

資料 3

総括研究報告書

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

主任研究者：千葉 寛

千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究要旨

本研究の目的は日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者 DNA 試料を用いることにより、薬効や副作用発現に関わる遺伝子多型の人種差に関わる要因について明らかにしていくことである。平成19年度の研究成果は1) ワルファリンの光学異性体の非結合型代謝クリアランスは CYP2C9 の遺伝子多型の有無にかかわらず、白人種、日本人いずれの人種においても有意な相関を示すこと、2) 日本人で比較的頻度の高い遺伝子変異である UGT1A9*22 が UGT1A9mRNA の発現量を増加させる傾向があること、3) *SLCO1B1**15 が塩酸イリノテカンによる重篤な血液障害の原因となる可能性を明らかにしたこと、4) CYP1A2 の遺伝子発現に epigenetics(メチル化)が関わっている可能性を明らかにしたことである。

分担研究者

越前宏俊

明治薬科大学教授

鹿庭なほ子

国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

家入一郎

九州大学大学院薬学研究院准教授

ど、多方面からの解析を加えることにより、薬物動態ばかりでなく、薬効及び副作用発現の人種差に関わる要因を明らかにすることを目的に検討を行っている。

具体的には、ワーファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロン酸転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーターの解析を家入が、CYP3A4等のCYPを中心とした薬物動態関連遺伝子を千葉が担当し、副作用及び薬効に人種差が生じる原因と遺伝子多型との関係について検討を行っている。

A. 研究目的

国外で得られた臨床試験の結果を国内で使用するためには医薬品の効果と安全性の人種による差異を考慮しなければならない。

本研究班では、日本人、黒人、白人種のゲノム試料に加え日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者DNA試料の検討な

B. 研究方法

ワルファリンの薬効発現関連遺伝子については、これまでの研究でCYP2C9の遺伝子型とワルファリン異性体の経口遊離形クリアランスが測定されている白人および日本人患者検体を用いて、CYP2C9、PGC1 α 、HNF4 α の遺伝多型との関係を検索した。また、ワルファリン異性体の7

位および6位の水酸化体への部分代謝クリアランスが測定された患者データについてはS体ワルファリンの7位水酸化反応とR体ワルファリンの6位水酸化反応の部分代謝クリアランスの相関についても検討した。更にワルファリン服用中にリファンピシンを投与された2名の患者についてはワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスの相関についても検討した。

グルクロン酸転位酵素については、ヒト肝組織を用いて、プロモーター領域や3' UTR領域の変異がUGT活性の人種差に及ぼす影響について検討を行った。

トランスポーターについては、塩酸イリノテカンを服用中に重篤な血液障害を認めた患者の*SLCO1B1*遺伝子および*UGT1A1*遺伝子多型の解析を実施し、副作用との関連について検討を行った。

CYPについては、白人種及び日本人肝検体を用いてCYP1A2活性に人種差が存在するか否かの検討とCYP1A2の遺伝子発現にepigeneticsが関わっているか否かの検討を行った。

C. 研究結果

1) ワルファリンの薬効発現関連遺伝子

白人集団においてはワルファリン異性体の個人間変動とPGC1 α およびHNF4 α の遺伝子多型との間には有意な相関は見いだせなかった。一方、日本人集団において、S体ワルファリンの7位水酸化反応とR体ワルファリンの6位水酸化反応の部分代謝クリアランスには高度の相関が見出された。さらに、日本人および白人から得られたデータをプールした集団でもワルファリン光学異性体の遊離形経口クリアランスはCYP2C9の野生型、CYP2C9*2または*3のヘテロ接合体、これらの変異アレルのホモ接合体、いずれの群においても有意かつ高度な相関が認められた。さらに、2患者でリファンピシン投与に伴いワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスは著明に増加したが、S体ワルファリンおよびR体ワルファリンの7位と6位の水酸化代謝体への部分

代謝クリアランスの有意な相関は誘導後も維持されていた。

2) UGT

UGT1A1については、*28のヘテロ接合体が3検体あり、これらのmRNAの発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値の約1/4であった。一方、*6を有する検体は8検体あり、これらの発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値と大きな差は認められなかった。*60を有する検体は3検体あったが、その内の1検体は3' UTRに*IBを有する*60-*IBのホモ接合体であった。この検体のmRNA相対レベルは、*1/*1に比較して低いことはなかった。

UGT1A9のプロモーター領域の対立遺伝子では、T9よりもT10を多く保有する場合に発現量が増える傾向が認められたが、2群間の差の検定及び傾向検定において有意差は検出されなかった。

3) トランスポーター

対象患者は鳥取大学医学部附属病院内科に入院中の肺癌患者で、治療のために塩酸イリノテカンを投与中、重篤な血液障害を認めた61歳の男性患者で、*SLCO1B1*遺伝子多型の関与を検討したところ、症例患者の遺伝子型は*SLCO1B1**15変異のホモ接合体であった。一方、同院入院加療中で、同様な抗がん剤の投与を受け、重篤な副作用を見ることの無かった患者10名について*SLCO1B1*遺伝子多型を調べたところ、5名が*15のヘテロ型接合体であった。

4) CYP

日本人非喫煙者肝ミクロソームにおけるEROD活性は白人種よりも1.7倍高い値を示したが、これらの中に有意な差は認められなかった。一方、HepG2細胞におけるCYP1A2 mRNA発現量はCpG配列メチル化阻害剤である5'-aza-dC処理により大きく上昇した。また、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて転写開始点近くのGC-boxの機能解析をおこなったところ、GC-boxを含むCYP1A2プロモーターは高い転写活性化能を示した。このGC-box

には Sp1 および Sp3 結合が認められ、CYP1A2 が発現しているヒト細胞ではこの部位が 80% 非メチル化状態であったのに対し、発現していない HeLa 細胞では完全にメチル化されていた。さらに、*in vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させた。

D. 考察

1) ワルファリンの薬効発現関連遺伝子

今年度の検討によりワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝に関係する CYP2C9 と CYP1A2 の代謝活性の個人間変動は CYP2C9 の構造領域の多型によらず相関していることが判明した。この結果は、両分子種の活性調節機構に共通の因子が関与していることを示唆していると考えられる。

両分子種の発現調節にはいくつかの共通の核内受容体分子およびその coactivator が関係している。今年度の検討では、PGC1 α と HNF4 α を候補として検討したが、有意な相関は見いだせなかった。今後より広範な検討を加える必要があると考えられた。

2) UGT

*UGT1A1*28* では転写活性が低下し、*6 では発現したタンパクの酵素活性が低下することが広く知られている。今回の日本人の肝組織を用いた mRNA の発現量に関する結果は、ばらつきが大きいものの、*28 保有群では発現量が低下する傾向にあり、一方、*6 保有群では発現量は *1/*1 と同程度にあり、これまで得られている知見と矛盾するものではなかった。一方、筆者らは、*60 と *IB が同一染色体上に存在する場合には、ビリルビンのグルクロン酸抱合が相加的に低下することを報告している。今回のサンプルの中に、*60-*IB をホモ接合体で有する検体が 1 例あったが、その UGT1A1 の mRNA 発現レベルは低くなかったことから、*60-*IB の活性の低下の原因が転写活性の低下である可能性は示すことはできなかった。

UGT1A9 については、プロモーター領域の T の繰り返し数が多い変異(*22)では、*in vitro* の転写活性が野生型に比較し約 2.6 倍高くなることが報告されているが、mRNA 発現レベルや酵素活性は両者で差がないという報告がある。一方、基質に mycophenolic acid 及び propofol を用いた場合には、*22 のグルクロン酸抱合能が有意に上昇するという報告もある。今回のサンプルでは、ばらつきが大きく有意差は検出されなかったが、mRNA 発現量は、T9 に比較し T10 で上昇する傾向が認められ、基質によってはグルクロン酸抱合能が上昇するという報告との関連が示唆された。

