

学位論文

核内受容体 AhR を介した薬物代謝酵素の
遺伝子発現誘導に影響を及ぼす DNA メチル化
のメカニズムの解析

岩手医科大学薬学研究科

三浦利貴

目 次

| | |
|---|----|
| 略語表 | 2 |
| 序論 | 3 |
| 第1章 <i>CYP1</i> 遺伝子発現誘導の応答性に及ぼす DNA 脱メチル化の影響 | 8 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料および実験方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 第2章 DNA メチル化により <i>CYP1B1</i> 遺伝子発現誘導の応答性が制御される XRE 配列の探索とメカニズムの解析 | 16 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料および実験方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 第3章 ヒト組織における <i>CYP1B1</i> 遺伝子転写調節領域の DNA メチル化状態の解析 | 28 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料および実験方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 第4章 DNA 脱メチル化が AhR リガンド曝露による <i>CYP2</i> および <i>CYP3</i> 遺伝子発現誘導を惹起する可能性の検討 | 34 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料および実験方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 第5章 総合考察および結論 | 41 |
| 謝辞 | 46 |
| 引用文献 | 47 |

略語表

| 略語 | 英語表記 | 日本語表記 |
|------------|--|----------------------------|
| ACTB | beta-actin | ベータアクチン |
| AhR | aryl hydrocarbon receptor | 芳香族炭化水素受容体 |
| AhRR | aryl hydrocarbon receptor repressor | 芳香族炭化水素受容体リプレッサー |
| ARA 9 | immunophilin homolog ARA9 | イムノフィリン様タンパク質 |
| ARNT | AhR nuclear translocator | 芳香族炭化水素受容体核内輸送体 |
| β NF | beta-naphthoflavone | ベータナフトフラボン |
| cDNA | complementary DNA | 相補的 DNA |
| ChIP | chromatin immunoprecipitation | クロマチン免疫沈降 |
| COBRA | combined bisulfite restriction analysis | (解析手法) |
| CUT&RUN | cleavage under target & release using nuclease | (解析手法) |
| DAC | 5-aza-2'-deoxycytidine | デシタビン |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium | (培養液) |
| DMSO | dimethyl sulfoxide | ジメチルスルホキシド |
| DNMT | DNA methyltransferase | DNA メチル基転移酵素 |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid | エチレンジアミン四酢酸 |
| FBS | fetal bovine serum | ウシ胎児血清 |
| GEO | Gene Expression Omnibus | 遺伝子発現情報データベース |
| HSP90 | heat shock protein 90 | 熱ショックタンパク質 90 |
| IGF2 | insulin-like growth factor 2 | インスリン様成長因子 2 |
| mRNA | messenger RNA | メッセンジャー RNA |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information | アメリカ国立生物工学情報センター |
| PAH | polycyclic aromatic hydrocarbon | 多環芳香族炭化水素 |
| PBS | phosphate buffered saline | リン酸緩衝生理食塩水 |
| PCR | polymerase chain reaction | ポリメラーゼ連鎖反応 |
| RNA pol II | RNA polymerase II | RNAポリメラーゼ II |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute | (培養液) |
| SDS | sodium dodecyl sulfate | ドデシル硫酸ナトリウム |
| TBP | TATA binding protein | TATA ボックス結合タンパク質 |
| TCDD | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin | 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン |
| XRE | xenobiotic responsive element | 異物応答配列 |

序論

薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (Cytochrome P450, CYP) は、生体内および生体外に由来する多様な化学物質の代謝に重要な役割を果たす。これらの CYP 分子種は各組織に特異的な様式で恒常的に発現するとともに、一部の CYP 分子種では化学物質の曝露など必要な場合には発現の誘導が起こる。この酵素誘導のシステムは、環境化学物質や薬物などの生体外異物の迅速な解毒代謝を促し、生体防御に寄与する。例えば、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

(TCDD) や beta-naphthoflavone (β NF) のような多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs) の曝露を受けたヒト細胞では、核内受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した経路 (AhR 経路) により *CYP1* 分子種である *CYP1A1*, *CYP1A2* および *CYP1B1* 遺伝子の転写が誘導される。AhR は細胞質中では heat shock protein 90 (HSP90) , immunophilin homolog ARA9 (ARA9) , p23 などと会合しているが、リガンドである PAHs と結合した AhR は核内へと移行し、AhR nuclear translocator

(ARNT) と複合体を形成し、*CYP1* 遺伝子上流のエンハンサー領域内に共通して存在する xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれる配列に結合する。この AhR/ARNT 複合体の結合が起点となり、遺伝子プロモーター領域へ TATA binding protein (TBP) および RNA ポリメラーゼ II (RNA pol II) などにより構成された転写因子複合体がリクルートされ、遺伝子の発現が誘導される (1 - 5) (図 1)。興味深いことに、この遺伝子発現誘導の応答性には、誘導されやすい個体や誘導されにくい個体が存在するといった個体差があることが認められており (6) , その一部は遺伝子多型で説明することができる。具体的には、*CYP1A2*1F* (-163C > A) /**IC* (-3860G > A) と *CYP1A2*1F/*1F* との間に *CYP1A2* 遺伝子発現誘導の応答性に差異が認められた (7)。しかし、遺伝子多型のみで遺伝子発現誘導の応答性の差異すべてを説明できず、その主たるメカニズムは明らかになっていない。

遺伝子発現の量的な違いは、遺伝子多型の他にエピジェネティクス機構によっても制御される。エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御を行うシステムである。エピジェネティクスの概念は、1942 年に Waddington により提唱され (8) , 現在では DNA 塩基配列を超えた遺伝子発現継承の仕組みなどと定義され、ヒストンの化学修飾やクロマチンの立体構造の変化などが関与することが明らかとなっている。中でも DNA メチル化による遺伝子発現制御は、最も研究されているエピジェネティクス機構の一つであり、特に 5'-CG-3' 配列 (CpG 配列) 上のシトシン塩基におけるメチル基の付加または除去は遺伝子発現の制御に重要な役割を果たす。このとき、DNA にメチル基を転移する反応を触媒する酵素が DNA methyl

transferase (DNMT) であり，ヒトでは少なくとも DNMT1, DNMT3a および DNMT3b の 3 種のアイソザイムがメチル基転移活性を有している (9) . 例えば，体細胞分裂過程において，DNMT1 が複製直後のヘミメチル化状態の二本鎖 DNA と結合してメチル基を転移することで，分裂後の細胞でもメチル化状態が維持される (10) (図 2) . 実際に，DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) を増殖中の培養細胞に 72 時間程度曝露すると，メチル化されていない DNA の蓄積が起こる．例えば，がん細胞では DAC の処理により，がん抑制遺伝子の転写調節プロモーター領域の脱メチル化が促される．その結果，多くの場合は遺伝子発現量の増加が観察される (11 - 13) . また，DNA メチル化状態は，しばしば後天的な要因によっても変動する．例えば，長期間の喫煙は体細胞の DNA メチル化異常を蓄積させ，肺がんや食道がんの発がんに寄与することが知られている (14, 15) . また，*Helicobacter pylori* の感染は胃粘膜細胞の DNA メチル化状態の変化を引き起こし，胃がんの発生に寄与する．*Epstein-Barr virus* が感染した胃がん細胞は，感染していない胃がん細胞と比較しがん抑制遺伝子などのプロモーター領域の高メチル化が認められ，腫瘍形成に寄与する (16) .

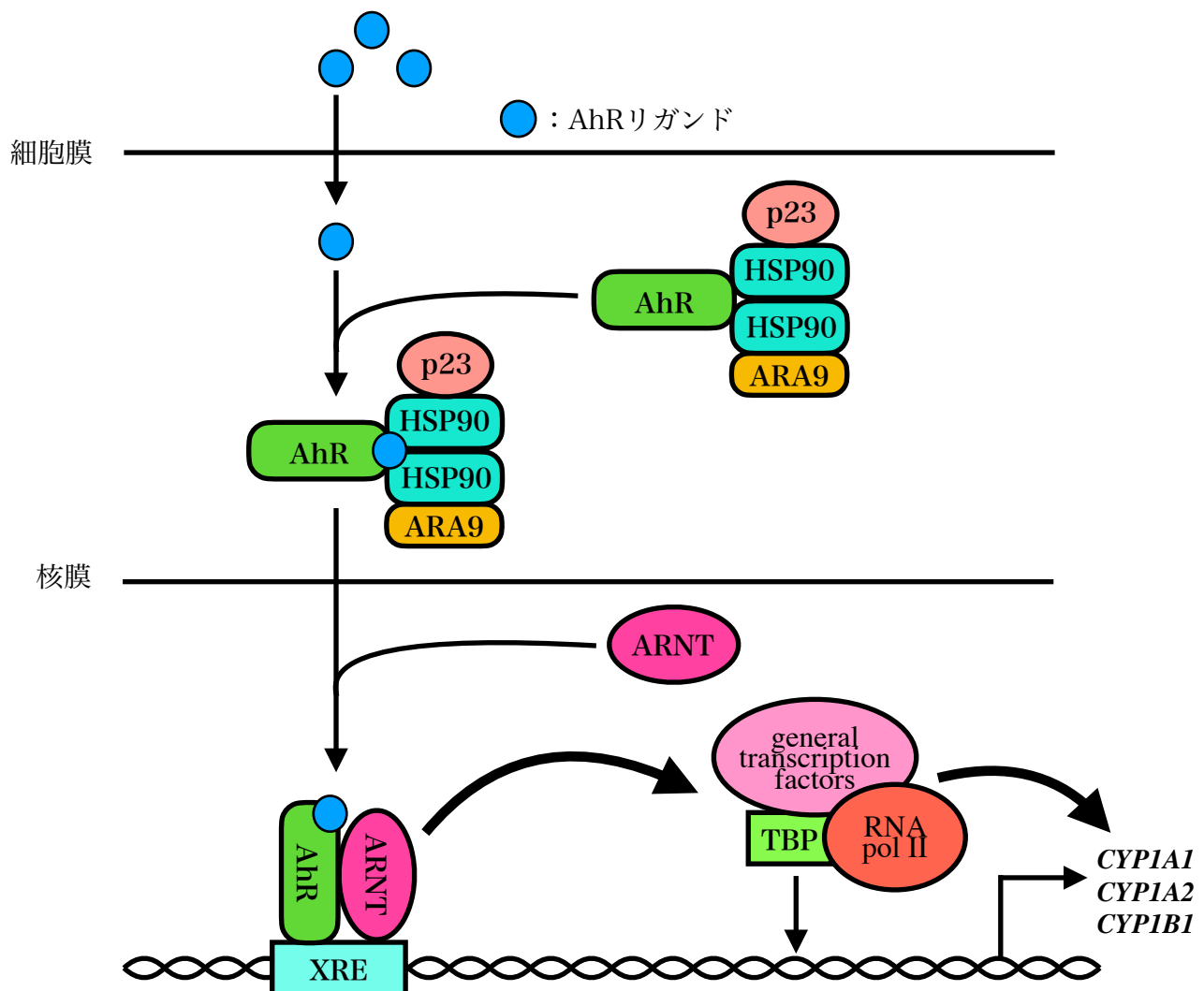


図 1. AhR 経路による *CYP1* ファミリーの遺伝子発現誘導のメカニズム (5)

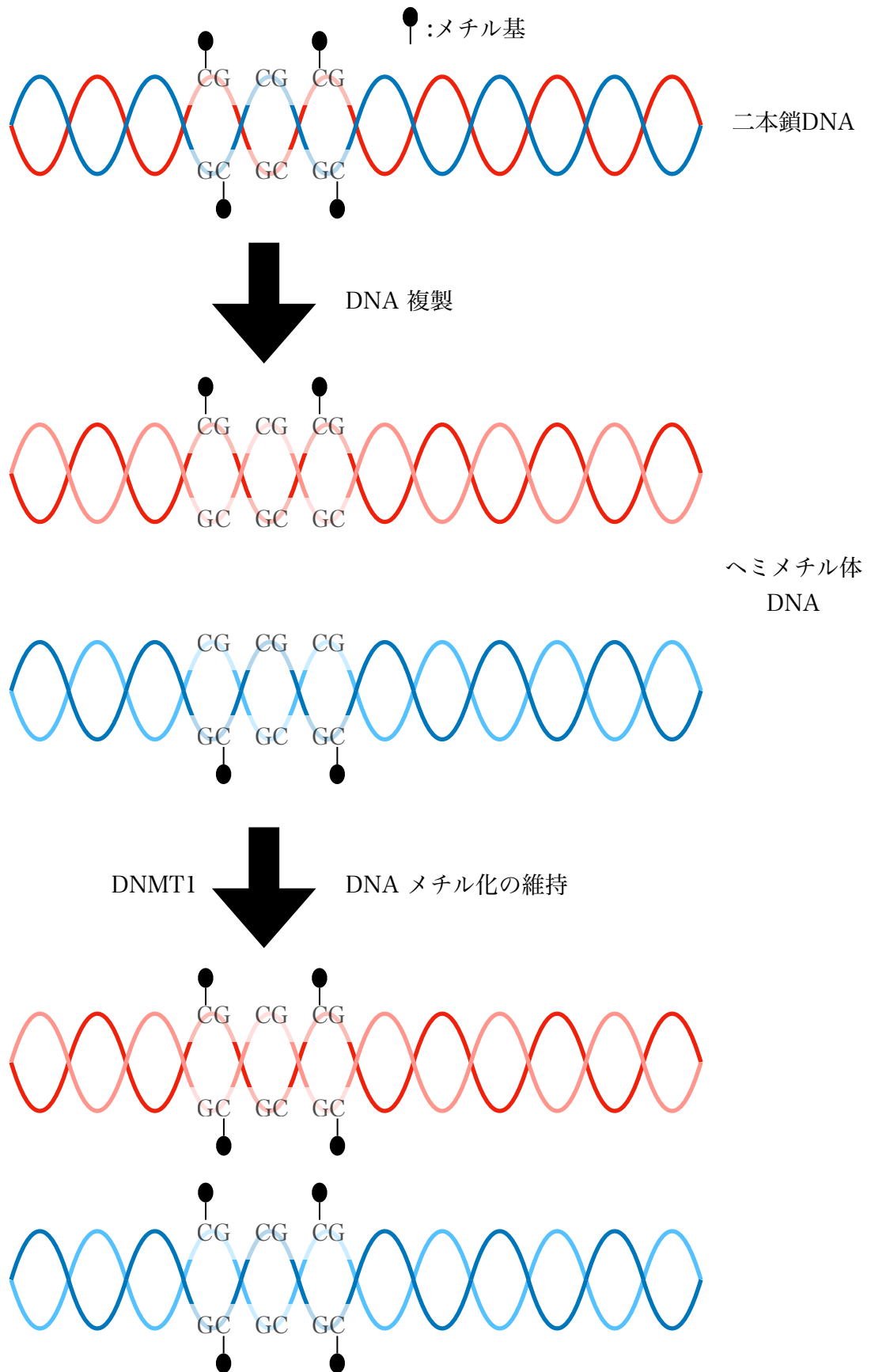


図 2. DNA 複製における DNA メチル化の維持機構 (10)

このように DNA メチル化の異常は、遺伝子の局所的な高メチル化や、全体的な低メチル化などが例として挙げられる。これらはがんの発生や進展に寄与するのみならず、精神疾患や生活習慣病への影響も示唆されている（9, 17 - 20）。

CYP1 遺伝子の中でも、特に *CYP1B1* において DNA メチル化による遺伝子発現制御を受けることが明らかになっている。興味深いことに、DAC による DNA 脱メチル化は *CYP1B1* 通常状態の発現量を変化させるとともに、AhR リガンドである TCDD の曝露による遺伝子発現誘導にも影響を与えることが報告されている（21 - 25）。しかし、この遺伝子発現誘導へ DNA メチル化がどのように影響するかは明らかとなっていない。これらの結果は、DNA メチル化が *CYP1* 遺伝子のプロモーター領域のみならず、AhR が結合するエンハンサー領域にも影響を与え、発現誘導の応答性を変動させるメカニズムが存在することを推測させる。ここで、各 *CYP1* 遺伝子のエンハンサー領域に存在する XRE 配列（5'-CACGC-3'、相補配列 5'-GCGTG-3'）には、DNA メチル化の標的となる CpG 配列が含まれることに着目した。今までに *CYP1* 遺伝子発現誘導に XRE 配列が必要であること（26 - 28）や、メチル化されている DNA に AhR が結合できないこと（29, 30）は既に報告されている。しかし XRE 上のメチル化が AhR の XRE への結合とその下流遺伝子発現誘導に与える影響はまだ見出されておらず、またこれらの報告はいずれも人工的な条件下での報告に留まっている。そこで本研究では、XRE 配列のメチル化が AhR との結合を阻害して発現誘導の応答性を減弱させるのではないかと仮説を立て、生細胞における自然なクロマチン状態にて解析する実験系の確立と、その実験系による検証を試みた。

第 1 章では、 β NF 曝露による *CYP1B1* 遺伝子の発現誘導に DNA 脱メチル化が与える影響を、ヒト肝臓がん細胞と肺がん細胞を対象に調べた。この結果をもとに、第 2 章では細胞間での *CYP1B1* 誘導の応答性の差異を、*CYP1B1* エンハンサー上の 8 箇所の XRE 配列のメチル化状態を調べ、DNA メチル化と *CYP1B1* 遺伝子発現誘導との関連が見出された XRE 配列に着目し、抗 AhR 抗体を用いた免疫沈降により AhR と結合した DNA を単離してそのメチル化状態を調べた。この手法は本研究において独自に考案したものであり、実際の細胞内で AhR による *CYP1B1* 遺伝子の発現誘導促進時の XRE のメチル化状態を明らかにすることができる。AhR がメチル化されていない XRE に選択的に結合することが証明されれば、転写調節領域内のメチル化状態により遺伝子発現誘導を制御する機構の存在が明らかとなる。第 3 章では、ヒト正常組織及びがん組織における *CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化状態を Gene Expression Omnibus（GEO）データベースより網羅解析データを入手して調べた。XRE のメチル化状態の個体間での変動度合いを明らかにし、*CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性の個体差の原因となる可能性を検証した。最後に第 4 章では、AhR リガンドの曝露では遺伝子発現の誘導が認められない *CYP2* および *CYP3* 遺伝子

を対象に、第 1 章と同様にして DNA 脱メチル化により誘導の応答性が変動するのかを調べた。これらの遺伝子の転写調節領域においても *CYP1* 遺伝子エンハンサーに存在する XRE と同配列である XRE 共通配列は存在し、もしこれらの配列が通常はメチル化されているのであれば、脱メチル化により AhR を介した発現誘導が確認できる可能性がある。

DNA メチル化状態はストレスなどの後天的な要因により変動する。遺伝子発現誘導に影響を及ぼす DNA メチル化のメカニズムを明らかにすることは、後天的な遺伝子発現誘導の応答性変動を予測することに役立てることができる。そして、遺伝子発現誘導に影響を及ぼす DNA メチル化状態の変動をもたらす因子を特定することで、その因子に曝露している患者において薬物代謝酵素の遺伝子発現変動を予測することができる可能性がある。それにより、患者背景に応じたテーラーメイド医療の実現に有用となることが期待される。また今回確立した手法が *CYP1B1* 遺伝子発現機構に留まらず、DNA メチル化と転写調節因子の機能との関連を解析するための有用な手法となることを期待する。

第1章 *CYP1* 遺伝子発現誘導の応答性に及ぼす DNA 脱メチル化の影響

1. 緒言

AhR のリガンドである β NF の曝露を受けた細胞では、AhR の XRE 配列への結合を介して *CYP1* 遺伝子などの発現が誘導される (4) . また、DNA メチル基転移酵素の阻害剤である DAC は、プロモーター領域を含むゲノム上の広範囲の脱メチル化を通して、がん抑制遺伝子に代表される多くの遺伝子の転写を促す (11 - 13) .

