用いた DNA メチル化解析

CpG island の探索を行った 15種の遺伝子のうち、10種の遺伝子に CpG island が存在した。これら 10種の遺伝子について mRNA 発現量を測定したところ、*SLC47A1* / MATE1 で 22.8 倍、*CYP1A2* / CYP1A2 は 194.3 倍など肝臓検体間に個人差が存在した。各 CpG island のメチル化頻度を測定し、mRNA 発現量との相関解析を行った結果、*ABCB1* / MDR1、*ABCC3* / MRP3、*SLC47A1* / MATE1 の3種の遺伝子において、mRNA 発現量とメチル化頻度が負の相関を示す CpG island が明らかとなった (Fig. 1)。これら3種のうち、MATE1 mRNA の発現量の個人差に最もばらつきがあったため、*SLC47A1* / MATE1 に焦点を当て、CpG island の機能評価を行うこととした。

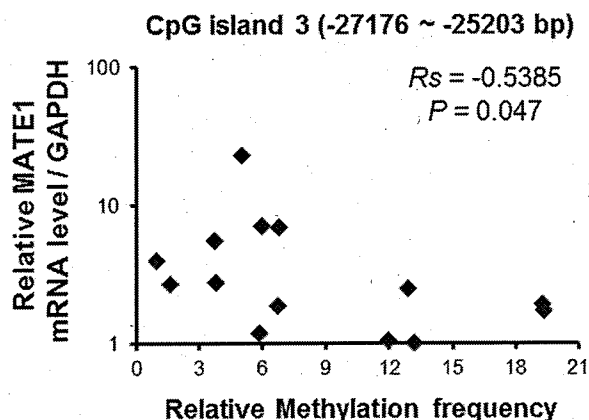


Fig. 1 Correlation analysis between mRNA levels and methylation frequencies of the CpG island in Caucasian liver samples.

The methylation levels of CpG islands that are located within the 30 kbp upstream of the TSS were detected by affinity-based methylation analysis. mRNA levels of MATE1 was negatively correlated with the methylation levels of CpG island. R_s : Spearman's rank-order correlation analysis.

SLC47A1 遺伝子発現における CpG island の機能評価

DNA メチル化が *SLC47A1* 遺伝子発現に関与するかどうかを明らかにするため、4 種の培養細胞を DNA 脱メチル化剤で処理し、MATE1 mRNA 発現量を測定した結果、2 種の細胞において DNA 脱メチル化剤により MATE1 mRNA 発現量の上昇が認められた (Fig. 2)。

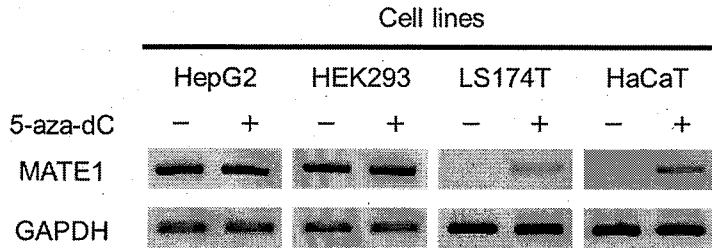


Fig. 2 The effect of 5-aza-dC on MATE1 mRNA expression in four cell lines.

All cell lines were treated with 5-aza-dC for 72 hr before harvest. MATE1 mRNA expression was determined using RT-PCR.

一般的に遺伝子の転写に機能する領域は、遺伝子の転写開始点近傍領域に存在するが、負の相関を示した 2 か所の CpG island は *SLC47A1* 遺伝子転写開始点からそれぞれ約 27 kbp と約 5 kbp 離れた領域に存在していた。そこで、これらの CpG island が *SLC47A1* 遺伝子発現のエンハンサーとして機能することを仮定した。*SLC47A1* 遺伝子転写開始点近傍領域と CpG island を同時に組み込んだレポーターベクターを作成し、luciferase reporter assay を行った結果、約 27 kbp 上流に存在する CpG island 内の領域 (-25670 ~ -25246 bp) が転写活性上昇に重要な役割を持つことが示唆された (Fig. 3)。

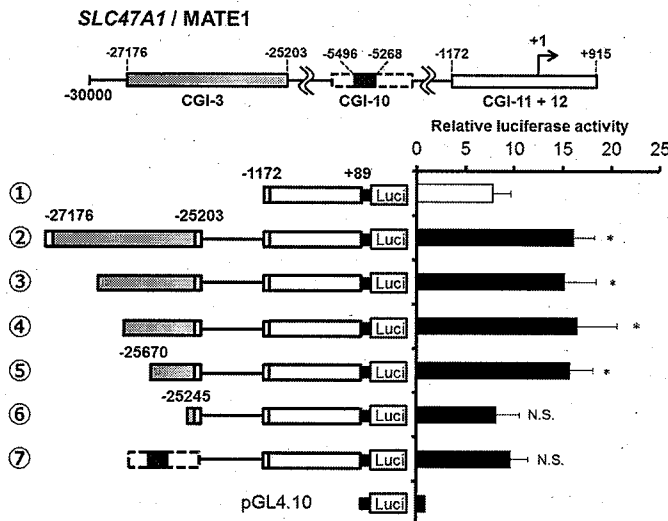


Fig. 3 Luciferase activities in *SLC47A1*-CpG islands.

Luciferase (Luci) reporter gene constructs were transiently transfected into HepG2 cells. Luciferase values are normalized to pGL4.70 vector and mean value obtained with the pGL4.10 vector as 100%. Data represents mean \pm S.D. and analyzed using Dunnett's test. *, $p < 0.05$: statistically different from the control vector containing only *SLC47A1* gene promoter region. N.S., Not statistically significant.