3) トランスポーター

*SLCO1B1*15* は、日本人では、約 16% の頻度で見られる変異であるが、ホモ接合体は 0.8% 前後と少ない。*15 変異の機能への影響は、主にスタチンでよく研究されており、輸送能が極めて低下する。症例患者では血中濃度の上昇が見られたが、肝取り込み能が低下する結果、中心静脈への移行量が増加し、血中濃度が上昇したものと推定される。*15 変異のヘテロ接合体では、血中濃度上昇は見られないことから、特にホモ接合体に注意が必要と考えられる。

4) CYP

本研究において HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は CpG 配列メチル化阻害剤である 5'-aza-dC 処理により大きく上昇したことから、CpG 配列のメチル化は CYP1A2 遺伝子発現に重要な役割を担っていると考えられた。

これまでに 5'-aza-dC 処理により発現量の上昇が認められる遺伝子の多くは CpG アイランドの脱メチル化が関与すると考えられている。しかしながら、CYP1A2 遺伝子の近傍には CpG アイランドが存在しない。したがって散在する CpG 配列のいずれかが CYP1A2 遺伝子発現に関与すると考えられる。これら散在する CpG 配列のうちの一つは転写開始点近傍にある GC-box 内に存在している。GC-box は Sp family member の認識配列であり、本研究の結

果においても、GC-box に変異を導入した場合 CYP1A2 のプロモーター活性は大きく減弱すること、CYP1A2 遺伝子の GC-box に Sp1 および Sp3 結合が認められたことから、CYP1A2 遺伝子の GC-box は CYP1A2 遺伝子の転写に大きく寄与していると考えられた。

さらに、ヒト肝組織及び HepG2 細胞では CYP1A2 の GC-box 内の CpG 配列は非メチル化されていたのに対し、HeLa 細胞では CYP1A2 の GC-box はメチル化されていた。このことは、ヒト肝細胞で CYP1A2 が発現しているのに対し、HeLa 細胞では発現していないことと良く一致する。また、*In vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果からも、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることが示されており、以上の結果を考え合わせると、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化は重要な役割を担っていると考えられた。

E. 結論

1) ワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝クリアランスの個人間変動は CYP2C9 の多型によらず有意な相関を示すことから、これらの代謝に関わる CYP 分子種(CYP2C9 と CYP1A2 の活性調節機構に共通の因子が関与していることが示唆された。

今年度、共通因子の候補として PGC1 α と HNF4 α を検討したが、有意な相関は得られなかった。今後より広範な検討を加える必要があると考えられた。

2) UGT1A9 の転写調節領域における T の繰り返し数の違いによる多型 *22 は、統計的には有意ではなかったが、mRNA の発現量に影響を及ぼす傾向が示唆された。この遺伝子多型がグルクロン酸抱合能の人種差に及ぼす影響については、Genotype の違いによる酵素活性の差の程度と人種間における頻度の差を考慮して、今後さらに検討する必要がある。

3) *SLCO1B1**15 変異のホモ接合型がイリノテカンと SN-38 の体内動態に大きく影響し、肝取り込みが低下することにより生じる体内蓄積が重篤な副作用の原因となることを示唆した初めての症例報告である。日本人の場合、ホモ型の頻度は 0.8% と低い。適正使用のためには、事前の診断が望まれる。

4) 本研究では非喫煙者における日本人種と白人種肝ミクロソームにおける CYP1A2 活性には有意な人種差は認められなかった。今後、測定法や比較する肝臓の入手法をそろえた条件で比較する必要があるものと考えられた。しかし、同時に本研究の結果より CYP1A2 遺伝子転写開始点近傍に存在する GC-box は CYP1A2 遺伝子のプロモーター機能に重要な役割を担うことが明らかとなり、さらに GC-box 内に存在する CpG 配列のメチル化はその GC-box の機能を調節することにより CYP1A2 遺伝子発現を調節する可能性が強く示唆された。今後このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差とどのように関連するか検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

Takane H, Miyata M, Burioka N, Kurai J, Fukuoka Y, Suyama H, Shigeoka Y, Otsubo K, Ieiri I, Shimizu E. Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the *SLCO1B1**15 allele. *Ther Drug Monit.* 2007;29:666-8.

鹿庭なほ子、佐井君江. SNP とテーラーメイド医療. *腫瘍内科*, 1(5), 513-519, 2007.

学会発表

宮嶋篤志、太田雪、降幡知巳、千葉 寛：エピ
ジェネティクス研究を促進させる新規
CpG-free lusiferase reporter. 日本薬学会第
128年会、平成20年3月26-28日、横浜

宮嶋篤志、松本早矢香、降幡知巳、千葉 寛：
GC boxメチル化によるCYP1A2発現制御。
日本薬学会第128年会、平成20年3月26-28
日、横浜

Miyajima A, Ohta Y, Matsumoto S, Furihata

T, Chiba K. Epigenetic regulation of *CYP1A2*
gene expression by GC box methylation.
ISSX 2nd Asia Pacific Regional Meeting,
Shanghai, China, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 健康危険情報

なし

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究
分担研究者 越前 宏俊 明治薬科大学 教授

研究要旨

医薬品の効果と副作用には遺伝的素因が深く関係している。そのため、複数の異なる人種間から得られた新規医薬品データを相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。今年度、分担研究者はワルファリンの光学異性体の代謝が異なる CYP 分子種に代謝されるにも関わらず、S 体-ワルファリンの遊離形経ロクリアランス(CYP2C9 活性の指標)と R 体-ワルファリンの遊離形経ロクリアランス(主として CYP1A2 の活性を表す)の間には、日本人および白人集団から得られた CYP2C9 野生型遺伝子保有者、CYP2C9*2 又は*3 のヘテロ接合者、さらに両変異アレルのホモ接合者の 3 群内でそれぞれ有意な相関が認められる事を観察した。さらに、ワルファリン服用中に治療目的でリファンピシンの併用を受けた 2 名の日本人患者では CYP 活性誘導の経過を通じて R および S 体ワルファリンの経ロクリアランスおよび部位特異的な部分代謝クリアランスにおいてもよい相関関係が存在することを観察した。両分子種の発現調節機構には何れも HNF4 α と PGC1 α などの協調的な作用が必要であるとされるので、上記の結果は、CYP2C9 活性の個人間変動には CYP2C9 の構造領域の多型のみならず、これらの発現調節因子に作用する環境因子の暴露量の差異あるいは発現調節因子の遺伝多型が関係している可能性が示唆された。

A. 研究目的

新規医薬品データを人種間で相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。特に、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報は近年長足の進歩を遂げている。諸外国における研究で得られた新規医薬品に関わる薬物動態および感受性のデータを我が国での臨床試験にブリッジングするためには、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報が重要である。なかでもチトクローム P450(CYP)は多くの薬物の体内動態の個人差に関連するため、酵素の活性を左右する遺伝子多型の情報が有益となる。分担者は、本事業において、ワルファリンをモデル薬物としてこの薬物の応答性の個人差に関連する動態因子として肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C9 の遺伝子多型と応答性の個人差に関わる分子機構を検討した。

CYP2C9 活性の個人間変動に構造領域の多型が関係するが、野生型 CYP2C9 アレルを有する患者においても大きな個人差が認められることから、我々を含めて複数のグループが CYP2C9 遺伝子の発現調節に関係する上流域の遺伝多型の検討を行ったが未だに CYP2C9

活性の個人間変動を説明するユニークな多型を同定するに至っていない。

そこで、平成19年度の検討においては、ワルファリンの光学異性体選択的な代謝に関係する CYP2C9(S 体-ワルファリン)と CYP1A2(R 体-ワルファリン)の発現調節機構に共通の核内因子およびその coactivator が関与するとの知見をもとに両分子種の活性の個人差を安静時およびリファンピシン誘導時において比較することにより、構造領域の多型とは独立した発現調節機構の関与を検討した。