本章では、 β NF の曝露による *CYP1* 遺伝子発現誘導に与える DNA 脱メチル化の影響を、ヒト肝臓がんおよび肺がんの培養細胞を対象に調べた。特に DAC の前処理により、 β NF 曝露による遺伝子の発現誘導が増強した場合には、DNA メチル化が AhR 経路上で遺伝子発現誘導を抑制した可能性が考えられる。このような実験系は、AhR を介する *CYP1* 遺伝子発現誘導の応答性が XRE 配列のメチル化により制御される可能性を検証するために有用であると考えられる。

2. 材料および実験方法

2-1. 細胞培養および試薬

ヒト肝臓がん細胞株 HepG2 と HuH7 及びヒト肺がん細胞株 A549 (Japanese Cancer of Research Resources Bank : JCRB (Tokyo, Japan)) を 10 % ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO 68178, USA) および 1 % Antibiotic-Antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA 02451, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、37°C, 5 % CO₂ 存在下で培養した。また、ヒト肺がん細胞株 H2170 (JCRB) を、10 % FBS と 1% Antibiotic-Antimycotic を添加した Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、37°C, 5 % CO₂ 存在下で培養した。Phosphate buffered saline (PBS) , DAC は Sigma-Aldrich より、dimethyl sulfoxide (DMSO) と β NF は Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) より購入した。DAC は PBS を溶媒とし、 β NF は DMSO を溶媒とした。使用した他の試薬は、入手可能な最高純度のものを使用した。

2-2. 薬物処理および遺伝子発現量解析（定量的 PCR）

各細胞は、トリプシン処理後に計数し、 5×10^5 個の細胞を 60 mm ディッシュにて一晚培養した。薬物処理群は、溶媒コントロール（PBS もしくは DMSO）、 $10 \mu\text{M}$ （最終濃度） βNF 単独、 $0.5 \mu\text{M}$ （最終濃度）DAC 単独、 $0.5 \mu\text{M}$ DAC と $10 \mu\text{M}$ βNF 併用、のいずれかの薬物処理を行った。DAC は 72 時間の処理を行い、その間に 24 時間ごとに新鮮な培地とともに交換した。DAC と βNF を併用する場合は、72 時間の DAC 処理後に、培地を交換し βNF 処理を 4 時間を行った。各溶媒コントロール群および βNF 単独処理はそれぞれ 4 時間行った。 βNF の濃度、時間は予備実験により決定した。DAC の処理時間は、今回用いた細胞の倍加時間の 2 倍以上の時間である 72 時間とした。DAC の濃度は βNF との併用を想定し、また細胞の形態や増殖に顕著な影響が起きない濃度を設定した。

各薬物処理終了後、PBS により細胞を洗浄し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用い、RNA を回収した。すなわち、PBS 洗浄後、2-mercaptoethanol（Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation）を含んだ Buffer RLT を加えて細胞を溶解し、22 G 注射針を用い細胞分散液に含まれるゲノム DNA を細断し、スピンカラムへ移した。遠心分離後、DNase I（QIAGEN）を加え室温にて 15 分反応させ、その後 Buffer RW1、続いて 80 % エタノールにて洗浄し、カラムを数分間風乾させた。風乾後、カラム中の RNA を RNase free water により溶出し、分光光度計を用いて 260 nm 波長の吸光度を測定し RNA 量を算出した。回収した RNA は、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて、 $3 \mu\text{g}$ 相当の RNA から complementary DNA（cDNA）を合成した。合成した cDNA を用い、遺伝子発現量を FastStart Universal SYBR Green Master（ROX）kit（Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland）と ABI 7500 System（Thermo Fisher Scientific, Inc.）を使用した、定量的 PCR により測定した。*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *AHR*, *ARNT*, aryl hydrocarbon receptor repressor（AhRR）遺伝子である *AHRR* および $\beta\text{-actin}$ （*ACTB*）遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列を表 1 に示す。PCR の反応は、 60°C で 2 分、 95°C で 10 分の後、 95°C 15 秒、 60°C 1 分を 40 ～ 45 サイクルで行い、解離曲線により特異的な増幅産物を確認した。 $10 \mu\text{M}$ βNF を単独処理した HepG2 細胞より合成した cDNA を用いて 10 倍希釈系列を作成し、検量線法により各遺伝子の発現量を算出した。各遺伝子の発現量を *ACTB* 発現量により補正し（21）、PBS 処理群に対する発現量比で示した。同様の独立した実験を 3 回行い、上記の方法で算出した発現量比の平均値および標準偏差を評価した。

表 1. 遺伝子発現量解析に用いたプライマー配列

| Gene name | | Sequence (5' to 3') | Reference |
|----------------------|---------|--------------------------|-----------|
| <i>ACTB</i> | Forward | TCATGAAGTGTGACGTGGACATC | 31 |
| | Reverse | CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT | |
| <i>AHR</i> | Forward | ACATCACCTACGCCAGTCGC | 31 |
| | Reverse | TCTATGCCGCTTGGAAGGAT | |
| <i>ARNT</i> | Forward | GCTGCTGCCTACCCTAGTCTCA | 31 |
| | Reverse | GCTGTCCGTGTCTGGAATTGT | |
| <i>AHRR</i> | Forward | GTCAGTTACCTCCGGGTGAA | |
| | Reverse | TGGAAGCCCAGATAGTCCAC | |
| <i>CYP1A1</i> | Forward | CACCATCCCCACAGCAC | 31 |
| | Reverse | ACAAAGACACAACGCCCTT | |
| <i>CYP1A2</i> | Forward | AACAAGGGACACAACGCTGAAT | 32 |
| | Reverse | GGAAGAGAAACAAGGGCTGAGT | |
| <i>CYP1B1</i> | Forward | CGGCTGGATTTGGAGAACGTA | 31 |
| | Reverse | TTGATCCAATTCTGCCTGCACT | |

2-3. 統計解析

遺伝子発現量のデータについては、RStudio (ver. 1.2.5042 ; RStudio, Inc.) を用いた Levene 法により薬物処理間における 5 群の等分散性を確認したのち、2 群間の t 検定を行った。Shaffer 法 (33) により補正した p 値を用いて、補正 p 値 < 0.05 の場合に統計学的に有意な結果であるとし、* ($p < 0.05$) または ** ($p < 0.01$) で示した。

3. 結果

肝臓がん細胞における各薬物処理による *CYP1* 遺伝子発現量変化を図 3 に示す。

β NF 単独処理では、応答性は異なるものの全ての細胞、遺伝子の組み合わせにおいて遺伝子発現量の増加傾向が認められた（図 3，DMSO vs. β NF）。

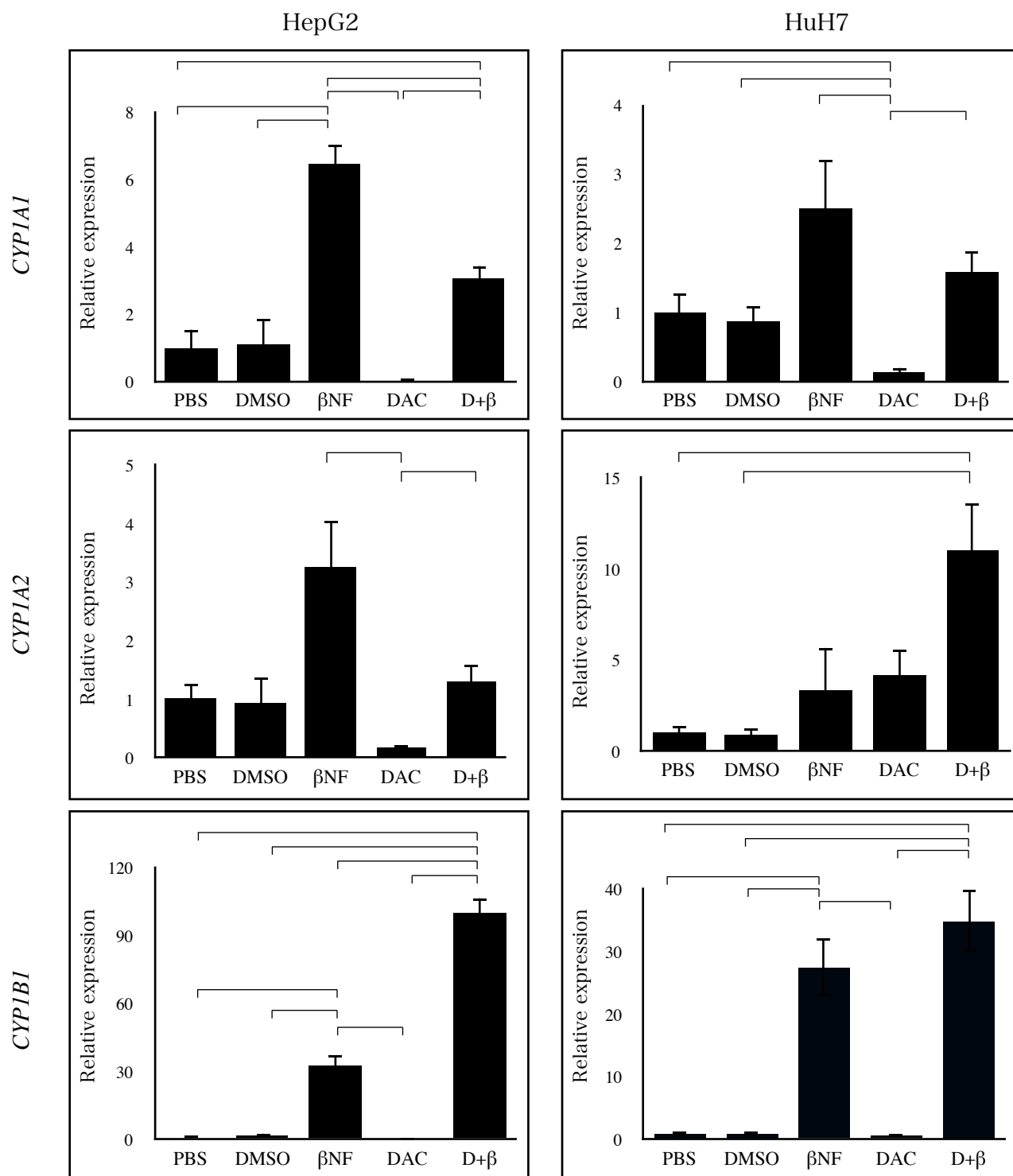


図 3. 肝臓がん細胞 2 種類（HepG2 細胞，HuH7 細胞）における，薬物処理による *CYP1A1*，*CYP1A2*，*CYP1B1* 遺伝子発現量。縦軸は PBS 処理群に対する mRNA 発現量の相対値を示し， $p < 0.05$ で統計的な有意差を表し，有意差が見られた組み合わせを角括弧（ \cap ）で示す。

DAC 単独処理で遺伝子発現量の増加傾向が認められたのは、HuH7 細胞における *CYP1A2* (4.17 倍 [$p=0.081$]) のみであり、それ以外では減少傾向が示された (HepG2 細胞における *CYP1A1* (0.025 倍 [$p=0.119$]) , *CYP1A2* (0.344 倍 [$p=0.258$]) , *CYP1B1* (0.243 倍 [$p=0.089$]) , HuH7 細胞における *CYP1A1* (0.129 倍 [$p=0.031^*$]) . HuH7 細胞における *CYP1B1* (0.656 倍 [$p=0.475$]) はこれらと比較し、顕著な変動は認められなかった (図 3 , PBS vs. DAC) . そのうち、 β NF との併用により遺伝子発現量の更なる増加が認められたのは、HepG2 細胞における *CYP1B1* (3.111 倍 [$p<0.01^{**}$]) と HuH7 細胞における *CYP1A2* (3.309 倍 [$p=0.176$]) であった (図 3 , β NF vs. D+ β) . 特に *CYP1B1* 遺伝子の発現誘導の増加は、DAC 単独処理による遺伝子発現の増強が検出されないことから、この遺伝子発現量の更なる増加には、ゲノム全体ではなく、AhR 経路上で起こる脱メチル化が大きく寄与することが示された.

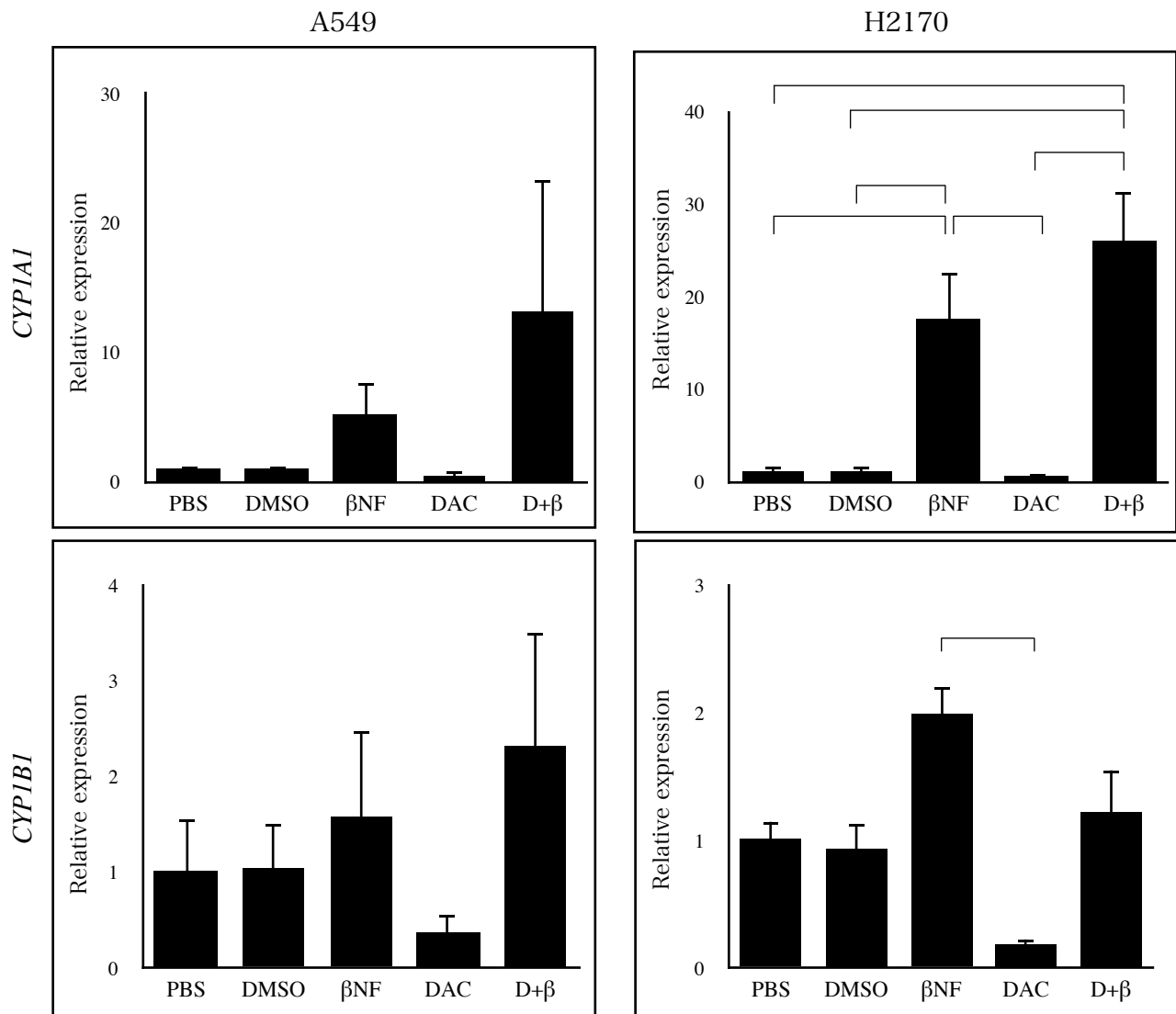


図 4. 肺がん細胞 2 種類 (A549 細胞, H2170 細胞) における、薬物処理による *CYP1A1*, *CYP1B1* 遺伝子発現量. 縦軸は PBS 処理群に対する mRNA 発現量の相対値を示し、 $p < 0.05$ で統計的な有意差を表し、有意差が見られた組み合わせを角括弧 (\neg) で示す.

