

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）



氏 名	田中 駿大
論 文 名	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
論文調査委員	主 査 九州大学大学院 薬学府 教授 家入 一郎 副 査 九州大学大学院 薬学府 教授 大戸 茂弘 副 査 九州大学大学院 薬学府 教授 小柳 悟 副 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 廣田 豪

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

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、これらの薬物動態関連遺伝子の発現量・活性は薬効・副作用に大きく影響する。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、薬物治療におけるバイオマーカーとして利用するためのエビデンスが不足している。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困難であるように思われる。

近年、遺伝子発現を制御するメカニズムとして DNA メチル化が注目されている。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。すでにがんなどの疾患において、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。

ヒト正常肝臓組織を用いた DNA メチル化解析

ヒト肝臓に発現する薬物トランスポーター10 種、代謝酵素 CYP 5 種を対象に、遺伝子転写開始点・30 kbp までの CpG island を探索した結果、10 種の遺伝子で CpG island の存在が確認された。10 種の遺伝子について、ヒト正常肝臓組織における mRNA 発現量と各 CpG island のメチル化頻度を測定し、相関解析を行った。その結果、*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。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 の機能評価を行った。

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。

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 内の一部領域が転写活性上昇に重要な役割を持つことが示唆された。

転写開始点から遠く離れた CpG island が遺伝子発現のエンハンサーとして機能するメカニズムを明らかにするため、chromosome conformation capture (3C) assay による *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。

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。

正常組織における個人差と DNA メチル化に着目した本研究により、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。また *SLC47A1* 遺伝子においては、CpG island 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。DNA メチル化は、ガンや精神疾患などの疾患を対象とした報告がほとんどであり、正常組織における DNA メチル化の役割は明確ではない。本研究が明らかにした知見は、DNA メチル化を遺伝子機能予測の指標として利用できる可能性を示している。この成果は、個別化医療の実現に向けた研究の進展に寄与するものであり、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。