B. 研究方法

ワルファリン光学異性体の遊離形経ロクリアランスの相関については、これまでの研究で CYP2C9 の遺伝子型が判明している白人および日本人患者でワルファリン異性体の遊離形血中濃度から経ロ遊離形クリアランスが測定された 93 名の白人と 79 名の日本人データで検討した。白人サンプルに付いては CYP2C9 の遺伝子型だけでなく PGC1 α (peroxisomal proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α)については 21 種類、HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)については 11 種類の既知の遺伝多型も検索した。また、ワルファリン異性体の 7 位および 6 位の水酸化体への部分代謝クリアランスが測定された 74 名の日本人患者データにより S 体ワルファリンの 7 位水酸化反応の部分代謝クリアランス (CYP2C9 活性

の指標)とR体ワルファリンの6位水酸化反応の部分代謝クリアランス(CYP1A2活性に指標)の相関を検討した。更にワルファリン服用中にリファンピシンを投与された2名の日本人患者でワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスの相関を検討した。研究計画は施設内倫理委員会の審査を受け、患者からは文書同意を取得した。

C. 研究結果

日本人および白人から得られたデータをプールした集団を対象として、ワルファリン光学異性体の遊離形経口クリアランス間の相関を野生型、CYP2C9*2または*3のヘテロ接合者、これらの変異アレルのホモ接合者別に検討すると、いずれの群においても有意かつ高度な相関が認められた。白人集団においてはワルファリン異性体の個人間変動に対する21種のPGC1 α (peroxisomal proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α)多型、および11種類のHNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)多型の関与を予備的に検討したが、CYP2C9活性の個人差に有意な影響を持つものは見いだせなかった。

また、CYP2C9とCYP1A2の活性を部位特異的な水酸化経路に関係する部分代謝クリアランスで評価することが出来た日本人集団から得られたデータで検討すると、やはり両分子種の活性には高度の相関が存在した。

さらに、ワルファリン服用中に結核感染の疑いでリファンピシンを投与された2患者ではリファンピシン投与に伴いワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスは著明に増加したが、酵素活性誘導とその消失過程を通じてS体ワルファリンおよびR体ワルファリンについて7位と6位の水酸化代謝体への部分代謝クリアランスには有意な相関が観察された。

D. 考察

従来から、CYP2C9活性の個人差は構造領域および発現調節に関係する5'上流領域の多型あるいはハプロタイプでは説明できないことが判明していた。今年度の検討では、予備的ではあるがワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝に関係するCYP2C9とCYP1A2の代謝活性の個人間変動はCYP2C9の構造領域の多型によらず相関していることが判明した。この結果は、両分子種の活性調節機構に共通の因子が関与していることを示唆していると考えられる。

両分子種の発現調節にはいくつかの共通の

核内受容体分子およびそのcoactivatorが関係していることが近年のin vitro実験の結果から示唆されている。今年度の検討では、特にPGC1 α (peroxisomal proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α)とHNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)をそのような候補として検討した。その結果、今年度検討した範囲ではCYP2C9活性の個人差に関係する変異は見いだせなかったが今後もより広範な検討を加える必要があると考えられた。また、これらの因子に影響する環境因子についても今後の検討が必要であると考えた。

F. 健康被害状況

解析対象となる血液試料の収集は初年度で終了しており、以後に倫理上および健康上の被害はありませんでした。

G. 研究発表

- 1.論文発表： ありません
- 2.学会発表： ありません

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の成果についてはありません。

分担研究報告書

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

分担研究者 鹿庭 なほ子 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

研究要旨

UGT1A1、UGT1A9 及び UGT2B7 について、プロモーター領域や 3'UTR 領域の変異が UGT 活性の人種差に及ぼす影響について検討する目的で、ヒト肝組織を用いて上記領域における遺伝子多型と UGT の mRNA の発現量との関連を検討した。ヒューマンサイエンス振興財団より入手したヒト肝組織 30 検体を用いて、UGT1A1、UGT1A9 及び UGT2B7 の mRNA の発現量を測定した。今回のサンプルにより、UGT1A1 については、*28 及び *6 を保有する検体が 3 検体以上得られ、*1/*1 に比較し、*28 では発現量が低下する傾向にあり、*6 では変化しないことが確かめられたが、*60-*IB* の活性が低下する原因を説明することはできなかった。UGT1A9 については、プロモーター領域の変異 *22 のアレル頻度は 72% で、*1 に比較し *22 で発現量が有意ではないが増加する傾向が観察された。UGT2B7 については、ばらつきが大きかったが、特にプロモーター領域の変異の影響は認められなかった。

協力研究者

頭金 正博 国立衛研医薬安全科学部室長
黒瀬 光一 同主任研究官
佐伯 真弓 同流動研究員
宮島 敦子 国立衛研薬理部主任研究官

性の人種差に及ぼす影響について検討する目的で、ヒューマンサイエンス振興財団より入手したヒト肝組織を用いて、上記領域における遺伝子多型と UGT の mRNA の発現量との関連を検討した。

B. 研究方法

A. 研究目的

医薬品の体内動態には人種差が存在することが知られており、医薬品開発のグローバル化が急速に進んでいる現在にあっても、新医薬品の承認審査において、国外で得られた臨床試験結果を、そのまま日本人における医薬品の有効性と安全性の根拠とすることはできない。そのため、ICH では、ある人種で得られた結果を他の人種に外挿するためのブリッジング研究を義務づけている。薬物の体内動態の人種差の要因のひとつに、代謝酵素やトランスポーターをコードする遺伝子における多型の種類と頻度の人種差が上げられる。

筆者らは、グルクロン酸抱合に係わる UGT1A1 の遺伝子多型の人種差について検討し、日本人においては、グルクロン酸抱合が低下する多型として、UGT1A1*28 の他に UGT1A1*6 についても考慮しなければならないこと、UGT1A4 の遺伝子多型の種類と頻度の人種差、UGT1A1 の遺伝子多型と血中総ビリルビン濃度との関連等を明らかにしてきた。今年度は、プロモーター領域や 3' UTR 領域の変異が UGT 活

1. 方法

手術で切除されたヒト肝組織 30 検体は、ヒューマンサイエンス振興財団より入手した。

遺伝子のタイピングは、肝組織より抽出した DNA を用いて、UGT1A1 については -3279T>G、-3156G>A、-40_-39insTA 及び 211G>A を、UGT1A 分子種の共通 3'-UTR については 1813C>T、1941C>G 及び 2042C>G を、UGT1A9 については -126_-118T9>T10 (*22) を、また、UGT2B7 については -327G>A、-161C>T 及び -125T>C を、シーケンス法により行った。

mRNA の発現量解析では、Exp 1 においては、16 検体の肝組織を用いて RNAqueous samll scale phenol-free total RNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX) を使用して、また、Exp 2 においては、14 検体の肝組織を用いて mirVana miRNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX) を使用して Total RNA 画分を調製した後、UGT1A1、UGT1A9 及び UGT2B7 の mRNA 発現量を、GAPDH の発現量をコントロールとして、リア

ルタイム RT-PCR 法で測定した。

2. ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針との関係

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて、国立衛研の倫理委員会より承認を得て実施した。ヒト肝組織は、提供元であるヒューマンサイエンス振興財団において連結不可能匿名化された試料であり、個人情報本研究から遺漏する恐れはなかった。

C. 研究結果及び考察

1. 遺伝子多型頻度

肝組織 30 検体における *UGT2B7* の互いに完璧に連鎖する SNP、-327G>A と -161C>T、及び、それとは連鎖しない -125T>C の頻度は、それぞれ、0.217 と 0.067 であった。*UGT1A9* の転写調整領域における T9>T10 の頻度は 0.717 であった。また、*UGT1A1* の TATA ボックス内の TA の繰り返し数が異なる変異(*28)、及び、*UGT1As* の 3' UTR の SNPs (*1B) の頻度は、共に 0.067 であった。これらの遺伝子多型の頻度は、日本人の頻度として報告されている頻度とほぼ同程度であった。一方、*UGT1A1* のエクソン1における SNP、211G>A(*6)の頻度は 0.283 で、日本人の頻度として報告されている頻度約 0.151 に比較し、有意に高かった ($p=0.0416$)。*UGT1A1**6 は、アミノ酸変異を伴う SNP で、グルクロン酸抱合能が低下することが知られている。今回用いたヒト組織は、肝切除手術を受けた症例より入手されたものであり、グルクロン酸抱合の低下と肝疾患の発症との関連の可能性が示唆された。