肺がん細胞における各薬物処理による *CYP1* 遺伝子発現量を図 4 に示す。

肺がん細胞において *CYP1A2* 遺伝子は検出限界以下であった。 β NF 処理により *CYP1A1* 遺伝子の発現の増強傾向が示されたが、*CYP1B1* 遺伝子の顕著な誘導は検出されなかった（図 4, DMSO vs. β NF）。これら遺伝子発現について、DAC 単独処理での誘導（図 4, PBS vs. DAC）あるいは DAC の前処理による β NF による発現誘導の増強は検出されなかった（図 4, β NF vs. D+ β ）。このことから、これらの肺がん細胞においては AhR 経路上での DNA メチル化の関与が小さいと考え、以降の解析を肝臓がん細胞株を対象に行った。

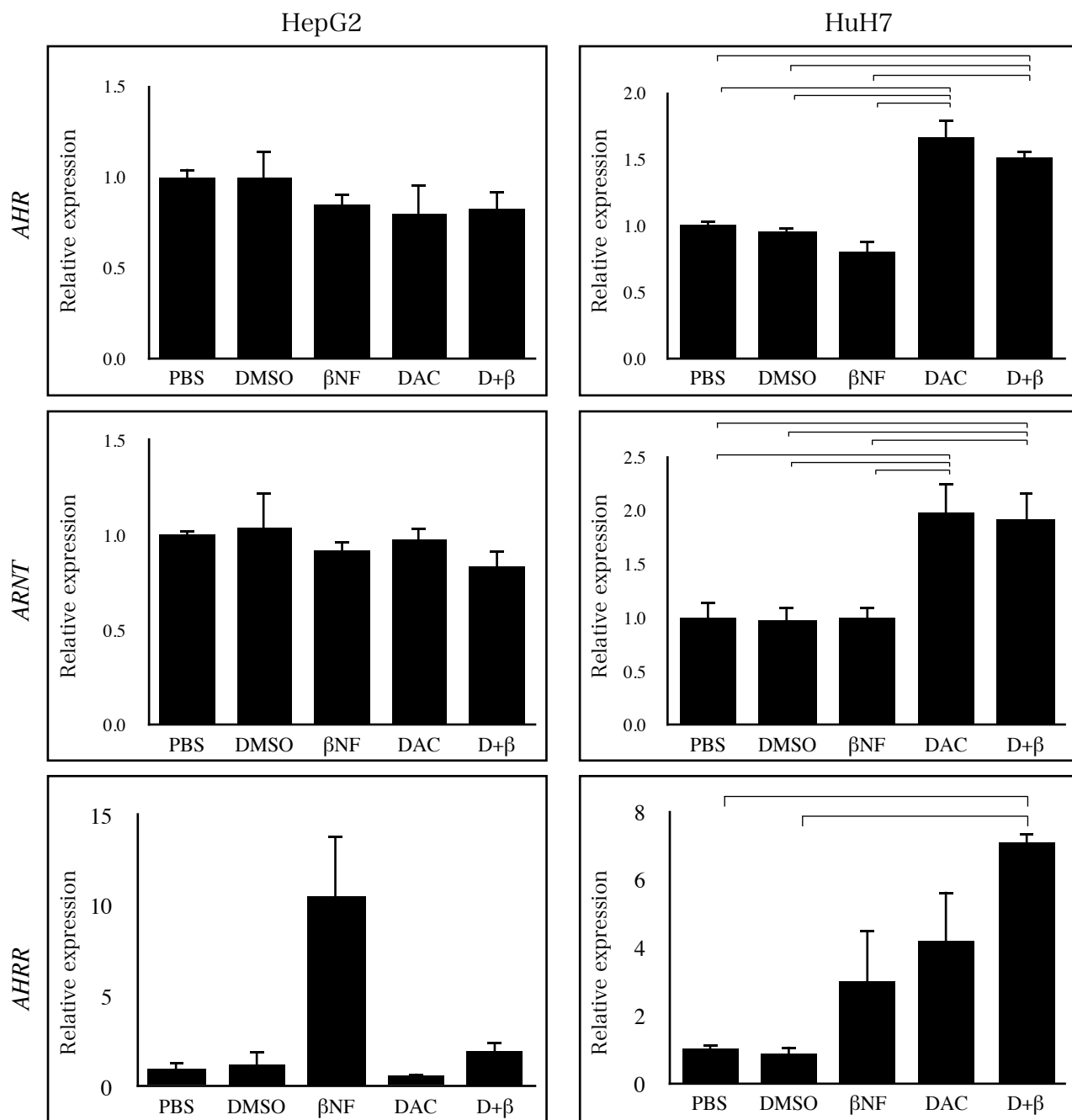


図 5. 肝臓がん細胞 2 種類（HepG2 細胞, HuH7 細胞）における、薬物処理による *AHR*, *ARNT*, *AHRR* 遺伝子発現量。縦軸は PBS 処理群に対する mRNA 発現量の相対値を示し、 $p < 0.05$ で統計的な有意差を表し、有意差が見られた組み合わせを角括弧（ \cap ）で示す。

肝臓がん細胞における各薬物処理による *AHR*, *ARNT* および *AHRR* 遺伝子発現量の変化を図 5 に示す. *AHR*, *ARNT* 遺伝子発現量は, DAC 処理で HuH7 細胞でのみ増加したが (*AHR* : 1.67 倍 [$p < 0.01^{**}$], *ARNT* : 1.52 倍 [$p < 0.01^{**}$] : 図 4 , PBS vs. DAC), β NF による発現変動がさらに増強されることはなかった (図 5 , DAC vs. D+ β). *AHRR* 遺伝子発現量は, 両細胞とも β NF 単独処理で上昇傾向が認められた. 一方で, HuH7 細胞においては DAC 処理により遺伝子発現上昇が認められたが, HepG2 細胞では DAC 処理による HuH7 細胞のような遺伝子発現変動は検出されなかった.

4. 考察

DAC による DNA 脱メチル化では, がん抑制遺伝子をはじめとする多くの遺伝子発現量は上昇傾向を示す (34). また DAC は, AhR リガンドによる遺伝子発現誘導の増強を引き起こすことも報告されている (23, 25). そこで本章では, そのメカニズムを明らかにするために, AhR 経路を介した遺伝子発現誘導が DNA 脱メチル化により増強されるモデル系を, ヒト肝臓がんおよび肺がん細胞を対象に探索した. 今回用いた肝臓がん細胞および肺がん細胞では, *CYP1* 遺伝子発現量の変化を指標としたとき, DAC あるいは β NF の曝露に対する応答性の違いが認められた. 今回の結果より, HepG2 細胞においては, DAC と β NF の併用時に β NF 単独処理と比べ *CYP1B1* 遺伝子発現量が増加することが明らかとなった (図 3). この遺伝子発現の誘導は DAC 単独処理では引き起こされないことから, この DNA メチル化は AhR リガンドによる遺伝子発現誘導を AhR 経路上で抑制すると考えられた. しかし, 今回用いた DAC による効果はゲノム上広範囲に非特異的な脱メチル効果を引き起こすため, *CYP1B1* 遺伝子発現誘導に影響を及ぼす DNA メチル化の具体的な作用点はまだ明らかとされていない. そこで, AhR/ARNT 複合体の認識配列である XRE 配列に DNA メチル化の標的となる CpG 配列が含まれることに着目し,

「XRE 上のメチル化が AhR/ARNT 複合体の結合を妨げることで *CYP1B1* 遺伝子発現誘導を抑制する」ことを仮説とし, 次章ではその仮説の検討を行った.

今回の検討で *CYP1A* 遺伝子の発現量の低下も検出された場合も認められた (図 3. PBS vs. DAC). その理由として, 次の二つのメカニズムが関与する可能性が考えられた.

第一のメカニズムは, AhR 経路において遺伝子発現を負に制御するリプレッサー因子である AhRR の関与である. AhRR もまた, 核内にて ARNT と二量体を形成し, 標的遺伝子の XRE 配列へと結合することで, AhR/ARNT 複合体と競合する形で遺伝子発現の抑制に寄与する (35). *AHRR* 遺伝子は, 喫煙によるプロモーター領域の DNA メチル化状態の変動が報告され

ており（15），このことから *AHRR* 遺伝子の発現そのものが DNA 脱メチル化による遺伝子発現変動を受け得ることが予想される．従って，DAC 処理による DNA 脱メチル化が *AHRR* 遺伝子発現量を増加させ，*CYP1* 遺伝子発現低下につながる可能性が考えられる．しかし，HuH7 細胞においては DAC と β NF の併用により *AHRR* 遺伝子発現の増加傾向が認められたが，HepG2 細胞では認められなかった（図 5）．一方で，HuH7 細胞における *CYP1A2* 遺伝子は，DAC と β NF の併用により遺伝子発現誘導の増強が認められている．これは *AHRR* の発現増強により *CYP1* 遺伝子発現が抑制されるという仮説と矛盾する結果となる．また HepG2 細胞においてもまた，*CYP1* 遺伝子の発現低下を説明できるような *AHRR* の遺伝子発現変動は検出されなかった．このことから，DNA 脱メチル化による *CYP1* 遺伝子の発現抑制は *AHRR* 遺伝子の発現変動では説明できず，本研究では DAC による *CYP1* 遺伝子の発現低下と *AhRR* の関係は見出されなかった．

第二のメカニズムは，*CYP1* 遺伝子プロモーター領域に存在するサイレンサーの関与である．例えば，ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（*hTERT*）遺伝子はプロモーター領域中のサイレンサーへ，Krüppel-like factor2（*KLF2*）が結合することで遺伝子発現が抑制されるが，そのプロモーター領域のメチル化により *KLF2* が結合できなくなった場合，遺伝子発現の抑制が引き起こされない（36）．このことは，プロモーター領域の脱メチル化によりサイレンサー因子の結合が誘導され，遺伝子発現の抑制が引き起こされる可能性を示している．*CYP1* 遺伝子におけるサイレンサーの関連が見出される報告はないが，*KLF2* 結合配列である 5'-GCGGCGCG-3' 配列は見出される．今回の結果も，脱メチル化を契機としたサイレンサーへの転写調節因子の結合誘導が *CYP1* 遺伝子発現の抑制を導いた可能性も考えられる．

CYP1B1 遺伝子の高発現が認められている肺がん由来の培養細胞である A549 細胞ならびに H2170 細胞においては，*CYP1B1* 遺伝子発現誘導における DNA メチル化の影響は検出されなかった（図 4）．また，同じく高発現が認められているホルモン感受性細胞由来がん細胞である MCF-7 細胞においてもまた，*CYP1B1* 遺伝子発現誘導における DNA メチル化の影響は認められていない（23, 25）．これらの根拠に基づき，次章では肝臓がん細胞をモデルとして，*CYP1B1* 遺伝子発現誘導における DNA メチル化の役割を検証した．

第2章 DNA メチル化により *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性が制御される XRE 配列の探索とメカニズムの解析

1. 緒言

前章では、 β NF 曝露による *CYP1B1* 遺伝子の発現誘導の応答性が DNA 脱メチル化により増強されることを HepG2 細胞において確認した。このような応答性の変化は HuH7 細胞では認められないため、両細胞の間に検出された *CYP1B1* 遺伝子の XRE 配列上のメチル化状態の差異が、異なる発現誘導の応答性を示す原因となった可能性がある。

そこで本章では、*CYP1B1* 遺伝子の転写調節領域に見出されている 8 箇所の XRE (XRE1 ~ XRE8) のメチル化状態を両細胞で比較し、メチル化状態により応答性の違いを説明し得る XRE を探索した。応答性との関連が推測された XRE については、従来の chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法を改良した cleavage under target & release using nuclease (CUT&RUN) 法 (37) を用いて AhR と結合した XRE を分離・回収し、そのメチル化状態を解析した。免疫沈降物を対象に DNA メチル化解析を行うこの手法は本研究に独自の新しい手法である。

2. 材料および実験方法

2-1. 細胞培養および試薬

第 1 章, 2-1 (8 ページ) 参照

2-2. 培養細胞内の *CYP1B1* エンハンサー中の各 XRE のメチル化状態の解析

通常培養条件下 (本章 2-1) の HepG2 細胞および HuH7 細胞より、NucleoSpin Tissue (Takara Bio) を用いてゲノム DNA を回収、精製した。DNA回収後、DNA 2 μ g 相当を EpiTect Fast Bisulfite kit (QIAGEN) を用いて、DNA 中の非メチル化シトシンをウラシルへと変換した。バイサルファイトによる変換は、キットの推奨プロトコルに従った。バイサルファイトにより変換された DNA に対し、Epitaq™ HS (Takara Bio) を用いた PCR による増幅を行った。PCR は表 2 に示すプライマーを用いて、*CYP1B1* 遺伝子上流の XRE1 ~ 8 を含むように 5

領域に分けて行った。PCR はサーマルサイクラーを用いて、94 °C で 5 分の後、94 °C で 30 秒、55 °C ～ 60 °C で 30 秒、72 °C で 30 秒 を 35 サイクル行い、72°C で 7 分処理後 4 °C にて保存した。増幅した断片を、Agarose ME (Iwai Chemicals Company, Tokyo, Japan) と TAE Buffer を使用した 2 % アガロースゲルにて電気泳動を 60V で 60 分行い、ethidium bromide (SIGMA) により染色して検出した。検出された断片をアガロースゲルより切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio) により回収、精製した。精製された各断片の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いたサンガー法に従い、ABI 3130xl DNA sequencer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) および、ABI Sequence Scanner (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により解析した。シーケンス解析に用いられたプライマーは、PCR にて用いられたプライマーと同配列のものを用いた (表 2) 。 DNA メチル化状態はシーケンス波形データにおけるメチル化シトシン (C) と非メチル化シトシン (T) のピーク面積の比により 4 段階に分類した (fully methylated (C only) , highly methylated (C > T) , lowly methylated (C < T) , rarely methylated (T only)) 。 シーケンス解析により解読できなかった XRE 配列については、COBRA 法 (本章 2-4 (19 ページ) 参照) にてメチル化状態を決定した。

表 2. DNA メチル化解析に用いたプライマー配列

| Gene name | | Sequence (5' to 3') | Annealing temperature |
|-------------------------------------|---------|---------------------------|-----------------------|
| <i>CYP1B1_XRE1</i> | Forward | CTTTCRAAAAACAACTCAAATC | 55 °C |
| | Reverse | TTATTAGTAGGTTTTTATGGGAG | |
| <i>CYP1B1_XRE2/XRE3</i> | Forward | GYGTGTTAGGTGTYGTGAGAA | 60 °C |
| | Reverse | AAAAACRAATCTCCRCRCTCC | |
| <i>CYP1B1_XRE4/XRE5/XRE6</i> | Forward | GATYGTAAGYGYGTTTAGGAAGATT | 55 °C |
| | Reverse | CCAATCATATCCCTAAACRCTACCT | |
| <i>CYP1B1_XRE7</i> | Forward | ATGTGAAGGATTTGGAGTGGGA | 60 °C |
| | Reverse | CCCTACACTTTAAACTCCACTC | |
| <i>CYP1B1_XRE8</i> | Forward | GTTATGTTGGTTAGGTTGGTTTYGA | 60 °C |
| | Reverse | AAACAACCCTACACTTTAAACTCCA | |

2-3. CUT&RUN を用いた免疫沈降法による AhR 結合 DNA の回収

HepG2 細胞および HuH7 細胞は、トリプシン処理後に計数し、 1×10^5 個の細胞を 90 mm ディッシュにて一晚培養した後、薬物を添加した。薬物処理は、 $10 \mu\text{M}$ βNF 単独群および $0.5 \mu\text{M}$ DAC と $10 \mu\text{M}$ βNF 併用群を用意し、それぞれの薬物処理は第 1 章、2-2 (9 ページ) に従った。

薬物処理後、AhR が結合した XRE 配列を回収するために、抗 AhR 抗体を用いた CUT&RUN 法を行った。CUT&RUN 法は、CUT&RUN Assay Kit (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA 01923, USA) を使い、抗 AhR 抗体は AhR (D5S6H) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology Inc.) を使用した。免疫沈降はキットの推奨プロトコルに従い、抗 AhR 抗体とポジティブコントロール抗体 (Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology Inc.) は 33 倍希釈 (抗体 $3 \mu\text{L}$ / サンプル量 $100 \mu\text{L}$) , ネガティブコントロール抗体 (Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control (CUT&RUN), Cell Signaling Technology Inc.) は 20 倍希釈 (抗体 $5 \mu\text{L}$ / サンプル量 $100 \mu\text{L}$) にて用い、 4°C にて 16 時間穏やかに回転して反応させた。同時に、抗体処理を行わない対照群をインプット DNA として回収し、推奨プロトコルに従い Sonifer® S-250D advanced (EMERSON, Tokyo, Japan) を用いた超音波破碎により DNA を断片化した。抗体処理後の DNA ならびにインプット DNA 断片の回収はプロトコルに従った。回収した DNA 断片は、DNA Purification Buffer and Spin Columns (Cell Signaling Technology Inc.) を用いて精製した。バイサルファイト処理の効率を上げるため、回収した DNA 断片に対し Proteinase K (Takara Bio) 処理による反応を 55°C で 1 時間処理を行い (38) , TE Saturated Phenol (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) とクロロホルム (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を 1:1 で混合したものを加え混和し、 $13,000 \times g$ で 2 分間遠心分離し、上層を回収した。その後、Dr. GentLE® Precipitation Carrier (Takara Bio) を用いたエタノール沈殿により断片を精製した。精製した断片を、Epitaq™ HS (Takara Bio) または Tks Gflex™ DNA Polymerase (Takara Bio) を用いた PCR により増幅した。PCR に用いたプライマー配列を表 3 に示す。PCR は、 94°C で 5 分の後、 94°C で 30 秒、 60°C もしくは 62°C で 30 秒、 72°C で 30 秒を 38 サイクル行い、 72°C で 7 分処理後 4°C 保存とした。PCR 産物は、2 % アガロースゲルにて電気泳動を 60 V で 60 分で行い、ethidium bromide (SIGMA) により染色して検出した。

表 3. 免疫沈降 DNA の増幅に用いたプライマー配列

| Gene name | | Sequence (5' to 3') | Annealing temperature |
|-------------------------|---------|---------------------------|-----------------------|
| <i>CYP1B1_XRE1</i> | Forward | AGCGGCCCGGGCAGGTTGTA | 60°C |
| | Reverse | ATTGTGCGGTAACCGCGCTTCA | |
| <i>CYP1B1_XRE2/XRE3</i> | Forward | GGCAGCGCCCAGGGATATGACTGGA | 62 °C |
| | Reverse | CGGAGAGTGGCAGGAGGAGGCGAAT | |

2-4. 免疫沈降物を対象とした XRE2/XRE3 配列のメチル化状態の解析

本章 2-3 (18 ページ) で精製した DNA 断片に対し, EpiTect Fast Bisulfite kit (QIAGEN) を用いてバイサルファイト処理を行った. バイサルファイト処理後の DNA を本章 2-2 (16 ページ) と同様に Epitaq™ HS (Takara Bio) を用い, *CYP1B1* 遺伝子の XRE2/XRE3 領域 (表 2) を PCR により増幅した後, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法を用いてメチル化解析を行った. PCR 産物を, 制限酵素 HpyCH4IV (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) により, 37 °C で 4 時間以上反応させ切断した. 処理後, 3% アガロースゲルにて, 電気泳動を 60 V で 80 分を行い, ethidium bromide (SIGMA) により染色して検出した. COBRA 法では, バイサルファイト処理後の PCR で生じるメチル化 XRE に由来する 5'-TACGT-3' 配列と, 非メチル化 XRE に由来する 5'-TATGT-3' 配列の違いを制限酵素による切断の有無で判定した (39) (図 6) .