SLC47A1 遺伝子転写開始点の約 27 kbp 離れた CpC island が、*SLC47A1* 遺伝子発現の制御するメカニズムとして、*SLC47A1* 遺伝子と CpG island が物理的に近接している DNA ループ構造を仮定した。そこで、CpG island と *SLC47A1* 遺伝子転写開始点との物理的近接の有無を明らかにするため、遺伝子の立体構造解析手法である 3C assay により、*SLC47A1* 遺伝子周辺領域のゲノム構造解析を行った。*SLC47A1* 遺伝子転写開始点近傍領域において高い結合頻度が認められたことから、DNA のループ構造により、約 27 kbp 上流の CpG island と *SLC47A1* 遺伝子転写開始点近傍領域が物理的に近接していることが示唆された (Fig. 4)。

SLC47A1 遺伝子発現に対する CpG island の寄与を評価するため、CRISPR/Cas9 system を用いて CpG island を欠損したヒト肝がん由来細胞 HepG2 を作成した。欠損細胞における MATE1 mRNA 発現量を測定した結果、MATE1 mRNA 発現量の約 40% の減少を認めた。

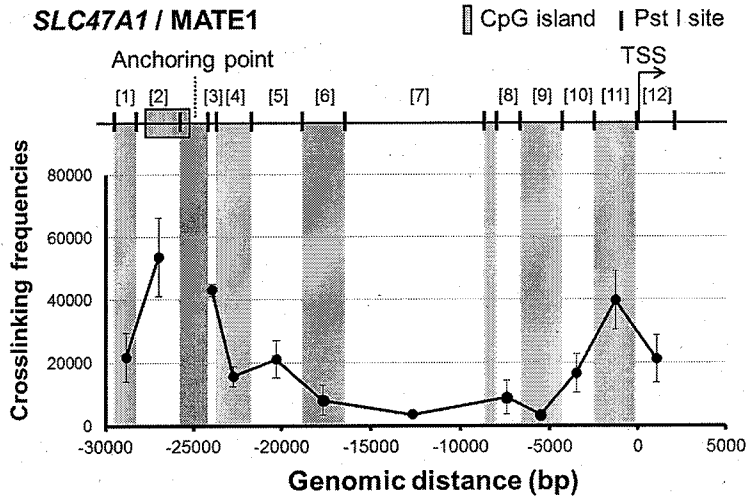


Fig. 4 3C assay of the *SLC47A1* gene locus.

The Black vertical lines show positions of *Pst I* restriction sites and grey box show CpG island. Constant primer and TaqMan probe were designed in the *Pst I* fragment containing the CpG island (anchoring point), and crosslinking frequencies between anchor fragment and *Pst I* fragment in *SLC47A1* gene promoter were analyzed by TaqMan real-time PCR. All mean \pm S.D. were calculated from triplicated a representative experiment.

【考察】

ヒト正常肝臓組織を用いた DNA メチル化解析により、*ABCB1* / MDR1、*ABCC3* / MRP3、*SLC47A1* / MATE1 の3種の遺伝子において、mRNA 発現量とメチル化頻度が負の相関を示す CpG island の存在が明らかとなった。この結果より、遺伝子転写開始点上流域に存在する CpG island の DNA メチル化が正常組織における遺伝子発現の個人差に寄与する可能性が示唆された。特に、*ABCC3* / MRP3、*SLC47A1* / MATE1 について DNA メチル化に発現制御されていることを示した報告はこれまでになく、ヒト肝臓において DNA メチル化がこれらの遺伝子の発現に関与することを示唆する結果が初めて得られた。

SLC47A1 遺伝子においては、約 27 kbp 上流に位置する CpG island の下流域と *SLC47A1* 遺伝子領域が DNA のループ構造により相互作用することで遺伝子発現が亢進するメカニズムが示された (Fig. 5)。近年、CpG island よりも CpG 配列が低密度に存在する、CpG island shore と呼ばれる領域の重要性が示唆されている^{1,2)}。本検討で重要であることが示唆された領域は、約 27 kbp 上流に位置する CpG island の中でも CpG 配列の密度の低い領域であったことから、この領域が CpG island shore に該当し、MATE1 mRNA 発現の個人差に寄与する DNA メチル化領域である可能性が考えられる。

今後は、本研究によって明らかとなった CpG island の DNA メチル化を介した *SLC47A1* 遺伝子の発現制御機構に基づく MATE1 機能予測のためのバイオマーカーの確立に向けて、ヒトを対象とした臨床試験を行い、ヒト肝における *SLC47A1* 遺伝子の DNA メチル化頻度と MATE1 の基質薬物の体内動態との関連について明らかにする必要がある。

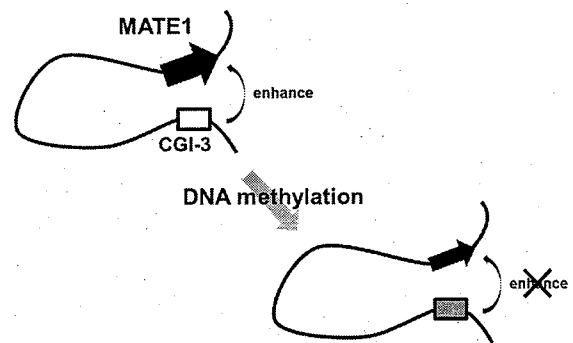


Fig. 5 Three-dimensional conformation at the *SLC47A1* gene locus.

【引用文献】

- 1) Doi, A. et al. *Nat Genet.*, 41(12):1350-3 (2009)
- 2) Ji, H. et al. *Nature*, 467(7313): 338-42 (2010)