2. 肝組織を用いた *UGT1A9* 及び *UGT2B7* のプロモーター領域の変異、並びに、*UGT1As* の転写調節領域と 3' UTR 領域の変異と mRNA の発現量との関連

内在性コントロールの *GAPDH* の発現量に対する解析対象遺伝子の mRNA の発現量の平均値及び標準偏差が、Exp 1 と Exp 2 の間で大きく異なっており、両結果を合わせて解析することは不適切と考えられたので、別々に解析することにした。

UGT1A1 については、Exp 1 では、転写活性が低下することが知られている*28 のヘテロ接合体が 3 検体あり、これらの mRNA の発現量の平均値

は*1 のホモ接合体の平均値の約 1/4 であった。一方、*28 と互いにヘテロ接合している検体を除き、*6 を有する検体は 8 検体あり、これらの発現量の平均値は*1 のホモ接合体の平均値と大きな差はなかった。なお、Exp1 には、*60 を有する検体はなかった。Exp2 では、*6 については、Exp1 と同様の結果が得られた。*60 を有する検体は 3 検体あったが、その内の 1 検体は 3' UTR に*1B を有する*60-*1B のホモ接合体であった。この検体の mRNA 相対レベルは、*1/*1 に比較して低いということとはなかった。*28 を有する検体は 1 検体のみであった。

UGT1A1 については、*28 では転写活性が低下し、一方、*6 では発現したタンパクの酵素活性が低下することが、広く知られている。今回の日本人の肝組織を用いた mRNA の発現量に関する結果は、ばらつきが大きいものの、*28 保有群では発現量が低下する傾向にあり、一方、*6 保有群では発現量は*1/*1 と同程度にあり、これまで得られている知見と特に矛盾するものではなかった。一方、筆者らは、既に、エンハンサー領域の SNP *60 と 3'UTR の連鎖した SNP *1B が同一染色体上に存在する場合には、ビリルビンのグルクロン酸抱合が相加的に低下することを報告した。今回のサンプルの中には、*60-*1B をホモ接合体で有する検体が 1 例あったが、その *UGT1A1* の mRNA 発現レベルは低くはなかったため、今回のサンプルから*60-*1B の活性が低下する原因を解明することはできなかった。

UGT1A9 では、いずれの Exp においても、プロモーター領域の対立遺伝子では、T9 よりも T10 を多く保有する場合に発現量が増える傾向が認められたが、Exp1 における 2 群間の差の検定、及び Exp2 における傾向検定において有意差は検出されなかった。

UGT1A9 については、プロモーター領域の T の繰り返し数が多い変異(*22) では、*in vitro* の転写活性が野生型に比較し約 2.6 倍高くなることが報告されているが、mRNA 発現レベルや酵素活性は両者で差がないという報告がある。一方、基質に mycophenolic acid 及び propofol を用いた場合には、*22 のグルクロン酸抱合能が有意に上昇するという報告もある。今回のサンプルでは、ばらつきが大きく有意差は検出されなかったが、mRNA 発現量は、T9 に比較し T10 で上昇する傾向が認められ、基質によってはグルクロン酸抱合能が上昇するという報告との関連が示唆された。この変異の日本人における頻度は、白人や黒人の頻度に比較して高い。

UGT2B7 の -125T>C については、両 EXP において、ばらつきが大きく一定の傾向が認められな

った。

E. 結論

ヒト肝組織を用いて、UGT 類の転写調節領域や3' UTRの変異が mRNA の発現量に及ぼす影響を検討した。昨年度、*60と*1Bが同一染色体に存在する場合に、in vivoでビリルビンのグルクロン酸抱合能が低下することが示唆された報告したが、今回のサンプルでは、*60-*1Bをホモ接合体で有する検体が1例しか得られなかったために、UGT1A1の相対的活性低下の原因を確認することはできなかった。一方、UGT1A9の転写調節領域におけるTの繰り返し数の違いによる多型*22は、統計的には有意ではなかったが、mRNAの発現量に影響を及ぼす傾向が示唆された。この遺伝子多型がグルクロン酸抱合能の人種差に及ぼす影響については、Genotypeの違いによる酵素活性の差の程度と人種間における頻度の差を考慮して、今後さらに検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

I 論文発表

鹿庭なほ子、佐井君江. SNPとテラーメイド医療. 腫瘍内科, 1(5), 513-519, 2007.

II 学会発表

なほ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

SLCO1B1 および *MRP2* 遺伝子多型の臨床評価

分担研究者 家入 一郎 九州大学大学院准教授

研究要旨

塩酸イリノテカン(CPT-11)は、多くの癌種に使用される有効な抗がん剤であるが、高度な下痢や血液障害といった重篤な副作用が知られている。その原因の1つにCPT-11の活性代謝産物SN-38の主代謝酵素である*UGT1A1*の遺伝子多型の関与が知られている。一方、最近の*in vitro*研究では、CPT-11の肝取り込みには、OATP1B1(*SLCO1B1* 遺伝子)が関与することが報告されている。そこで、重篤な血液障害を認めたCPT-11服用患者のCPT-11体内動態と*SLCO1B1*、*UGT1A1* 遺伝子多型診断を行った。本症例患者の*UGT1A1* 遺伝子には特徴的な変異は見られなかった。一方、*SLCO1B1* 遺伝子型は*15 alleleのホモ型であった。さらに、コントロール患者群と比較すると、CPT-11、SN-38、グルクロン酸抱合体(SN-38G)、いずれの血中濃度も高い値で推移していた。*15による全身暴露が原因と考えられる。*15変異は日本人で15%程度に見られ、ホモ型は0.8%に見られる。CPT-11使用時の*SLCO1B1* 遺伝子多型診断が推奨される。

*MRP2*は肝細胞の胆管側膜に発現し、ビリルビンなどの生体成分や多くの医薬品の抱合代謝物の胆汁排泄を司る。*MRP2* 遺伝子変異はDubin-Johnson症候群(DJS)の原因遺伝子として知られている。*MRP2*の遺伝子変異の機能評価と人種差解析のために*MRP2*全遺伝子配列の解析方法を確立したが、今回は、DJSが疑われる患者の確定診断のために*MRP2* 遺伝子解析を行った。従来、DJSの原因となる*MRP2* 遺伝子変異は、その殆どが一塩基置換であるが、本症例には、exon 7を含む約1.2 kbの欠損がホモ型で認められた。このような大掛かりな変異は本症例が初めてである。本解析技術を用いた臨床展開が望まれる。

A. 研究目的

SLCO1B1 および *MRP2* 遺伝子多型解析は、本研究事業課題として人種間頻度も含め、検討を加えてきた。しかし、両遺伝子多型と薬効、副作用との関連については不明な点も多い。本研究では、汎用される抗がん剤であるCPT-11を服用中に重篤な血液障害を認めた患者の*SLCO1B1* 遺伝子および*UGT1A1* 遺伝子多型解析を実施し、副作用との関連について検討した。また、*MRP2*の機能不全が原因であるDJSの確定診断を目的に*MRP2* 遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1. 対象患者：CPT-11 study 鳥取大学医学部附属病院内科に入院中の肺癌患者で、治療のために塩酸イリノテカン(CPT-11)を投与中、重篤な血液障害を認めた61歳の男性患者。コントロール群としては、同院入院加療中で、同様なプロトコールによる抗がん剤の投与を受け、重篤な副作用を見ることの無かった患者10名。