バイサルファイト処理後に XRE2/XRE3 領域を増幅した上記の沈降 DNA およびインプット DNA については, COBRA 法とは別に TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて pCR4-TOPO vector に組み込み, 大腸菌 TOP10 株に導入しクローニングした. 組み込みを行った大腸菌は, Bacto™ Tryptone, Bacto™ Yeast Extract, Bacto™ Agar (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) と NaCl (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) および 50 μg/mL ampicillin (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) により構成された LB 寒天培地に播種し, 37 °C で 12 時間から 18 時間培養した. LB 培地での培養後, 10 個以上のコロニーをそれぞれ TE Buffer 中に回収し, 100 °C で 1 分加熱した後, 氷上へ静置し, 20,400 ×g で 3 分間遠心分離し, 上清を回収した. 回収した DNA を鋳型として, M13 プライマー (forward : 5'-GTAAAACGACGGCCA G-3', reverse : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') と Epitaq™ HS (Takara Bio) を用いて増

幅した。PCR は、94 °C で 5 分 の後、94 °C で 30 秒 , 55 °C で 30 秒, 72 °C で 30 秒を 30 サイクル行い、72°C で 7 分処理後 4 °C で保存した。PCR 産物は 2 % アガロースゲル上で電気泳動を 60V で 60 分行い、ethidium bromide により染色して検出した。検出された断片をゲルより切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio) により回収、精製した。各断片の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いたサンガー法により、ABI 3130xl DNA sequencer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) と、ABI Sequence Scanner (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により解析した。シーケンス解析に用いたプライマーは M13 プライマーを用い、解析はキットの推奨プロトコルに従った。

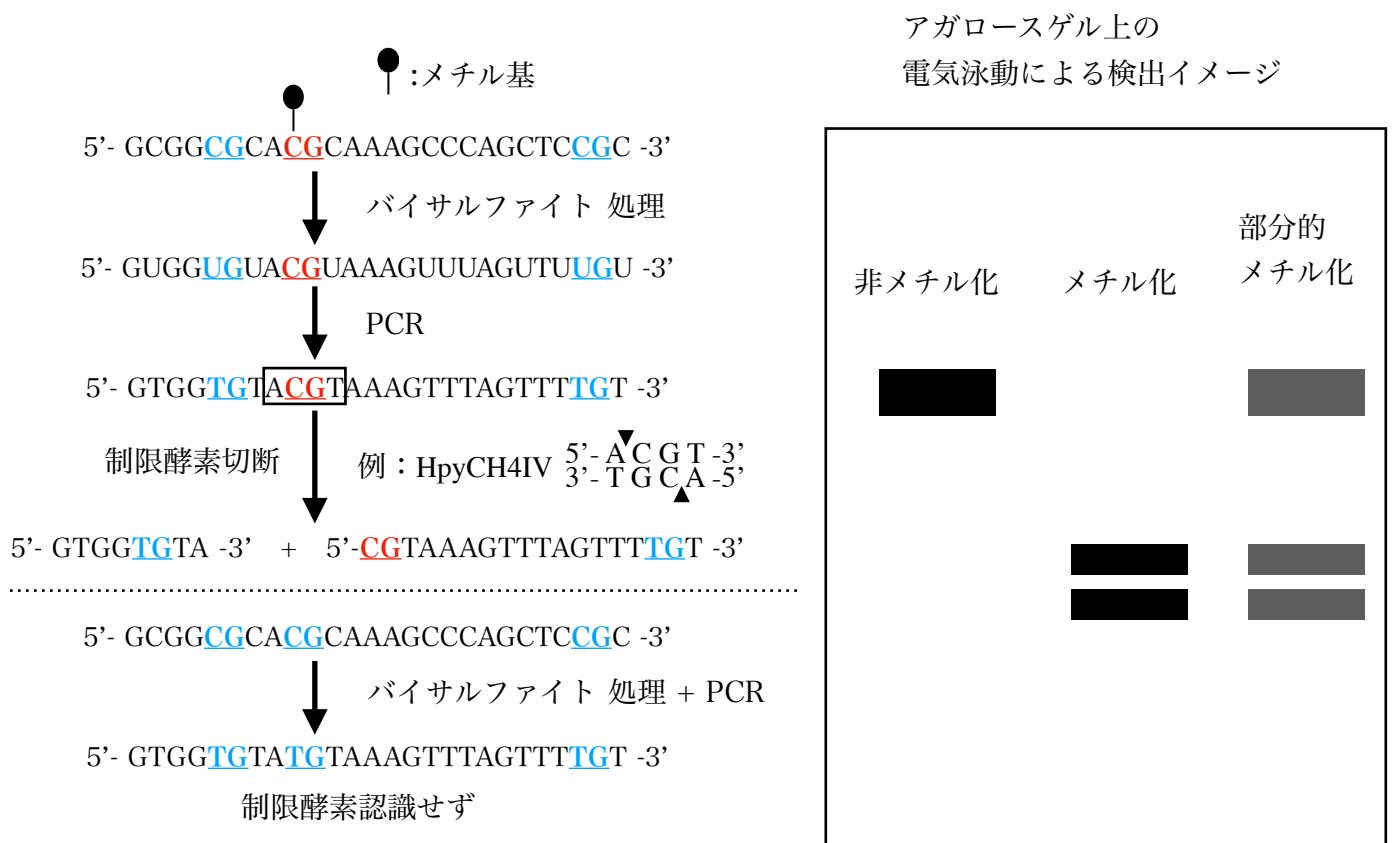


図 6. COBRA法による DNA メチル化状態の検出原理

3. 結果

3-1. ゲノム DNA を対象とした *CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化状態の解析

HepG2 細胞, HuH7 細胞における *CYP1B1* 遺伝子上流の 8 箇所の XRE 上のメチル化状態を図 7 に示す.

薬物処理をしていない HepG2 細胞と HuH7 細胞においてメチル化状態の違いが検出されたのは, XRE1, XRE2, XRE3 であった. XRE4, XRE5, XRE6 においては, 両細胞においてメチル化が検出されず, XRE7 および XRE8 は両細胞間で同程度のメチル化が検出された (図 7). 以上より, HepG2 細胞と HuH7 細胞との間で検出された XRE1, XRE2, XRE3 のメチル化状態の差異が, DAC と β NF の併用時の *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の強弱に寄与する可能性が推測された.

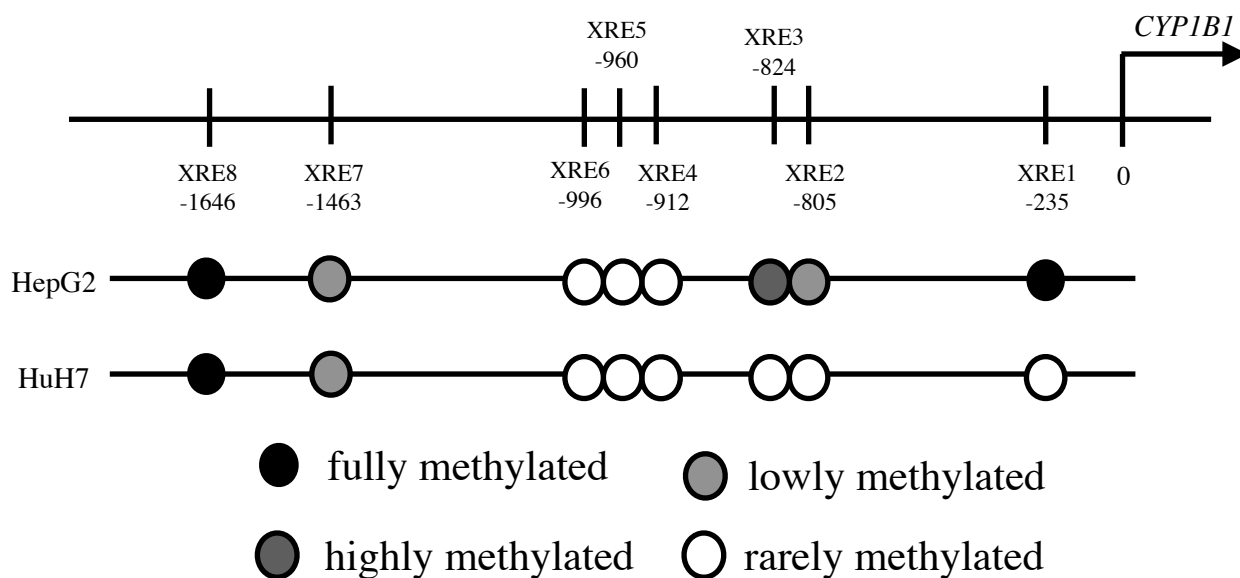


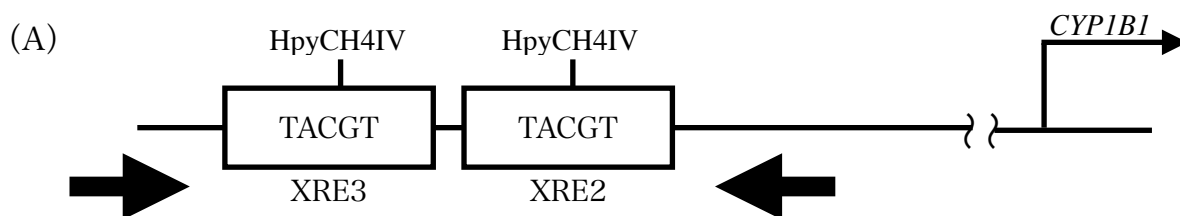
図 7. ヒト *CYP1B1* 遺伝子上流の XRE 配列の位置および, HepG2 細胞と HuH7 細胞における各 XRE 中の CpG 配列のメチル化状態.

各 XRE の位置関係と転写開始地点からの距離を数字で示す. 各 XRE のメチル化状態はバイサルファイト処理された細胞由来のゲノムのダイレクトシーケンスにより解析された. DNA メチル化状態はシーケンス波形データにおけるメチル化シトシン (C) と非メチル化シトシン (T) のピーク面積の比により 4 段階に分類した (fully methylated (C only), highly methylated (C > T), lowly methylated (C < T), rarely methylated (T only)).

3-2. 免疫沈降物を対象としたメチル化状態の解析

HepG2 細胞と HuH7 細胞間でメチル化状態の差異が検出された XRE1, XRE2 及び XRE3 を対象に, XRE 上のメチル化が AhR の結合に影響を及ぼすのかを解析した. そのために, 抗 AhR 抗体を用いた免疫沈降法により, AhR が結合した DNA 断片を回収した. 免疫沈降法により得られた沈降 DNA に XRE2/XRE3 領域の配列が含まれていることを確認したが, XRE1 を含む領域は確認されなかった (データ非公開). 故に解析対象を XRE2/XRE3 領域とし, 免疫沈降により得られた DNA (IP (+)) および対応するインプット DNA (IP (-)) を対象にバイサルファイト処理を行い, COBRA 法により, XRE2/XRE3 の DNA メチル化状態を評価した. COBRA 法により解析した領域と制限酵素 HpyCh4IV で切断される部位を図 8A に, COBRA 法による XRE 配列のメチル化状態の解析結果を図 8B に示す. HepG2 細胞において, インプット DNA ではメチル化 XRE に由来する, 切断され短くなった DNA 断片が一部検出されたが, 抗 AhR 抗体による沈降 DNA では検出されなかった (図 8B, HepG2 β NF, IP (-) vs. IP (+)). また, HepG2 細胞のインプット DNA で検出された切断された DNA 断片は, DAC 処理により減少することも示された (図 8B, β NF IP (-) vs. DAC + β NF IP (-)). 一方, HuH7 細胞ではインプット DNA ならびに沈降 DNA 両方で切断された DNA 断片は認められなかった (図 8B, HuH7 β NF). 各細胞におけるインプット DNA から検出されたメチル化状態は, 図 7 に示された XRE2/XRE3 領域の DNA メチル化の解析結果と一致した. 同時に, AhR が結合する XRE はメチル化されていない状態であることが明らかとなった.

XRE2/XRE3 およびその周囲の CpG 配列上のメチル化状態を詳細に検出するために, 大腸菌を使用してクローニングを行い, 単コピーごとの配列解析を行った. 図 9A に配列解析を行った領域上の CpG 配列の位置を, 図 9B にバイサルファイト処理後の XRE 上のメチル化および非メチル化状態におけるシーケンス波形を, 図 9C に各クローン上のメチル化状態を示す. HepG2 細胞において, インプット DNA 上では XRE3 上の CpG 配列は 10 クローン中 8 クローンにメチル化が認められ, XRE2 上の CpG 配列は, 10 クローン中 3 クローンにメチル化が検出された. 一方, 抗 AhR 抗体による沈降 DNA では, 周囲の CpG 配列でのメチル化が検出されたが, 両 XRE 配列上の CpG は全てのクローンで非メチル化状態を示した. HuH7 細胞においては, 沈降の有無に関わらず XRE2 と XRE3 双方にメチル化は検出されなかった (図 9C). これらの結果は COBRA 法による解析結果 (図 8B) と一致した.



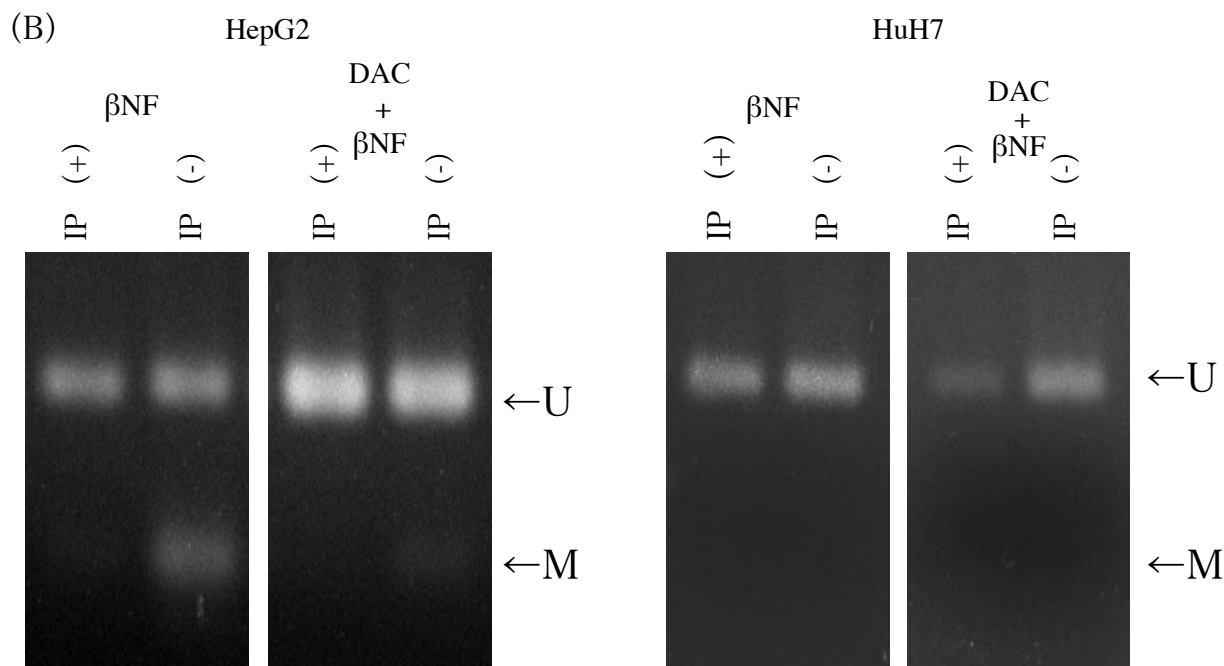


図 8. HepG2 細胞, HuH7 細胞における COBRA 法による *CYP1B1* XRE2/XRE3 上のメチル化状態の解析.

(A) バイサルファイト処理を受けた免疫沈降断片の PCR による解析領域. *CYP1B1* エンハンサー領域に位置する XRE のうち, XRE2 と XRE3 を含む領域を増幅した. 矢印がプライマーの位置を示し, 各 XRE 上に制限酵素 HpyCH4IV による切断領域を示す. バイサルファイト処理により, メチル化されていないシトシンはウラシルへと変換され, メチル化されているシトシンは変換されない. PCR によりウラシルはチミンへと変換され, XRE 上の 5 塩基のうちの 3 塩基目のシトシンがメチル化されている場合は図で示した配列となり, 制限酵素 HpyCH4IV の認識配列となる.

(B) HepG2 細胞, HuH7 細胞における CUT&RUN 法により得られた断片の COBRA 法による XRE2/XRE3 の DNA メチル化解析の結果. βNF 単独処理時ならびに DAC と βNF の併用時の抗 AhR 抗体による沈降物および対応するインプット DNA を バイサルファイト処理し, PCR により増幅した. 増幅された断片を制限酵素 HpyCH4IV で処理し, 3 % アガロースゲルによる電気泳動後, ethidium bromide により検出した. IP (+) または (-) は抗 AhR 抗体による沈降の有無を示す. 図上の M はメチル化時に検出される断片であり, U は非メチル化時に検出される断片を示す.

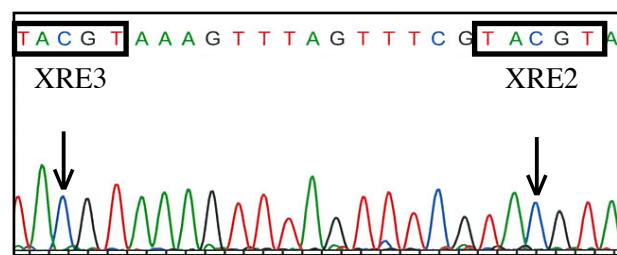
(A)

5' cgccaagggt ggtggtggcc ggcacccac
 cctcggccgc cgcctccgcg tgtcaggtgc
 cgtgagaagc gcgggaggag cggccgcagg
 cagcgcccag ggatatgact ggagccgact
 ttccagaagc **ggcg** **cacgca** aagcccagct
ccg **cacgca** aa aggggaggcg acagcagaaa
 cttcaaccgc ataaagtctc cgggagcgcg
 gagattcgcc tcctcctgcc actctccgcc 3'

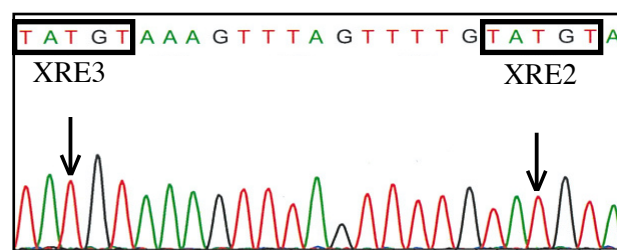
→*CYP1B1*

(B)

Methylated XRE



Unmethylated XRE



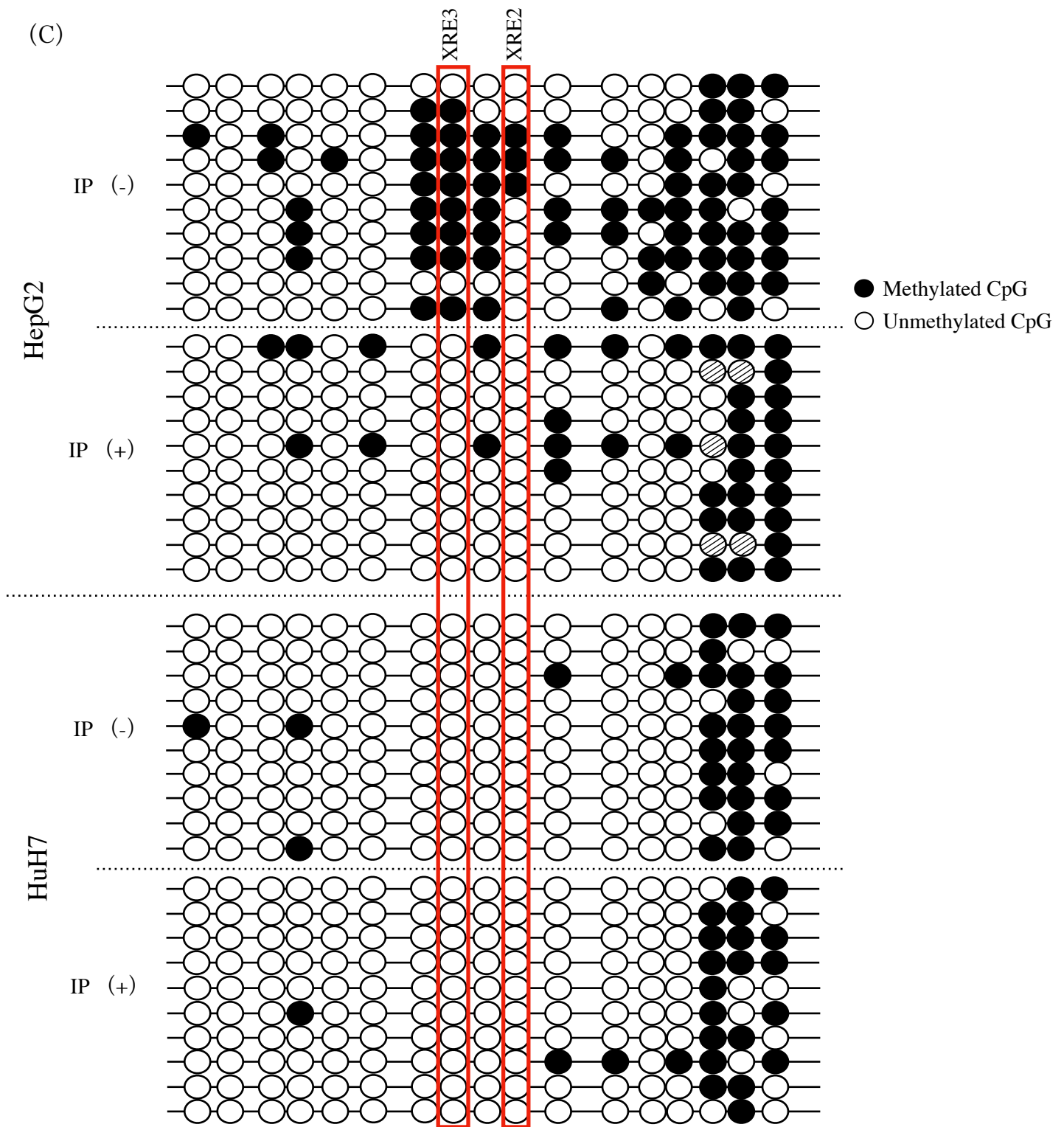


図 9. HepG2 細胞, HuH7 細胞における, シークエンス解析による *CYP1B1* XRE2/XRE3 およびその近傍のメチル化状態の解析.

(A) *CYP1B1* XRE2/XRE3 およびその周囲の塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank, NG_00836). シークエンス解析を行った領域を下線で, 領域中の CpG 配列を太字で示す.

(B) バイサルファイト処理された XRE およびその近傍のシークエンス波形. ABI 3130xl DNA sequencer により検出されたシークエンス結果を図に示す. XRE 配列がメチル化されている代表的なシークエンス結果を Methylated XRE に, メチル化されていない代表的なシークエンス結果を Unmethylated XRE に示す.

(C) HepG2 細胞, HuH7 細胞における XRE 2 と XRE 3 およびその近傍の 17 箇所の CpG 配列上の DNA メチル化状態. 抗 AhR 抗体による沈降あり (IP (+)) と抗体処理なし (IP (-)) における各 CpG 配列のメチル化状態を示した. メチル化 CpG を ● で, 非メチル化 CpG を ○ で, 判別できなかった CpG を ⊗ で示した.

4. 考察

第 1 章より、AhR 経路の活性化による *CYP1B1* 遺伝子発現の誘導は、DNA メチル化の影響を受けることが示唆されたが、その詳細なメカニズムは明らかではなかった。HepG2 細胞において、5 μ M の DAC による *CYP1B1* 遺伝子プロモーター上の脱メチル化が、遺伝子発現の上昇に影響を及ぼしていることが報告されている (23) が、さらに低濃度 (0.5 μ M) の DAC を用いた本研究の条件では、DAC 単独処理による *CYP1B1* 遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 3)。一方でこの低濃度の DAC は β NF の併用による *CYP1B1* 遺伝子発現誘導をさらに増強させた。そこで本研究では、AhR リガンドによる *CYP1B1* 遺伝子発現誘導におけるメチル化の役割を探索した。そして、AhR/ARNT 複合体が認識する XRE 配列に着目し、XRE 配列に含まれる CpG 配列の DNA メチル化が AhR/ARNT の XRE の結合に影響するのではないかと仮説を立てた。

CYP1B1 遺伝子には、エンハンサー上に 8 箇所の XRE が確認され、*CYP1B1* 遺伝子発現および誘導には、そのうち XRE2, XRE3, XRE4, XRE5 および XRE6 の関与が報告されている

(26)。今回の結果より、XRE4, XRE5 および XRE6 は HepG2 細胞および HuH7 細胞いずれにもメチル化は検出されなかったため、両細胞を対象にこれらの遺伝子発現誘導における XRE のメチル化の影響を評価することはできなかった (図 7)。HepG2 細胞と HuH7 細胞の両細胞間でメチル化状態の差異が認められたのは、XRE1, XRE2 および XRE3 であった。しかし XRE1 は、DAC による DNA 脱メチル化後であっても、免疫沈降による XRE1 断片が得られなかった (データ非公開)。このことから、XRE1 では AhR が結合しないことが示されたため、今回の解析の対象として XRE1 を除外した。実際に、XRE1 は *CYP1B1* 遺伝子発現への影響が限りなく小さく、また AhR/ARNT が結合しないことも報告されている (26, 27)。よって、今回は両細胞間でメチル化状態が異なり、一部がメチル化されていた XRE2 および XRE3 を解析対象とした。XRE2 は遺伝子の恒常的な発現に寄与し、XRE3 は遺伝子発現誘導への寄与と AhR の結合が報告されている (27)。今回の結果より、XRE2 と XRE3 は HepG2 細胞で一部メチル化が認められたが、HuH7 細胞において認められなかった (図 7)。これらのメチル化状態は、DAC と β NF 併用時の *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性の差異を説明可能であり、DAC による XRE2 と XRE3 のメチル化の解除が、 β NF による *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の増強に寄与していることを強く示唆する結果であった。

本章では、XRE2/XRE3 上のメチル化が AhR の結合に影響を及ぼすか解析した。そのために、 β NF 処理を受けた細胞において、AhR が結合した XRE 配列を含む DNA 断片を抗 AhR 抗体を

用いた免疫沈降により回収し、それらの DNA メチル化状態を検出した。COBRA 法により、HepG2 細胞において、インプット DNA からは XRE 上の部分的なメチル化が検出されたが、AhR が結合した XRE からはメチル化が検出されなかった（図 8B. HepG2 β NF IP (-) vs. IP (+)）。また、インプット DNA より検出されたメチル化 DNA は、DAC 処理により減少することも示された（図 8B. β NF IP (-) vs. DAC + β NF IP (-)）。これは、DAC によりメチル化されていない DNA が増え、バイサルファイト処理後でも制限酵素により切断される DNA 配列が減少したことに起因する。故に、本研究における DAC による DNA 脱メチル化効果は十分であったことが示された。それに対し HuH7 細胞では、沈降の有無に関わらずメチル化は検出されなかった（図 8B. HuH7）。

クローン化により得たコピー単位でのシーケンス解析の結果もまた、COBRA 法による解析結果を裏付ける結果となった（図 9C）。加えて、各 XRE およびその周囲の CpG 配列のメチル化状態を個々に解析することができた。AhR が結合した断片由来のクローンでは、両 XRE 上の CpG は全てメチル化されていないが、XRE 以外の CpG のメチル化状態は免疫沈降の有無による顕著な差異は認められなかった。一方で、インプット DNA における XRE 上のメチル化状態は、一部がメチル化されているという COBRA 法による結果と一致した。この結果より、XRE 中の CpG のメチル化が、AhR/ARNT 複合体の結合に影響を及ぼしており、AhR はメチル化されていない XRE に選択的に結合することが強く示唆された。 β NF による *CYP1B1* 遺伝子発現誘導が、DNA 脱メチル化効果によりさらに増強が認められた背景には、*CYP1B1* エンハンサー上に複数存在する XRE のメチル化や、プロモーター領域の高メチル化状態が遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられ、それらの影響の相加あるいは相乗効果が、遺伝子発現誘導の増強として現れたと考えられる。

今回は抗 AhR 抗体を用いた CUT&RUN 法により、AhR が結合した XRE を選択的に回収したが、抗 AhR 抗体による沈降量は、薬物処理による遺伝子発現量変動のような顕著な差は認められなかった（データ非公開）。その理由として、次の 2 つが考えられる。

まず考慮すべき点は、Beedanagari らにより報告された、リガンドにより誘導された AhR のエンハンサー上での挙動と、それによる遺伝子発現変動との間に時間的な差異が認められる点である（23）。本報告では、*CYP1B1* エンハンサー上に結合する AhR 量は TCDD 曝露後 45 分～60 分をピークに増加した後急激に減少した後に再度同間隔で結合量が増加する。これはリガンドと会合した AhR がその後速やかに分解されることによるものであることが考えられる。一方で、TCDD による *CYP1B1* 遺伝子発現量はおよそ 48 時間をピークに増加を続けており、エンハンサー領域での AhR の結合量と遺伝子発現変動との間に差異が認められる。この差異は

AhR が結合した XRE の量と遺伝子発現量との相関性を明らかとすることを困難とした可能性がある。

次に考慮すべき点は、DAC による DNA 脱メチル化の影響は、ゲノム上で非特異的に広範囲で引き起こされる点である。DNA 脱メチル化により、*CYP1B1* 遺伝子上流の XRE 以外の AhR 結合配列への AhR の結合量も増加した可能性がある。故に、今回解析を行った XRE2/XRE3 への AhR の結合量が増加していたとしても、限られた抗体量ではその増加を正確に評価できない可能性があり、*CYP1B1* 遺伝子上流の XRE 配列への AhR の結合量を正確に定量するためには、今回の実験で用いた抗体量では不十分であった可能性を考慮する必要がある。非特異的なエピゲノム変動に伴う免疫沈降量の定量性の確保が課題として残るが、本手法は転写調節因子と DNA の結合に影響を及ぼす DNA メチル化状態の解析には極めて有用である。

第3章 ヒト組織における *CYP1B1* 遺伝子転写調節領域の DNA メチル化状態の解析

1. 緒言

前章では、 β NF による *CYP1B1* 遺伝子の発現誘導の過程において、AhR が非メチル化状態の XRE に選択的に結合することが明らかになった。このことから、XRE のメチル化状態により *CYP1B1* の遺伝子発現誘導の応答性が制御される可能性が推測された。これらの結果は培養がん細胞を対象に導かれたため、実際のヒト組織において XRE 配列のメチル化状態がどの程度変動するのかは大変興味深い。*CYP1B1* は肺や乳腺などで発現し、多環芳香族炭化水素のような環境中の化学発がん物質を代謝活性化することが知られている。一方で、生体内基質として 17β -エストラジオールの 4 位水酸化に関与するなど、エストロゲン関連組織における恒常的な機能維持にも関わる。

そこで本章では、XRE2/XRE3 を含む *CYP1B1* 遺伝子の転写調節領域の DNA メチル化プロファイルをヒトの肝臓、肺および乳腺組織を対象に調べた。解析には NCBI データベースより入手したヒト正常およびがん組織における DNA メチル化網羅解析データを用いた。

2. 材料および実験方法

2-1. ヒト正常組織およびがん組織における *CYP1B1* 遺伝子発現レベルおよび上流領域のメチル化状態の解析

ヒトの肝臓、肺、乳腺組織の正常組織とがん組織における遺伝子発現と DNA メチル化状態の網羅解析のデータを、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) より入手し、*CYP1B1* 遺伝子の mRNA の発現量と DNA メチル化状態を個体間比較した。遺伝子発現量の網羅解析は、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により解析されたデータを用いた。DNA メチル化の網羅解析は、Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA92122, USA) により得られたデータを用いて、*CYP1B1* 遺伝子上流の XRE3 を含む 22 箇所の CpG 配列のメチル化状態を比較した。GEO データベースより入手したデータの登録番号

(accession number) を表 4 に示す。サンプル内のばらつきの程度の指標として、mRNA 発現量については変動係数 (coefficient of variation, CV)、メチル化状態については四分位範囲を用いた。

表 4. 遺伝子発現解析および DNA メチル化状態の網羅解析に使用した GEO 上のデータの登録番号と標本数

| | | Expression analysis | | Methylation analysis | |
|--------|--------|---------------------|-------|----------------------|-------|
| Liver | Normal | GSE112790 | n=15 | GSE56588 | n=10 |
| | Cancer | GSE112790 | n=183 | GSE56588 | n=224 |
| Lung | Normal | GSE33532 | n=20 | GSE56044 | n=12 |
| | Cancer | GSE33532 | n=20 | GSE56044 | n=124 |
| Breast | Normal | GSE42568 | n=17 | GSE141338 | n=6 |
| | Cancer | GSE42568 | n=104 | GSE141338 | n=41 |