MRP2 study 済生会前橋病院消化器内科に通院中

の患者で、諸検査よりDubin-Johnson症候群(DJS)が疑われる76歳の女性患者。患者の特徴として、収縮性心外膜炎による鬱血肝を合併してビリルビン値が40mg/dl以上まで上昇したことなどが挙げられる。

2. 採血：CPT-11点滴静注開始、0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24時間目に採血を行った。採血後、血清を濃度測定に使用した。また、DNA抽出用の採血も同時に実施した。

3. 遺伝子多型の検索：CPT-11については、*SLCO1B1**15, *1bに加え、*UGT1A1**28, *60, *6についてTaq-Man primer & probeを用いた遺伝子診断を実施した。*MRP2*解析については、最初にDJSの既知の原因変異総てについて診断を行ったが、これらの変異は見られなかった。そこで、遺伝子全領域についてfull screeningを行い、塩基配列をシーケンスにより決定した。

4. 血中濃度測定：イリノテカン、代謝物SN-38、ならびにグルクロン酸抱合体(SN-38G)の血中濃度は、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

(倫理面への配慮)；遺伝子解析に使用したDNAは

連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は、関連研究機関総てのゲノム倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。

C. 研究結果と考察

1. CPT-11 study

症例患者の CPT-11, SN-38, SN-38G の AUC はそれぞれ、4553.3, 260.7, 864.4 ng hr/mL であった。投与量で補正した値に換算し、コントロール群と比較すると、本患者の CPT-11, SN-38 の AUC は、それぞれ 43%、87% 高値であった。

UGT1A1 の遺伝子診断では、代謝活性の低下の原因となり、日本人で見られる変異である *6, *28, *60 について行った。特に、*28 変異では、重篤な下痢との関連が知られており、重要な変異となる。本症例患者には、いずれの変異も認められず、総ての箇所野生型のホモ接合型であった。一方、コントロール群では、*60/*60 型が 2 名、*28 変異のヘテロ型が 3 名、*6 のヘテロ型が 2 名認められた。SN-38G の血中濃度は症例患者で高かったが、UGT1A1 変異が原因ではないと考えられる。

最近の *in vitro* 研究の知見に基づき、*SLCO1B1* 遺伝子多型の関与を検討した。症例患者は *SLCO1B1**15 変異のホモ接合型であった。一方、コントロール群では、*15 変異のヘテロ型が 5 名に見られた。*15 変異は、日本人では、約 16% の頻度で見られる変異であるが、ホモ接合型は 0.8% 前後と少ない。*15 変異の機能への影響は、主にスタチンでよく研究されており、輸送能が極めて低下する。症例患者では血中濃度の上昇が見られたが、肝取り込み能が低下する結果、中心静脈への移行量が増加し、血中濃度が上昇したものと推定される。*15 変異のヘテロ接合型では、血中濃度上昇は見られないことから、ホモ接合型に注意が必要と考えられる。

2. MRP2 遺伝子解析

当初、DJS の既知の原因遺伝子変異を網羅的に探索したが、認められなかった。新規の変異が予想されたことから、探索範囲を全領域に拡大した。exon 7 が増幅されなかったことから、本領域を中心に解析を行った結果、exon 7 を含む 1.2 kb の欠損が確認された。従来知られる DJS の原因変異は、一塩基置換が主であり、これほど大きな変異の報告は皆無である。exon 7 の欠損であることから、輸送機能は完全に喪失すると思われ、本欠損が DJS の原因と特定された。

D. 結論

*SLCO1B1**15 変異のホモ接合型がイリノテカンと SN-38 の体内動態に大きく影響し、肝取り込みが低下することにより生じる体内蓄積が重篤な副作用の原因となることを示唆した初めての症例報告である。日本人の場合、ホモ型の頻度は 0.8% と低いが、適正使用のためには、事前の診断が望まれる。

DJS の原因遺伝子変異として、*MRP2* 遺伝子の 1.2 kb の exon 7 を含む大掛かりな欠損を特定した。本変異は、極めて希な変異であり、日常的に診断が必要な変異ではないと考えられる。詳細な解析が実施されている *MRP2* 遺伝子にも新規の変異の存在の可能性が残されていることを意味するもので、興味深い。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

I 論文発表

1. Takane H, Miyata M, Burioka N, Kurai J, Fukuoka Y, Suyama H, Shigeoka Y, Otsubo K, Ieiri I, Shimizu E. Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the *SLCO1B1**15 allele. *Ther Drug Monit.* 2007;29:666-8.

II 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

CYP1A2 の人種差とエピジェネティクス

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

白人種と日本人肝検体を用いて CYP1A2 活性の指標である Ethoxyresorufin *O*-deethylation (EROD) 活性の比較を行うとともに、CYP1A2 の遺伝子発現における epigenetics の関与を検討した。日本人非喫煙者肝ミクロソームにおける EROD 活性は白人種よりも 1.7 倍高い値を示したが、これらの間に有意な差は認められなかった。一方、HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は CpG 配列メチル化阻害剤である 5'-aza-dC 処理により大きく上昇した。また、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて転写開始点近くの GC-box の機能解析をおこなったところ、GC-box を含む CYP1A2 プロモーターは高い転写活性化能を示した。この GC-box には Sp1 および Sp3 結合が認められ、CYP1A2 が発現しているヒト細胞ではこの部位が 80%非メチル化状態であったのに対し、発現していない HeLa 細胞では完全にメチル化されていた。さらに、*in vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果から、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることが示された。以上の結果から、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化は重要な役割を担っていると考えられた。今後このような epigenetics な遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差とどのように関連するか検討する必要があると考えられた。

協力研究者

降幡知巳 千葉大学大学院薬学研究院助教
宮嶋篤志 千葉大学大学院薬学研究院博士課程
小林カオル 千葉大学大学院薬学研究院准教授

O-deethylation 活性の平均値は男性で約 3 倍、女性で約 1.5 倍日本人より高く、ethoxyresorufin *O*-deethylation (EROD) 活性の平均値も白人種のほうが日本人より有意に高いという報告や、ヒスパニックの肝ミクロソームにおける EROD 活性の平均値は白人、アフリカ系アメリカ人よりも低い傾向があるという報告がある。しかしヒト肝ミクロソームを用いた CYP1A2 活性の人種差に関する報告はこれらのみである。

A. 研究目的

CYP1A2 は肝臓特異的に発現し肝臓における全 CYP の約 13%を占め、テオフィリン、イミプラミン、プロプラノロールなど臨床上重要な薬物の代謝に関わっている CYP 分子種である。CYP1A2 はまた、estradiol、retinal、melatonin といった内因性基質の代謝や芳香族アミンなどのがん原物質の代謝的活性化に関与することが知られている。さらに CYP1A2 の遺伝子発現量は喫煙などの環境因子により大きく変化する。

最近、CYP1A2 の活性に人種間で差があるという報告がなされた。Ghotbi らは、これまでに *in vivo* で CYP1A2 活性の示標とされている血漿中のカフェイン代謝物比をスウェーデン人および韓国人で測定し、韓国人で約 6 倍、スウェーデン人で約 15 倍の個人差が認められ、スウェーデン人のカフェイン代謝活性の平均値は韓国人よりも約 1.5 倍高値を示したことを報告している。また、白人種の肝ミクロソームにおける phenacetin

一方、CYP1A2 の活性には約 60 倍以上、mRNA 量には約 40 倍の大きな個人差が存在するという報告がある。CYP1A2 の個人差を生み出す原因の一つとして CYP1A2 遺伝子に存在する single nucleotide polymorphisms (SNPs) が考えられる。これまでに CYP1A2 遺伝子の 5' 上流領域および翻訳領域に SNPs が報告されている。これらのうち 5' 上流領域の CYP1A2*1C (-3860G>A) および CYP1A2*1K (-739T>G、-729C>T、-163C>A) は CYP1A2 活性を低下させ、CYP1A2*1F (-163C>A) は CYP1A2 の誘導能を上昇させるという報告がある。また翻訳領域の CYP1A2*3 (2385G>A)、CYP1A2*4 (2499A>T) などは CYP1A2 の発現量を低下させるという報告がある (Chevalier *et al.*, 2001)。しかし、これらの SNPs は頻度が低く、CYP1A2 の大きな個人差を説明できない。