3. 結果

図 10 に、肝臓、肺、乳腺組織の正常組織とがん組織における *CYP1B1* mRNA 発現量と、*CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化状態を示す。図 10A より、各組織において正常組織（Normal）とがん組織（Cancer）との間に、*CYP1B1* mRNA 発現量の平均値に差は認められなかった（肝臓；Normal：6.16 vs. Cancer：6.87，肺；Normal：8.54 vs. Cancer：9.00，乳腺；Normal：7.90 vs. Cancer：7.70）。そこで、各組織において正常、がん組織内のサンプル間の変動を比較するために、変動係数を算出し比較した。その結果、肺においては変動係数に差は認められなかったが、肝臓と乳腺においてがん組織において個体間の変動が大きいことが明らかとなった（肝臓；Normal：0.176 vs. Cancer：0.240，肺；Normal：0.120 vs. Cancer：0.122，乳腺；Normal：0.117 vs. Cancer：0.221）。

正常組織間を比較した時、平均値は各組織による差異が認められた（変動係数：肝臓：6.16，肺：8.54，乳腺：7.90）。各組織における個体間の変動係数もまた大きな差異は認められなかったが（変動係数：肝臓：0.176，肺：0.120，乳腺：0.117），最低値と最高値の間にはいずれの組織でも 2 倍程度の差が検出された。

CYP1B1 遺伝子上流の DNA メチル化状態の解析の結果、各組織において正常組織とがん組織との間に、メチル化状態の中央値に差は認められなかったが、がん組織において特に個体間において全体的にメチル化状態の変動が大きい傾向にあった（図 10B）。前章にて注目した XRE3 上のメチル化状態においても、正常組織とがん組織との間に中央値の顕著な差異は認められなかった（肝臓；Normal：0.041 vs. Cancer：0.047，肺；Normal：0.000 vs. Cancer：0.000，乳腺；Normal：0.035 vs. Cancer：0.037）が、特に肝及び乳腺それぞれのがん組織において個体間での変動が大きい傾向にあることが認められた。一方、正常肺組織において、*CYP1B1* 遺伝子上流の低メチル化傾向が確認された。肝臓、乳腺の正常組織では、*CYP1B1* 遺伝子上流 1000 base 以内の CpG 配列のメチル化状態の個体差は、がん組織における個体間変動度合いよりも低い変動があること確認された。

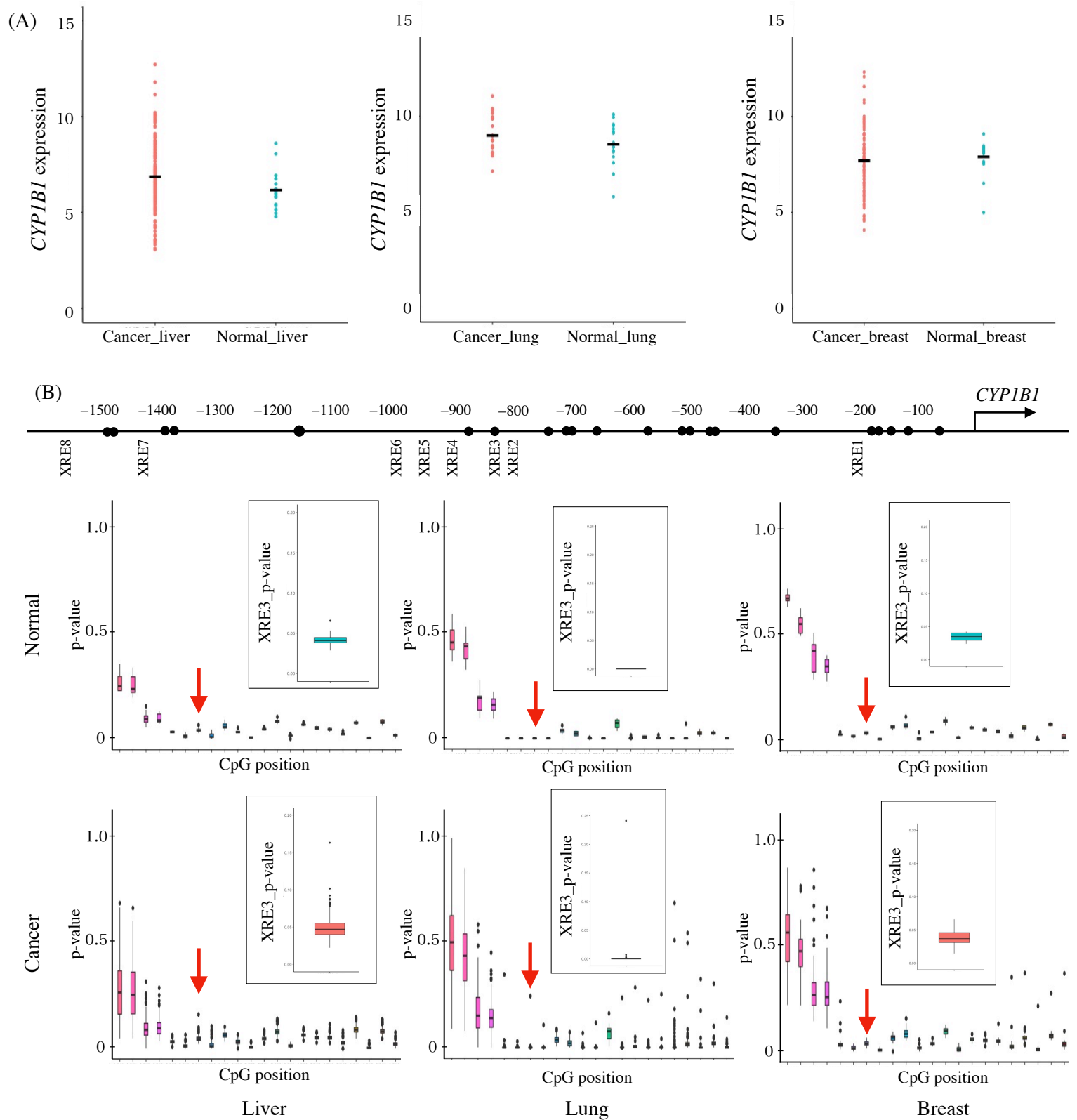


図 10. ヒト肝臓、肺および乳腺の正常およびがん組織における *CYP1B1* mRNA 発現量 (A) と *CYP1B1* 遺伝子上流の CpG 配列上のメチル化状態 (B)。

(A) 遺伝子発現量は GEO データベースより入手した各値をプロットし、平均値を横線で示す。(B) 上部に解析を行った 22 箇所の CpG 配列の場所を●で示す。数字は *CYP1B1* 転写開始地点からの距離を示す。DNA メチル化状態は p-value で示され、0 (非メチル化) ~ 1 (完全メチル化) の範囲の値で示される。遺伝子発現量は GEO データベースより入手した値より箱ひげ図を作成し、箱中の線で中央値を示す。図中の点は外れ値として算出されたデータを示す。矢印は XRE3 に相当する CpG 配列上のメチル化を示し、グラフ内に拡大図を示す。

4. 考察

CYP1B1 の発現レベルには、組織特異性があることが知られている。中でも乳腺などのホルモン感受性組織や肺にて高いレベルで発現している。これは各組織における CYP1B1 の機能によるものであると考えられる。例えば、CYP1B1 はエストロゲン代謝に重要な役割をしていることが知られており（40）、エストロゲンが機能を発現する組織として乳腺が挙げられる。また、喫煙などにより外来物質が経気道的に摂取された時、それらの物質は肺へと到達する。喫煙により摂取される物質の中には AhR のリガンドのひとつである ベンゾ [a] ピレン（B[a]P）があるが、B[a]P もまた CYP1 により代謝を受ける。この代謝には CYP1B1 も寄与することが知られており、肺組織における CYP1B1 の役割もまた示されている。しかし同時に、肺組織において CYP1B1 により代謝を受けた B[a]P は代謝的活性化を経て発がん作用を引き起こすことが示されており（41）、CYP1B1 ががんの発生に寄与することが示唆されている（42）。

前章までに、肝臓がん細胞において *CYP1B1* 遺伝子発現誘導は DNA メチル化の影響を受けることを示してきた。DNA メチル化状態の変化は、後天的な要因により変動することが知られているため、本章では実際のヒト組織における *CYP1B1* 遺伝子発現における DNA メチル化の影響について検討し、このメチル化状態が実臨床においてどの程度影響を及ぼすかについて考察をした。肝臓の正常組織とがん組織における mRNA 発現量の平均値には顕著な差は認められなかったが、がん組織において個体間の変動が大きい傾向にあることが示された。同時に、がん組織において *CYP1B1* 上流領域の DNA メチル化状態にもまた個体間の大きな変動が認められた。このことは、*CYP1B1* 遺伝子発現量の個体差の要因の一つとして考えられる。遺伝子発現誘導に重要な役割を示す DNA メチル化領域として、XRE3 領域のメチル化を挙げたが、このメチル化状態は正常組織では約 3 倍、がん組織においては約 8 倍の個体間変動が認められ、*CYP1B1* 上流の XRE 配列が高メチル化状態の患者と低メチル化状態の患者間で遺伝子発現レベルあるいは誘導能に個体差が生じる可能性がある。

CYP1B1 が高発現している肺組織では、*CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化は低い傾向にあることが示された（図 10B）。特に XRE3 はほぼ非メチル化状態であり、このことは第 1 章で示した DNA 脱メチル化による遺伝子発現誘導の増強が認められなかった結果（図 4）を支持した。また、肺組織における *CYP1B1* 遺伝子発現量においても正常組織とがん組織間で変動係数に大きな差はない。これにより、肺組織においてはがん化のような状態変化に有っても、DNA メチル化状態の変動を受けにくいことが示唆される。

興味深いことに、肺組織と同様に *CYP1B1* が高発現している乳腺組織では、肺組織とは異なり正常組織とがん組織間での変動係数に違いが認められた。この変動は、肝臓組織と同様に DNA メチル化状態の差異で説明できる可能性がある。*XRE3* を含む *CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化状態は、がん化に伴い変動係数が大きくなる傾向にあった。このことより、乳腺組織においても *CYP1B1* 遺伝子発現変動に DNA メチル化が関与する可能性が示唆される。しかし、乳がん培養細胞である MCF-7 細胞では、DNA 脱メチル化は *CYP1B1* 遺伝子発現の誘導を増強させないことが報告されている（23, 25）。この結果の差異には、培養細胞を用いた解析とヒト由来の組織との間の生理的な違いが反映されている可能性がある。事実、平面培養と生体環境を模した三次元培養との間で、遺伝子発現経路などの差異が見られることが既に報告されている（43, 44）

CYP1B1 遺伝子はエストロゲン代謝のみならず、がんの発生や薬剤耐性に関与していることが報告されている（40, 42）。*CYP1B1* 遺伝子発現の個体差は、DNA メチル化状態の差異により引き起こされる可能性があり、発現レベルの変動は *CYP1B1* による発がんのリスクや薬剤治療の抵抗性と結びつけることができる可能性がある。実際に、前立腺がんにおいては、*CYP1B1* 遺伝子上流の低メチル化による遺伝子発現の上昇が報告されており、これが前立腺がんにおいて重要な役割を示す可能性が示唆されている（24）。また、*CYP1B1* をはじめとする *CYP1* 遺伝子は、プロトンポンプ阻害薬であるオメプラザールにより誘導されることも示されており（45）、これら薬物が常用されている患者の各種組織の DNA メチル化状態の変動が引き起こされた場合、想定外の発現誘導が引き起こされる可能性がある。今回の結果は、薬物代謝酵素 *CYP1B1* を例として、生体内での DNA メチル化状態の変動が遺伝子発現変動の個体差の要因となる可能性を提示するものである。

第4章 DNA 脱メチル化が AhR リガンド曝露による *CYP2* および *CYP3* 遺伝子発現誘導を惹起する可能性の検討

1. 緒言

AhR が結合する XRE 配列（5'-CACGC-3' または 5'-GCGTG-3'）は、わずか 5 塩基の配列により構成されている。そのためこの配列は、*CYP1* 遺伝子のみならず、*CYP2* や *CYP3* 遺伝子においても存在することが推測される。これらの *CYP* 遺伝子の転写調節領域は、*CYP1* 遺伝子と異なり高レベルでメチル化されていることも明らかになっている（22）。従って、*CYP2* や *CYP3* 遺伝子上流に存在する XRE 配列と同配列（XRE 共通配列）は通常は高度にメチル化されているため、AhR を介した発現誘導が引き起こされない可能性が考えられる。

本章では、各 *CYP* 遺伝子の転写調節領域内の XRE 共通配列を探索するとともに、DAC の前処理によって β NF 曝露による遺伝子発現の誘導が *CYP2* や *CYP3* 遺伝子においても引き起こされる可能性を検討した。

2. 材料および実験方法

2-1. 各遺伝子上流配列の XRE 共通配列の探索

CYP1A1, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* の各遺伝子上流の塩基配列情報を、NCBI のデータベースより入手し、遺伝子の転写開始点より上流 10 kb 以内の XRE 共通配列（5'-CACGC-3', 相補鎖 5'-GCGTG-3'）を検索した。また、*CYP1A2*, *CYP2D6* については、3' 下流側のエンハンサー領域も対象に XRE 配列を検索した。検索の対象とした各 *CYP* 遺伝子塩基配列の登録番号（accession number）を表 5 に示す。

2-2. 薬物曝露および遺伝子発現量解析（定量的 PCR）

HepG2 細胞および HuH7 細胞を対象に、第 1 章と同様の薬物処理を行い、*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* の各遺伝子の発現量を解析した。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列を表 6 に示す。

表 5. *CYP* 遺伝子エンハンサー領域の配列解析に用いた NCBI データベース上の登録番号

| Gene | Accession No. | Reference |
|--------------------------|--|-----------|
| <i>CYP1A1 and CYP1A2</i> | NG_008431 | 28 |
| <i>CYP1A2_downstream</i> | NG_055247.1 | 46 |
| <i>CYP1B1</i> | NC_000002.12 (from base 38076181 to 38086181) | |
| <i>CYP2C9</i> | NC_000010.11 (from base 94928658 to 94938657) | |
| <i>CYP2C19</i> | NC_000010.11 (from base 94752681 to 94762680) | |
| <i>CYP2D6</i> | NC_000022.11(from base 42130811 to 42140810) | |
| <i>CYP2D6_downstream</i> | NG_055461.1 (PMID:25381333) | 47 |
| <i>CYP2E1</i> | NC_000010.11(from base 133517363 to 133527362) | |
| <i>CYP3A4</i> | NC_000007.14 (from base 99784185 to 99794184) | |

表 6. 遺伝子発現量解析に用いたプライマー配列

| Gene name | | Sequence (5' to 3') | Reference |
|----------------|---------|-------------------------------|-----------|
| <i>ACTB</i> | Forward | TCATGAAGTGTGACGTGGACATC | 21 |
| | Reverse | CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT | |
| <i>CYP2C9</i> | Forward | ACAGCTAAAGCTCAGGAAGAGATTGAACG | |
| | Reverse | GCAGGCTGGTGGGGAGAAGGTC | |
| <i>CYP2C19</i> | Forward | ACAGATAGTGAAATTTGGAC | |
| | Reverse | TTCATGCCTTTCTCAGCAGG | |
| <i>CYP2D6</i> | Forward | CCTAAGGGAACGACACTGATCAC | |
| | Reverse | GGCCCTGGGCATCCA | |
| <i>CYP2E1</i> | Forward | TCAATCTCTGGACCCCAACTGT | |
| | Reverse | AGTCACGGTGATACCGTCCATT | |
| <i>CYP3A4</i> | Forward | TGCTTCTCACGGGACTATTTCC | |
| | Reverse | TCTTATCAGAGCTCAGGAGGAGTTAA | |

3. 結果

検索の結果見出された *CYP1* 遺伝子上流に存在する XRE 共通配列（5'-CACGC-3'，相補鎖 5'-GCGTG-3'）の位置を図 11 に示す。

CYP1A 遺伝子上流の XRE 共通配列は 32 箇所存在し，その中で XRE としての機能が認められている配列は 13 箇所であった（28）．*CYP1A2* 遺伝子下流のエンハンサー領域には，XRE 共通配列が 4 箇所存在し，その中で XRE としての機能が認められている配列は 2 箇所であった（44）．*CYP1B1* 遺伝子上流 10kb 以内には XRE 共通配列が 11 箇所存在し，その中で XRE としての機能が認められている配列は 8 箇所であった（26，27）が，これらの XRE としての機能の有無と周辺配列の規則性は認められなかった。

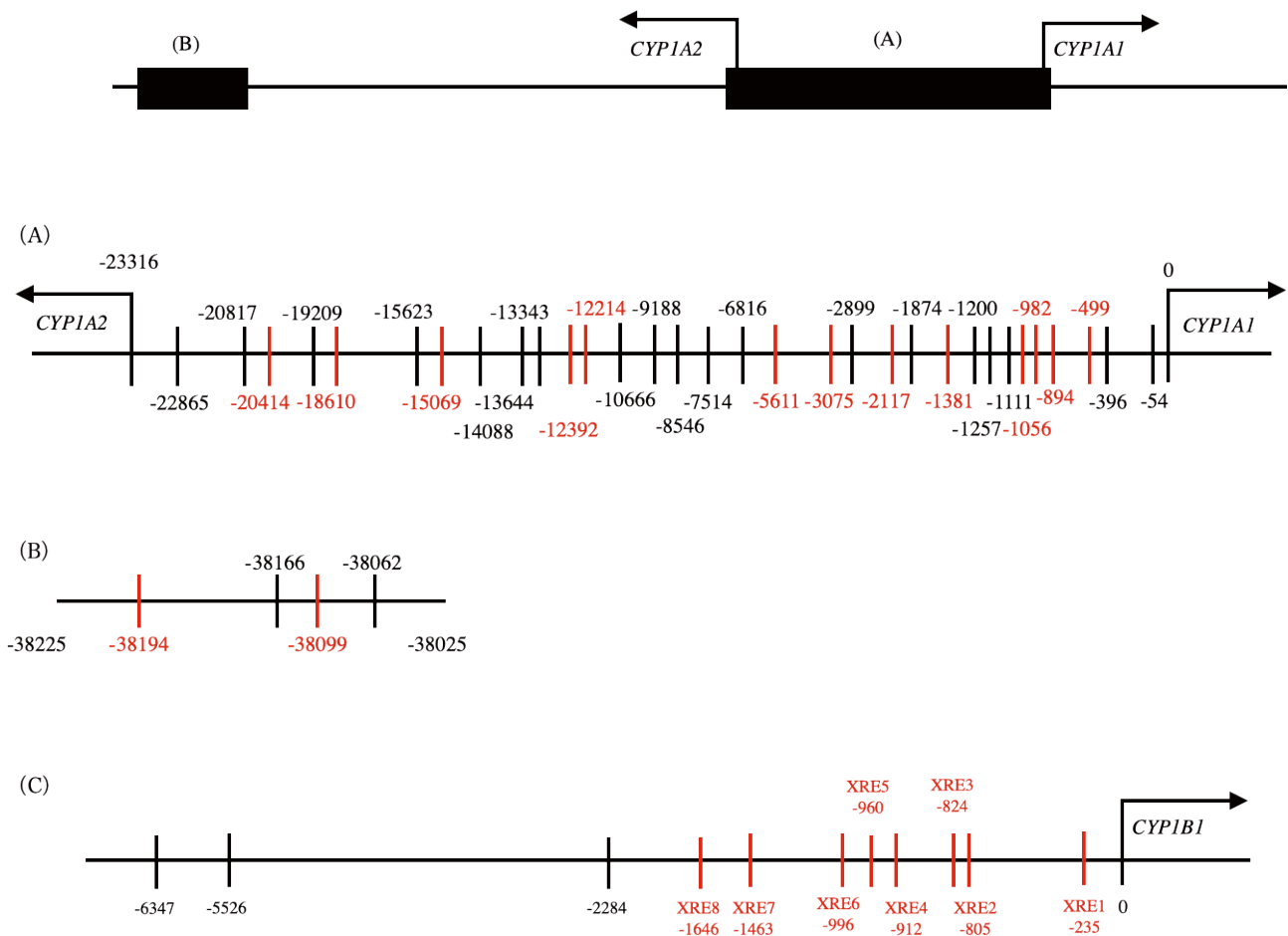


図 11. 各 *CYP* 遺伝子上流 10 kb 以内もしくは下流エンハンサー領域中に含まれる XRE 共通配列の位置. NCBI データベース上の各 *CYP* 遺伝子の XRE 共通配列（5'-CACGC-3'，5'-GCGTG-3'）の位置を示す. 赤文字で示した配列は，XRE 配列として報告されている領域を示す. (A) *CYP1A1*，*CYP1A2* 遺伝子上流，(B) *CYP1A2* 遺伝子下流エンハンサー領域，(C) *CYP1B1* 遺伝子を示す.

検索の結果見出された *CYP2* および *CYP3* 遺伝子上流に存在する XRE 共通配列（5'-CACGC-3'，相補鎖 5'-GCGTG-3'）の位置を図 12 に示す。

CYP2C9 遺伝子，*CYP2C19* 遺伝子，*CYP3A4* 遺伝子は 2 箇所，*CYP2D6* 遺伝子は 12 箇所，*CYP2E1* 遺伝子は 6 箇所の XRE 共通配列が確認された。*CYP2D6* 遺伝子においては，下流エンハンサー領域中にも XRE 共通配列が 3 箇所見出された。一方で，*CYP2* と *CYP3* 遺伝子で検出された XRE 共通配列と，*CYP1* 遺伝子上で AhR の結合が証明されている XRE 配列との間で，近傍の 30 base の塩基配列を比較したが，特徴的な配列や規則性は見出されなかった。

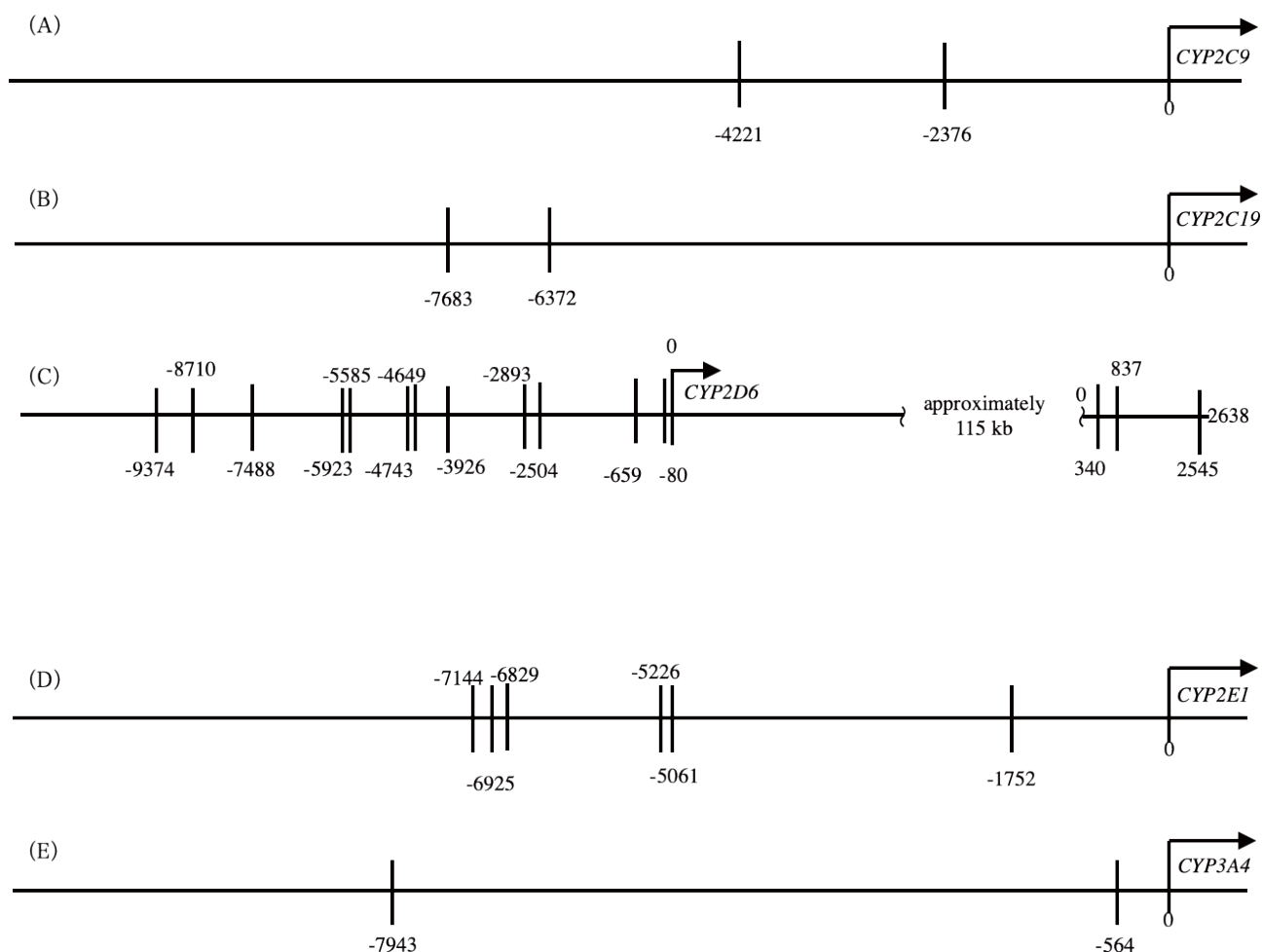


図 12. 各 *CYP* 遺伝子上流 10kb 以内もしくは下流エンハンサー領域中に含まれる XRE 共通配列の位置。NCBI データベース上の各 *CYP* 遺伝子の XRE 共通配列（5'-CACGC-3'，5'-GCGTG-3'）の位置を示す。赤文字で示した配列は，XRE 配列として報告されている領域を示す。(A) *CYP2C9* 遺伝子，(B) *CYP2C19* 遺伝子，(C) *CYP2D6* 遺伝子上流ならびに下流エンハンサー領域，(D) *CYP2E1* 遺伝子，(E) *CYP3A4* 遺伝子エンハンサーを示す。

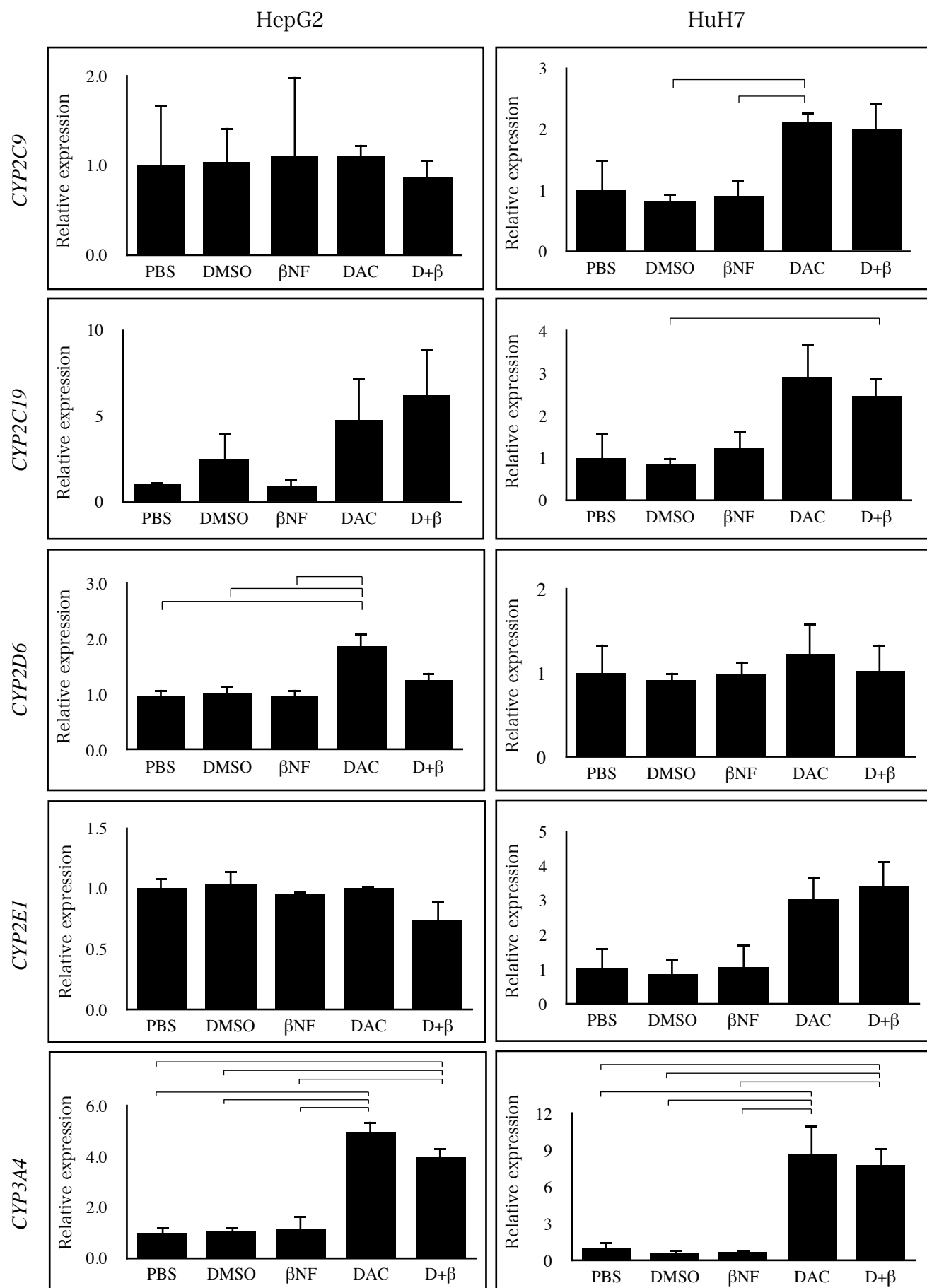


図 13. HepG2 細胞, HuH7 細胞における, 薬物処理による *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* 遺伝子発現への影響. 縦軸は PBS 処理群に対する mRNA 発現量の相対値を示し, $p < 0.05$ で統計的な有意差を表し, 有意差が見られた組み合わせを角括弧 (\cap) で示す.

図 13 に、HepG2 細胞、HuH7 細胞における、各薬物処理による *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* 遺伝子発現の変化を示した。

いずれの *CYP* 遺伝子においても、 β NF 単独処理で *CYP* 遺伝子発現の誘導は検出されなかった。一方、DAC 単独処理で両細胞とも一部の *CYP* 分子種の遺伝子発現の上昇が認められた。具体的には、HepG2 細胞における *CYP2C19* (4.70 倍 [$p=0.345$]), *CYP2D6* (1.86 倍 [$p=0.037^*$]) および *CYP3A4* (4.94 倍 [$p<0.01^{**}$]), HuH7 細胞における *CYP2C9* (2.12 倍 [$p=0.113$]), *CYP2C19* (2.93 倍 [$p=0.149$]), *CYP2E1* (3.06 倍 [$p=0.0917$]) および *CYP3A4* (8.74 倍 [$p=0.02^*$]) の各遺伝子であった。しかし、いずれの場合も DAC と β NF の併用による更なる遺伝子発現の増加は検出されなかった。

4. 考察

CYP 遺伝子の一部は、個体間で DNA メチル化状態に差があることが報告されており、これらが遺伝子発現の個体差に影響を及ぼす可能性がある (22)。*CYP1A1* 遺伝子と *CYP1A2* 遺伝子は、互いに head-to-head の配置となっており (図 11)、その上流に存在しているエンハンサー領域はそれぞれの遺伝子に共通のものである。共通エンハンサー領域に含まれている XRE クラスターは、*CYP1A1* 遺伝子、*CYP1A2* 遺伝子双方の発現に同時に影響を及ぼす (28, 48)。しかし、*CYP1A* 遺伝子エンハンサー上の XRE 配列が *CYP1A1/CYP1A2* 遺伝子の個々の発現にどのように寄与しているかは明らかとなっておらず、故に個々の XRE 配列上のメチル化状態が遺伝子発現に及ぼす影響を評価するのが困難と思われた。そのことは、第 2 章において *CYP1B1* 遺伝子に着目した理由にもつながる。

CYP1 遺伝子上で DNA メチル化の作用点と考えられる XRE 共通配列は、*CYP1* 遺伝子以外にも *CYP2* 遺伝子、*CYP3* 遺伝子エンハンサー上でも検出された (図 12)。特に、*CYP2D6* と *CYP2E1* では XRE 共通配列が多数存在し、近傍には複数の CpG 配列の集合部位 (CpG アイランド) を有するなど、*CYP1* 遺伝子と類似の特徴を示す。また、*CYP2* 遺伝子および *CYP3* 遺伝子制御領域におけるメチル化状態は、*CYP1B1* 遺伝子よりも高いことが分かっている (22)。このことより、*CYP2* 遺伝子および *CYP3* 遺伝子制御領域に含まれる XRE 共通配列もまた高度にメチル化されており、それにより AhR 経路上の XRE としての機能を妨げている可能性が考えられ

た。その場合、DAC による *CYP2* 遺伝子、*CYP3* 遺伝子上流の XRE 共通配列の脱メチル化が、今まで確認されていなかった AhR 経路活性化に伴う誘導を引き起こす可能性があった。

今回の結果より、DAC 単独処理による発現量の上昇が検出された遺伝子も認められたが、*CYP1B1* 遺伝子のように、DAC と β NF の併用により遺伝子発現誘導の更なる増強が検出された遺伝子は認められなかった。DAC 単独処理による遺伝子発現の増加は、*CYP1B1* 遺伝子においては制御領域上のメチル化の解除による RNA pol II を含む転写因子の結合の増強によるものであることが示されている (23)。しかし、DAC による *CYP2*, *CYP3* 遺伝子発現の増強は、AhR リガンドの曝露による影響を受けなかったことから、DNA 脱メチル化によるこれらの遺伝子発現増強もまた、転写因子の結合促進により引き起こされた可能性が考えられる。今回の結果は、XRE 共通配列を有するのみでは AhR 経路による遺伝子発現制御は引き起こされないことを示唆した。このことより、XRE 配列が AhR 経路上で機能を発現するためには XRE 配列の非メチル化状態は必須の条件となるが、さらにヒストン修飾などによるクロマチンの立体構造もまた必要となることが推測された。

第5章 総合考察および結論

今回解析した *CYP1B1* 遺伝子は、他の *CYP1* 遺伝子と同様に AhR 経路により遺伝子発現が誘導される。*CYP1B1* は 17 β -エストラジオールの水酸化によるがんの発生（40）や、抗がん剤の代謝による耐性の獲得に関与することが報告されている（42）。先行研究の結果と合わせると、*CYP1B1* 遺伝子の発現量の比較的高い組織の培養細胞である乳がん MCF-7 細胞（23）や肺がん A549 および H2170 細胞（図 4）よりも、肝臓がん HepG2 細胞（図 3）や子宮頸がん HeLa 細胞（25）において、*CYP1B1* 遺伝子発現誘導における DNA メチル化による影響が大きかった。後者の細胞では、転写調節領域がメチル化されていたために発現量が低く、DAC の影響も大きく現れた可能性も考えられた。しかし、DNA メチル化が AhR 経路上でどのように影響しているかは明らかとなっていなかった。

そこで本研究はヒト肝臓がん細胞株を用いて、薬物代謝酵素 *CYP1B1* 遺伝子発現制御をモデルとした、核内受容体 AhR による遺伝子発現誘導における DNA メチル化の影響を検証した。その結果、HepG2 細胞において β NF による *CYP1B1* 遺伝子発現誘導は、DAC による脱メチル化により増強することが確認された（図 3）。上記の現象は、AhR リガンドとして TCDD を用いた場合にも確認されることより（23）、DNA 脱メチル化による *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の増強は、AhR リガンドの種類によらず AhR 経路に依存することが示された。AhR 経路上で中心的な役割を果たす *AHR* ならびに *ARNT* の遺伝子発現量は、DAC による DNA 脱メチル化の影響をほとんど受けないことが示された（図 5）。HuH7 細胞において、DAC 処理により *AHR* と *ARNT* の mRNA 発現量がわずかに増加したが、この時 DAC と β NF の併用でも *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の増強は認められなかった。故に、*CYP1B1* 遺伝子発現誘導に影響を及ぼす DNA 脱メチル化による影響は、*AHR*, *ARNT* の遺伝子発現変動に依存せずに、AhR 経路上で遺伝子発現誘導を増強することが強く示唆された。