そこで本研究では 1) 白人種と日本人肝ミクロソームを用いて CYP1A2 活性に人種差があるか否かを明らかにすること、2) CYP1A2 の個人差を生じる SNPs 以外の要因として epigenetics に着目し、メチル化が CYP1A2 の発現に関わっているか否かについての検討をおこなった。

B. 研究方法

1. ヒト肝ミクロソーム及び活性測定

日本人肝臓検体 (n=14) は国立がんセンター東病院の協力を得て入手したものをを用いた。白人肝臓検体 (n=11) は HAB 協議会を通じて入手したものをを用いた。いずれの肝検体の本研究への使用は千葉大学大学院薬学研究院倫理審査委員会承認されている。ヒト肝ミクロソームの調製は、常法に従って行った。Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) 活性の測定は生成する resorufin を HPLC により定量することにより行った。

2. DNA メチル化酵素阻害剤処理及び reverse transcription (RT)-PCR 法

HepG2 細胞は 10% 牛胎児血清およびペニシリン-ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。DNA メチル化阻害剤処理は 5'-aza-deoxycytidine を培地に加え培養することによりおこなった。コントロールには dimethylsulfoxide (DMSO) を最終濃度 0.5% で加えた培地を用いた。薬剤添加から 72 時間後に細胞を回収し、total RNA を抽出し、cDNA を合成した。コントロールおよび 5'-aza-dC 処理 HepG2 細胞の cDNA をテンプレートとし、CYP1A2 mRNA 検出用のプライマーを用いて PCR をおこなった。PCR 産物はエチジウムブロマイドを用いて可視化し、解析した。

3. CYP1A2 遺伝子プロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターベクターの作製

CYP1A2 遺伝子転写開始点 5' 上流のゲノム DNA クローニングは Human Genomic DNA をテンプレートとして PCR によりおこなった。得られた PCR 産物は pGL4.17 vector に挿入し、以下 p-342/+38WT とした。これをもととして site-directed mutagenesis をおこない、CYP1A2 プロモーターの GC-box に変異を導入した。得られたコンストラクトを以下 p-342/+38MT とした。

4. ルシフェラーゼアッセイ

HeLa 細胞は 10% 牛胎児血清およびペニシリン-

ストレプトマイシンを加えた RPMI を用いて培養した。HepG2 細胞の培養法は上述した。p-342/+38WT または p-342/+38MT、pGL7.14 を Trans IT LT1 と混合し、reverse transfection 法を用いてそれぞれの細胞に導入した。CpG 配列をメチル化した p-342/+38WT および p-342/+38MT は SssI と S-adenosylmethionine で 4 時間処理することにより作製した。コントロールとする CpG 配列非メチル化 p-342/+38WT および p-342/+38MT は S-adenosylmethionine を加えずに SssI 処理することにより作製した。

DNA 導入から 48 時間後に細胞を回収し、dual luciferase reporter assay system および TD-20/20 ルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ (pGL4.17 由来) の活性はウミシイタケルシフェラーゼ (pGL7.14 由来) の活性を用いて補正した。

5) CpG 配列メチル化解析法

ヒト肝組織は HAB より入手した。本研究におけるヒト組織の使用は千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会において事前に承認されている。ヒト肝組織、HepG2 細胞および HeLa 細胞よりゲノム DNA を抽出し、EpiTect bisulfate kit によりゲノム DNA のパイサルファイト処理をおこなった。これをテンプレートとし、GC-box 内の CpG 配列および転写開始点の下流に存在する 3 つ CpG 配列を含む領域を増幅できるように設計したプライマーを用いて PCR をおこなった。得られた PCR 産物は pGEM-easy vector に導入し、得られた DNA の塩基配列を CEQ2000 DNA analysis system により解析した。

ヒト肝組織、HepG2 細胞、HeLa 細胞における CYP1A2 mRNA 発現の解析は RT-PCR 法を用い、上述の方法でおこなった。GAPDH mRNA 発現の解析は GAPDH mRNA を検出するプライマーを用いて同様に RT-PCR を用いておこなった。

C. 研究結果

1. ヒト肝ミクロソームにおける EROD 活性の人種差

日本人肝ミクロソーム (n=14) における EROD 活性の平均値±標準偏差は 87.8±42.6 (pmoles / min / mg protein)、白人種肝ミクロソーム (n=11) における EROD 活性は 42.1±35.8 (pmoles / min / mg protein) であった。これらの活性を人種別に喫煙者と非喫煙者と比較した結果、日本人肝ミクロソームにおける喫煙者および非喫煙者の EROD 活性の平均値±標準偏差はそれぞれ 138.1±42.6、72.0±33.4 (pmoles / min / mg protein) であり、喫煙者の EROD 活性が非喫煙者よりも高い傾向が認

められた。一方、白人種肝ミクロソームでは、喫煙者および非喫煙者の EROD 活性の平均値±標準偏差はそれぞれ 41.3 ± 5.9 、 42.7 ± 24.7 (pmoles / min / mg protein) となり、喫煙者および非喫煙者間で差は認められなかった。いずれも母数が少ないため検定はおこなわなかった。

次に、性と年齢の影響をそれぞれの人種について比較した。性差については、日本人種および白人種肝ミクロソームのいずれにおいても差は認められなかった。また、EROD 活性への年齢の影響を2群 (<60歳、>60歳) に分けて検討した結果、日本人種および白人種肝ミクロソームのいずれにおいても差は認められなかった。

これらの結果から、喫煙者の結果を除き、非喫煙者で EROD 活性を日本人と白人種で比較した。その結果、日本人種肝ミクロソームにおける EROD 活性は白人種肝ミクロソームにおける EROD 活性よりも 1.7 倍高い傾向を示したが、これらの間に有意な差は認められなかった。

2. CYP1A2 の遺伝子発現とメチル化

1) DNA メチル化酵素阻害剤処理による CYP1A2 mRNA 発現量への影響

CYP1A2 遺伝子発現におけるエピジェネティクスの役割を検討するため、DNA メチル化酵素阻害剤である 5'-aza-dC を HepG2 細胞に暴露し、CYP1A2 mRNA 発現量の変動を解析した (Fig. 1)。その結果、コントロールと比較し 5'-aza-dC 処理により CYP1A2 mRNA の発現量は大きく上昇した。

2) CYP1A2 遺伝子上流域における CpG 配列の検索

CYP1A2 遺伝子上流域における CpG アイランドを CpG island searcher を用いて解析した。その結果 CYP1A2 遺伝子上流域には CpG アイランドは存在せず、CpG 配列が散在することが明らかとなった。散在する CpG 配列をさらに解析した結果、転写開始点近傍に存在する GC-box 内に CpG 配列が存在することが明らかとなった (Fig. 2)。

3) CYP1A2 プロモーター活性における GC-box の機能解析

CYP1A2 遺伝子転写開始点近傍の GC-box の機能は明らかとなっていない。そこでルシフェラーゼ Reporter システムを用いてこの GC-box の機能解析をおこなった (Fig. 3)。その結果、GC-box を含む CYP1A2 プロモーター (p-342/+38WT) は HepG2 細胞、HeLa 細胞いずれにおいてもコントロール (pGL4.17) と比較して高い転写活性化能を示した。これに対し、GC-box に変異を導入した p-342/+38MT では、HepG2 細胞および HeLa 細

胞においてそれぞれ p-342/+38WT の 40% および 60% の転写活性であった。

4) CYP1A2 遺伝子 GC-box に結合する核内因子の解析

GC-box に結合し、CYP1A2 プロモーターの活性化を生じる核内因子を同定するためゲルシフトアッセイをおこなった (Fig. 4)。Sp family が結合する領域を含むプローブおよび HepG2 細胞の核抽出物を用いたところ、Sp1 および Sp3 の結合を示すシフトバンドが得られた。これらのバンドは非標識プローブを competitor として用いることで消失し、GC-box に変異が入っている非標識プローブを competitor として用いた場合には消失しなかった。CYP1A2 遺伝子上流-48 から-19 までの領域をプローブとして用いたところ、Sp1 および Sp3 によって形成されるバンドと同じ位置にシフトバンドが認められた。これらのバンドは GC-box を持つ非標識プローブを用いることで消失し、GC-box に変異が入っている非標識プローブを competitor として用いた場合には消失しなかった。

5) GC-box 内の CpG 配列メチル化状態と CYP1A2 mRNA 発現の相関

GC-box 内の CpG 配列のメチル化状態と CYP1A2 遺伝子発現の関連を解析した (Fig. 5)。RT-PCR をおこなったところ、ヒト肝臓および HepG2 細胞には CYP1A2 mRNA が発現しているが、HeLa 細胞には発現していないことが明らかとなった (Fig. 5A)。これら3種の試料から抽出したゲノム DNA をバイサルファイトシーケンス法により解析した (Fig. 5B)。その結果、CYP1A2 を発現する HepG2 細胞では GC-box 内 CpG 配列は全て非メチル化状態であり、ヒト肝組織でも 80% の CpG 配列が非メチル化状態であった。これに対し CYP1A2 を発現しない HeLa 細胞では GC-box 内 CpG 配列は完全にメチル化されていた。転写開始点の下流に存在する3つの CpG 配列はいずれの細胞においてもすべてメチル化されていた。

6) GC-box 内 CpG 配列メチル化の CYP1A2 プロモーター活性への影響

GC-box 内 CpG 配列メチル化の CYP1A2 プロモーター活性における影響をルシフェラーゼ Reporter システムにより解析した (Fig. 6)。SssI 処理によりメチル化した p-342/+38WT の転写活性は、非メチル化 p-342/+38WT の転写活性の 60% であった。これに対し、GC-box に変異を導入した p-342/+38MT を用いた解析では転写活性におけるメチル化の影響は認められなかった。

E. 考察

1. ヒト肝ミクロソームにおける EROD 活性の人

種差

緒言でも述べたように、スウェーデン人の血漿中カフェイン代謝活性の平均値は韓国人よりも約 1.5 倍高値を示したと報告されている。この報告から、白人種のほうがアジア人よりも CYP1A2 活性が高い可能性が考えられるが、本検討の結果はこの結果とは異なっていた。この原因は不明であるが、考えられる可能性の一つとして、CYP1A2 活性の測定方法の違いが挙げられる。Ghotbi らは血漿中カフェイン代謝比 (1,7-dimethylxanthine (17X) / 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine, 137X)) で CYP1A2 活性を比較しているが、本検討では EROD 活性で比較した。In vivo におけるカフェインの代謝には CYP1A2 以外の酵素も関与する可能性が示唆されており、CYP1A2 活性のみを測定しているとはいえない可能性が考えられる。例えば、ヒト肝ミクロソームにおいて 17X から 1,7-dimethyluracil (17U) への代謝活性と CYP1A2 活性との相関はみられないが、CYP2A6 活性との相関が認められており、CYP2A6 遺伝子の多型 (CYP2A6*1/*4、CYP2A6*1/*9、CYP2A6*4/*9) が 17X から 17U への代謝活性を有意に低下させるという報告がある。このことから CYP2A6 の活性を低下させる多型をもつ個体では、多型をもたない個体と比較して 17X の割合が高くなり、カフェイン代謝比 (17X/137X) が高く見積もられる可能性がある。したがって in vivo において CYP2A6 の遺伝多型をもつ被検者では CYP1A2 活性が正確に測定できていないという可能性が考えられる。しかし、本検討で用いた日本人および白人種肝検体では肝臓の入手法が異なっており、日本人種肝検体は手術時摘出検体であるが、白人種肝検体は救命処置をおこなった後肝臓を摘出し、かん流した後に輸送して -80°C で保存した検体である。したがって、白人種肝検体はこれらの過程において CYP1A2 の活性が低下した可能性も否定出来ない。

2. CYP1A2 の遺伝子発現とメチル化

epigenetics を担うメカニズムの一つにゲノム DNA 上の CpG 配列のメチル化が存在する。CpG 配列のシトシン残基のメチル化は DNA-転写因子相互作用時の物理的な障害となるばかりでなく、クロマチン構造自体の変化を生じ、遺伝子発現を不活化することが報告されている。したがって CpG 配列のメチル化状態は遺伝子の発現に大きな影響を及ぼすと考えられる。本研究においても HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は CpG 配列メチル化阻害剤である 5'-aza-dC 処理により大きく上昇したことから、CpG 配列のメチル化は CYP1A2 遺伝子発現に重要な役割を担ってい

ると考えられた。

これまでに 5'-aza-dC 処理により発現量の上昇が認められる遺伝子は数多く報告されており、多くの場合そのメカニズムは CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列が密集した領域における CpG 配列の脱メチル化が関与すると考えられている。しかしながら、CYP1A2 遺伝子の近傍には CpG アイランドが存在しない。したがって散在する CpG 配列のいずれかが CYP1A2 遺伝子発現に関与すると考えられる。これら散在する CpG 配列のうちの一つは転写開始点近傍にある GC-box 内に存在していた。GC-box は Sp family member の認識配列である gggcgg をモチーフとする転写活性化領域であり、多くの遺伝子においてその転写に必須の領域として同定されている。本研究の結果においても、GC-box に変異を導入した場合 CYP1A2 のプロモーター活性は大きく減弱すること、CYP1A2 遺伝子の GC-box に Sp1 および Sp3 結合が認められたことから、CYP1A2 遺伝子の GC-box はそのプロモーター機能に重要な領域であり、CYP1A2 遺伝子の転写に大きく寄与していると考えられる。したがってこの領域における CpG 配列のメチル化が CYP1A2 遺伝子発現に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。

CYP1A2 遺伝子発現における GC-box 内の CpG 配列のメチル化の役割を解析した結果は、上述の可能性を支持するものと考えられる。ヒト肝組織、HepG2 細胞では CYP1A2 の GC-box 内の CpG 配列は非メチル化されているため、Sp1 および Sp3 が GC-box に結合しうる状態であり、その結果 CYP1A2 遺伝子が発現したと考えられる。ヒト肝ゲノム DNA の GC-box のメチル化の程度は 80% であったが、これは CYP1A2 遺伝子の発現が認められない非肝実質細胞由来のゲノム DNA の混在のためであると考えられる。一方、HeLa 細胞では CYP1A2 の GC-box はメチル化されているため Sp1 および Sp3 が GC-box に結合できず、その結果 CYP1A2 遺伝子が発現しないと考えられる。また、転写開始点より下流に存在する CpG 配列が全ての検体で完全にメチル化されていたことはこれらの CpG 配列は CYP1A2 遺伝子発現に関与していないことを示唆している。In vitro メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果からも、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることが示されており、以上の結果を考え合わせると、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化は重要な役割を担っていると考えられる。

GC-box のメチル化が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差にどのように関与しているか現在不明で

ある。これまでに CYP1A2 遺伝子の GC-box 内、GC-box 近傍に SNP は認められていない。しかしながら、一般に CpG 配列のメチル化状態は環境因子や病態などにより変化することが報告されていることから、GC-box 内 CpG 配列のメチル化の程度は個人間により異なる可能性は否定できない。今後 CYP1A2 遺伝子発現量の個人差と GC-box 内 CpG 配列のメチル化との関連に焦点を置いた解析が必要であると考えられる。

F. 結論

1. 本研究では非喫煙者における日本人種と白人種肝ミクロソームにおける CYP1A2 活性には有意な人種差は認められなかった。今後、測定法や比較する肝臓の入手法をそろえた条件で比較する必要があるものと考えられた。
2. 本研究の結果より CYP1A2 遺伝子転写開始点近傍に存在する GC-box は CYP1A2 遺伝子のプロモーター機能に重要な役割を担うこと、さらに GC-box 内に存在する CpG 配列のメチル化はその GC-box の機能を調節することにより CYP1A2 遺伝子発現を調節する可能性が考えられた。今後このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差とどのように関連するか検討する必要があると考えられた。

G. 健康危険情報 なし

H. 研究発表

学会発表

宮嶋篤志、太田雪、降幡知巳、千葉 寛：エピジェネティクス研究を促進させる新規 CpG-free luciferase reporter. 日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜

宮嶋篤志、松本早矢香、降幡知巳、千葉 寛：GC box メチル化による CYP1A2 発現制御. 日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜

Miyajima A, Ohta Y, Matsumoto S, Furihata T, Chiba K. Epigenetic regulation of CYP1A2 gene expression by GC box methylation. ISSX 2nd Asia Pacific Regional Meeting, Shanghai, China, 2008

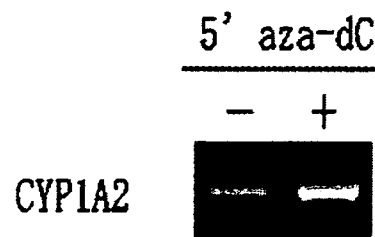


Fig. 1. Induction of CYP1A2 gene expression by DNA methyltransferase inhibitor. Expression of CYP1A2 mRNA was analyzed by RT-PCR. Symbols (-) and (+) indicate the absence and the presence of 5' aza-deoxycytidine (5' aza-dC, 5 μ M).

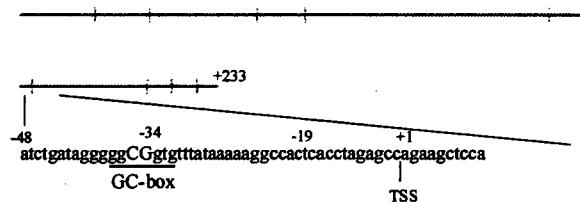


Fig. 2. Localization of CpG sequences in the 5'-upstream of the CYP1A2 gene. F-342 and R-38 indicate primers used for plasmid construction. The CpG sequences are indicated by the horizontal lines. The CpG sequence focused on the present study was highlighted by the capital letters in the nucleotides sequence. TSS, a transcription start site.

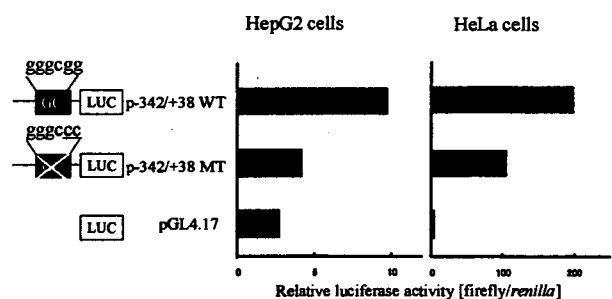


Fig. 3. The role of a GC box in the promoter activity of the CYP1A2 gene. Luciferase assay was performed in HepG2 cells and HeLa cells. A GC-box and a mutated GC-box are indicated by black box with the nucleotide sequence. The cross and underline indicates the mutation. Each value is the mean of relative activities (Firefly/renilla) for two separate experiments, each performed in triplicate.

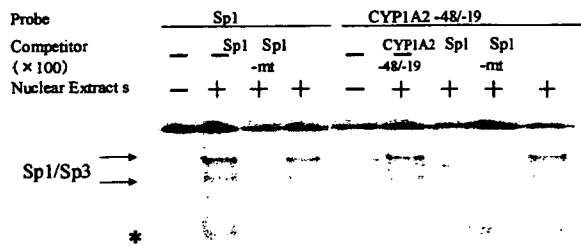
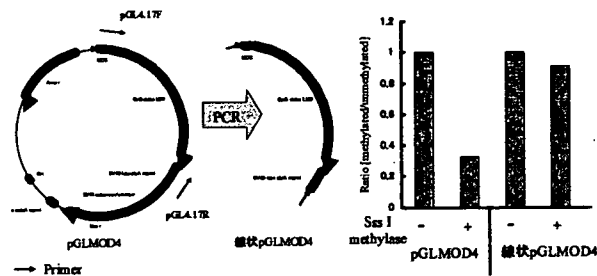


Fig. 4. Characterization of nuclear proteins binding to the GC-box of the CYP1A2 gene promoter. Gel mobility shift assay was performed with nuclear extracts prepared from HepG2 cells. Probes were added to all lanes. Sp1 and Sp1-mt are the oligonucleotides containing the putative and mutated Sp family member binding sites, respectively. Symbols (-) and (+) indicate the presence and the absence of competitors or nuclear extracts. Non-radiolabeled probes were used as competitors at 100-fold excess concentration. Arrows indicate the shifted bands containing Sp family members. An asterisk indicates a non-specific band.

Appendix: CpG-free luciferase reporter vector: 27PE-am258 参照

メチル化 reporter assayにおいて、reporter遺伝子に存在するCpG配列の影響を除くため、新規CpG-free reporterであるpGLMOD4を作製した。さらにvector骨格に存在するCpG配列をPCR法により除いた総状pGLMOD4を作製し、メチル化 luciferase assayをおこなった。



作製した総状pGLMOD4はmethylaseによる影響を受けないことが示された。従って本研究のメチル化 luciferase assayは総状pGLMOD4を用いておこなった。

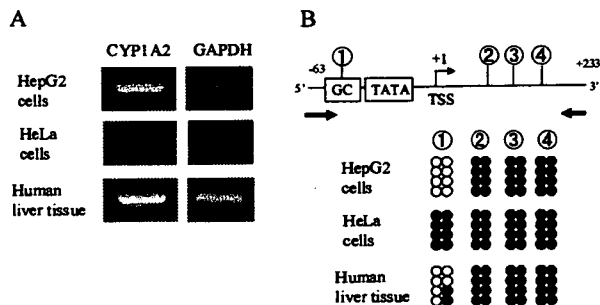


Fig. 5. Comparison of methylation status of the CpG sites in the CYP1A2 gene among three different cell types. A, RT-PCR analysis was performed for detection of CYP1A2 mRNA expression. GAPDH was used as an internal control. B, bisulfite sequence analysis was performed to examine methylation status of the CpG site within the GC-box (①) and those in the down stream of the transcription start site (TSS) (②, ③, ④). Open circle (○) and closed circle (●) indicate methylated and unmethylated CpG site, respectively. The arrows indicate primers.

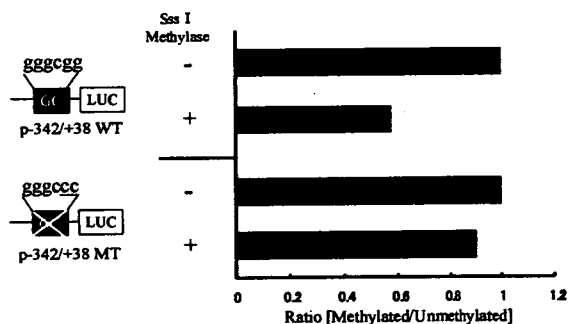


Fig. 6. Effects of methylation of the CpG site within the GC-box in the promoter activity of the CYP1A2 gene. Luciferase assay was performed in HepG2 cells. The reporter DNA was treated with Sss I in the presence (+) or the absence (-) of S-adenosylmethionine. A GC-box and a mutated GC-box are indicated by black box with the nucleotide sequence. The cross and underline indicates the mutation. Each value is the mean of relative activities (Firefly/luciferase) for two separate experiments, each performed in triplicate.

別添4

II. 研究成果の刊行に関する一覧表