本研究では、DAC 単独では *CYP1B1* 遺伝子発現量の変化が起こらない条件で、DAC を処理後に AhR リガンドを曝露したときに遺伝子発現誘導の増強する現象（図 3）に注目した。そして、エンハンサー上に存在する AhR/ARNT 複合体が標的とする配列である XRE 配列は、DNA メチル化の標的となる CpG 配列が含まれているため、XRE 共通配列のメチル化が AhR 経路による遺伝子発現誘導に影響を及ぼしているのではないかと考えた。

AhR 経路による遺伝子発現誘導は、リガンドが結合した AhR が細胞の核内へ移行し AhR/ARNT 複合体として XRE へ結合することが引き金となる。そこで、XRE 上のメチル化は、AhR/ARNT 複合体の XRE への結合を妨げるために遺伝子発現誘導が起こりにくくなり、DAC による

XRE 配列の脱メチル化は AhR/ARNT 複合体の結合を増強させるために遺伝子発現誘導が増強する可能性が考えられた。そこで、まず HepG2 細胞と HuH7 細胞のゲノム DNA に対し、*CYP1B1* 遺伝子エンハンサー上の 8 箇所の XRE のメチル化状態を解析した。その結果、HepG2 細胞では 5 箇所の XRE 上にメチル化を検出したが、HuH7 細胞では 2 箇所の XRE 上でしかメチル化が検出されなかった。従って、これらのメチル化状態の差異が、HepG2 細胞と HuH7 細胞間での DAC による β NF 依存性 *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性の原因となっている可能性が推測された。メチル化されていたこれらの XRE の中で、HepG2 細胞と HuH7 細胞間でメチル化状態が異なった XRE は、XRE1, XRE2 および XRE3 であった (図 7)。メチル化が検出された XRE の中で、特に XRE2 と XRE3 は *CYP1B1* 遺伝子発現に重要な役割を果たすことが知られている (27, 28), 故に本研究では、XRE2/XRE3 に焦点を当て、XRE 上のメチル化が AhR/ARNT 複合体の結合に及ぼす影響について解析した。

まず、 β NF 処理をした肝臓がん培養細胞に対し、抗 AhR 抗体を用いた免疫沈降法により、AhR が結合した DNA 断片と、対照となるインプット DNA を回収した。今回用いた CUT&RUN 法は、膜透過性を亢進させた細胞に対し先に抗 AhR 抗体を処理した後、抗体を標的にリクルートされたエンドヌクレアーゼの作用により周囲の配列が切断され、AhR と結合した標的配列を回収することができる。CUT&RUN 法では、ChIP 法より少量の細胞数から、バックグラウンドの少ない解析を行うことができ、これにより、細胞内での現象をより正確に評価することができる。この CUT&RUN 法による抗 AhR 抗体を用いた免疫沈降により、AhR が結合した XRE 配列を選択的に回収することができた。この沈降物に対し COBRA 法および単コピーごとのシーケンス解析により、XRE2/XRE3 領域におけるメチル化状態の解析を行った。

免疫沈降物に対するメチル化状態の解析の結果、AhR/ARNT 複合体は非メチル化状態の XRE に選択的に結合することが明らかとなった (図 8, 図 9)。この結果は、XRE 上のメチル化が DAC の前処理により除去されることで、AhR/ARNT 複合体との親和性が増加するために、AhR リガンドによる遺伝子発現誘導をさらに増強させたと考えられる (図 14)。また、DAC による脱メチル化は、プロモーター領域への TBP の結合を増加させることも報告されている (23)。よって、DAC によるリガンド依存性 *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の増強は、核内における AhR/ARNT 複合体の XRE 配列への結合増強と、それによりリクルートされた TBP/RNA pol II の結合増強によって相加的にもたらされる可能性がある。一方で、今回の結果より DAC 単独による遺伝子発現の増加が認められなかった (図 3)。このことより、肝臓がん細胞の *CYP1B1* 遺伝子発現誘導において、プロモーター領域のメチル化よりもエンハンサー領域のメチル化の寄与が大きい

ため、DAC と β NF 併用により初めて遺伝子発現誘導の増強という形で DNA 脱メチル化の効果が発現した可能性が示唆された。

XRE のメチル化が遺伝子発現誘導へ影響を及ぼす可能性についてはこれまでも検証されてきた。例えば、XRE 配列上の CpG 配列を人為的にメチル化した DNA を作成し、これを用いたゲルシフトアッセイでは、AhR/ARNT 複合体が非メチル化 XRE に選択的に結合することは示されている（29, 30），しかし、生細胞内の自然なクロマチン状態での証明は今回が初めてとなる。本研究では、AhR 経路による *CYP1B1* 遺伝子発現制御系をモデルとして、遺伝子発現に関わる XRE 配列のメチル化状態を生細胞を対象に検出する方法を確立した。このような実験系は、*CYP1B1* 以外の遺伝子発現制御系や AhR 以外の転写調節因子に対しても応用できると考えられる。

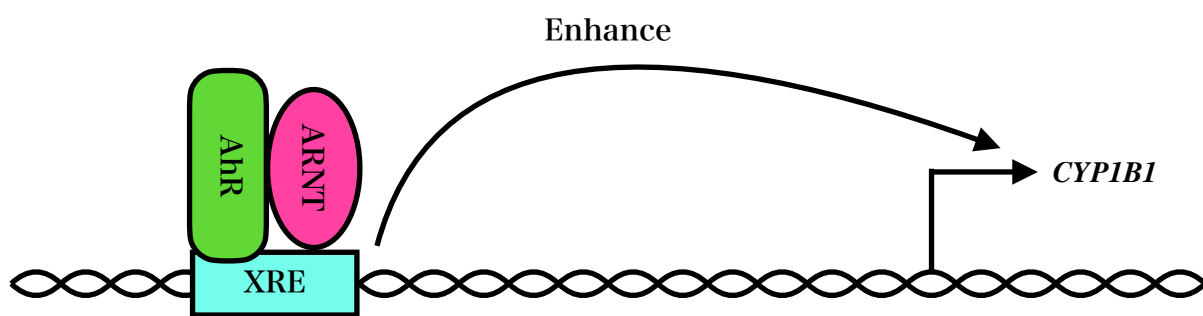
XRE 配列を標的配列とする AhR 経路のように、いくつかの転写因子は標的配列の DNA メチル化の影響を受けることがわかっている。CCCTC-binding factor（CTCF）は、非メチル化 DNA に選択的に結合することで、*IGF2* 遺伝子と *H19* 遺伝子の発現バランスを制御し、ゲノムインプリンティングに寄与する（9, 49）。一方、methyl-CpG binding protein（MeCP2）は、メチル化された CpG に特異的に結合し、転写を負に制御することも明らかとなっている（9, 50）。また近年では、転写因子認識配列上の 1 箇所のメチル化状態により、遺伝子発現が厳格に制御され、生理的な機能の維持に関与することが明らかとなってきた。例えば、赤血球造血に関わる転写因子 GATA-1 は、赤血球の分化の過程で引き起こされる標的配列の脱メチル化を認識し、非メチル化状態の 5'-CGATA-3' 配列を認識し結合し、標的遺伝子の発現を負に制御することが証明されている（51）。このように、転写因子の結合配列内に 1 箇所以上の CpG 配列が含まれる場合には、メチル化状態によって遺伝子発現が制御されている可能性がある。今回の免疫沈降と DNA メチル化解析を組み合わせた手法が、転写調節因子と DNA メチル化状態との関連を評価する方法として応用されることを期待する。

臨床においても DNA メチル化が重要な役割を示す可能性がある。例えば、オメプラゾールによる消化管の *CYP1A1* 遺伝子発現の誘導には、大きな個体差が報告されている（6）が、その理由は明らかとなっていない。これら酵素誘導能の多様性についても、DNA のメチル化で一部説明できる可能性がある。また、CYP に代表される薬物代謝酵素（drug metabolizing enzymes：DMEs）は、個体間でメチル化状態が異なっていることが報告されている（22）。今回、*CYP1B1* 遺伝子発現量は特になんがん患者において個体間変動が大きく、またそれは *CYP1B1* 遺伝子上流のメチル化状態の変動に起因する可能性が示唆された（図 10）。また、*CYP2* 遺伝子や *CYP3* 遺伝子転写制御領域においても、*CYP1* 遺伝子と同様に XRE 共通配列が検出された（図 12）。

これらの XRE 共通配列がメチル化されていることにより転写因子が結合できない状態にされるため、脱メチル化により AhR リガンドによる誘導が引き起こされる可能性が考えられた。しかし、DAC と β NF の併用によっても新規の遺伝子発現誘導は認められなかったため、AhR 経路による遺伝子発現制御は、非メチル化 XRE 共通配列を有するのみでは成立せず、ヒストンタンパク修飾やクロマチン立体構造など、よりダイナミックなメカニズムが関与する可能性が示唆された。ただし、これら CYP 遺伝子の中には DAC によって遺伝子発現が増強する遺伝子も存在し、それらは HepG2 細胞と HuH7 細胞の間でもその傾向が異なっていた（図 12）。このような、DNA 脱メチル化剤による CYP 遺伝子発現変動は、CYP 遺伝子が DNA メチル化の影響を受けていることを強く示唆するものであり、メチル化状態の個体間の差による遺伝子発現レベルの個体差につながる可能性がある。また、DNMT 阻害作用を示すアザシジン（商品名：ビダーザ®）（52）のようなエピジェネティクス修飾薬が主に抗がん剤として臨床現場でも使用されてきている。これらのエピゲノムへの作用は非特異的な作用であり、がん組織以外あるいは多様な遺伝子発現への影響を及ぼす恐れがある。その中には CYP のような DMEs の発現変動を非特異的に引き起こす可能性があり、これらの基質あるいは誘導剤となるような薬剤で治療している場合には予期せぬ副作用や薬剤耐性を示すことにつながる可能性がある。故に、このような代謝変動の要因を解明することは、薬剤治療の有効性や安全性の確保において大いに有用と思われる。DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな変動による薬物代謝や体内動態の変動についての解析は、「ファーマコエピジェネティクス」と表現され、ひとりひとりに即したテーラーメード医療への貢献が期待されている（53）。エピジェネティックな変動は、薬物代謝酵素のようなファーマコジーンそのものの発現変動のみならず、今回の様な遺伝子発現誘導剤による誘導効果にも影響を及ぼすことが明らかとなり、遺伝子発現誘導の可能性のある薬剤とエピジェネティクス修飾薬の併用による遺伝子発現誘導への影響の検討や、それらを引き起こすエピジェネティクス解析は、今後の有用な研究課題である。

本研究は、転写調節因子などのタンパク質と DNA との結合に関与する局所的な DNA メチル化とその遺伝子発現への影響の関連性をヒト由来の生細胞内での現象として直接観測した初めての例である。加えて本研究で用いた手法は、AhR に限らず転写調節因子と、その認識領域の CpG 配列上の DNA メチル化との相互作用や、それによる機能解析を簡便に直接観測する手法として期待される（図 14）。

A) 非メチル化 XRE



B) メチル化 XRE

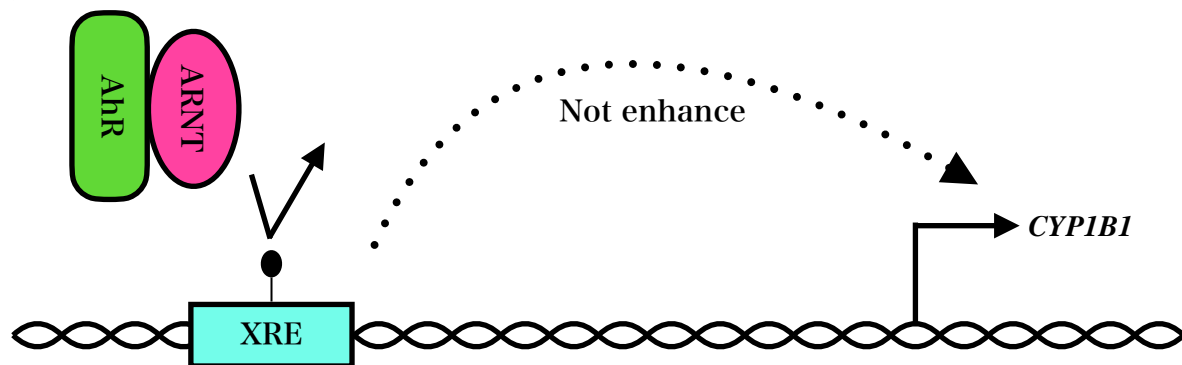


図 14. *CYP1B1* エンハンサー上の XRE 領域のメチル化による遺伝子発現制御への影響

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始，丁寧かつ熱心にご指導とご助言を賜りました岩手医科大学薬学部医療薬科学講座薬物代謝動態学分野 准教授 幅野渉 先生に深く感謝し，厚く御礼申し上げます。また，実験結果および研究方針等について多大なるご助言を賜りました，岩手医科大学薬学部医療薬科学講座薬物代謝動態学分野 教授 小澤正吾 先生，創剤学分野 教授 佐塚泰之 先生，衛生化学分野 教授 杉山晶規 先生，生物薬学講座生体防御学分野 教授 大橋綾子 先生，そして，本研究の実施にあたりご協力とご支援をいただきました，岩手医科大学薬学部医療薬科学講座薬物代謝動態学分野 助教 寺島潤 先生に感謝申し上げます。

参考文献

1. H Reyes, S Reisz-Porszasz, O Hankinson. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256(5060):1193-5 (1992)
2. S Kress, WF Greenlee. Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Cancer Res* 57(7):1264-9 (1997)
3. G I Murray, WT Melvin, WF Greenlee, et al., Regulation, function, and tissue-specific expression of Cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:297-316 (2001)
4. MS Denison, SR Nagy. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309-34 (2003)
5. Y Fujii-Kuriyama, J Mimura. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1):311-7 (2005)
6. WM McDonnell, JM Scheiman, PG Traber. Induction of cytochrome P450IA genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology* 103(5):1509-16 (1992)
7. X-M Han, D-S Ouyang, X-P Chen, et al., Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 54(5):540-3 (2002)
8. CH Waddington. The epigenotype. *Endeavour*; 1:18-20 (1942)
9. AH Lund, M van Lohuizen. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18(19):2315-35 (2004)
10. 牛島俊和, 眞貝 洋一, 塩見 春彦. エピジェネティクス実験スタンダード (羊土社)
11. SP Nunes, R Henrique, C Jerónimo, et al., DNA methylation as a therapeutic target for bladder cancer. *Cells* 9(8):1850 (2020)
12. N L-C Phan, NV Trinh, PV Pham. Low concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine induce breast cancer stem cell differentiation by triggering tumor suppressor gene expression. *Onco Targets Ther* 9:49-59 (2015)
13. M Ishiguro, S Iida, H Uetake, et al. Effect of combined therapy with low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine and irinotecan on colon cancer cell line HCT-15. *Ann Surg Oncol* 14(5):1752-62 (2007)
14. D Oka, S Yamashita, T Yomioka, et al., The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer* 115(15):3412-26 (2009)
15. Y Zhang, M Elgizouli, B Schöttker, et al., Smoking-associated DNA methylation markers predict lung cancer incidence. *Clin Epigenetics* 8:127 (2016)
16. K Matsusaka, S Funata, M Fukayama, et al., DNA methylation in gastric cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* 20(14):3916-26 (2014)
17. J Mill, T Tang, Z Kaminsky, et al., Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet* 82(3):696-711 (2008)
18. S Keller, M Sarchiapone, F Zarrilli, et al., Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide Subjects. *Arch Gen Psychiatry* 67(3):258-67 (2010)

19. Y samei, T Suganami, T Ehara, et al., Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity (Silver Spring)* 18(2):314-21 (2010)
20. 篠崎元. 精神疾患におけるエピジェネティクスの役割の基礎—DNAメチル化を中心に—. 精神神経誌 120:804-812 (2018)
21. W Habano, T Gamo, T Sugai, et al., CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol* 34(4):1085-91 (2009)
22. W Habano, K Kawamura, N Iizuka, et al., Analysis of DNA methylation landscape reveals the roles of DNA methylation in the regulation of drug metabolizing enzymes. *Clin Epigenetics* 7:105(2015)
23. SR Beedanagari, RT Taylor, P Bui, et al., Role of epigenetic mechanisms in differential regulation of the dioxin-inducible human *CYP1A1* and *CYP1B1* genes. *Mol Pharmacol* 78(4):608-16 (2010)
24. T Tokizane, H Shina, M Igawa, et al., Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11(16):5793-801 (2005)
25. M Nakajima, M Iwanari, T Yokoi. Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicol Lett* 144(2):247-56 (2003)
26. YM Tang, YY Wo, AL Hawkins, et al., Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem* 271(45):28324-30 (1996)
27. Y Tsuchiya, M Nakajima, T Yokoi. Critical enhancer region to which AhR/ARNT and Sp1 bind in the human CYP1B1 gene. *J Biochem* 133(5) 583-92 (2003)
28. R Ueda, H Iketaki, K Nagata, et al., A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the Human CYP1A1 and CYP1A2 Genes. *Mol Pharmacol* 69(6):1924-30 (2006)
29. Y Takahashi, C Suzuki, T Kamataki. Silencing of CYP1A1 expression in rabbits by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 247(2):383-6 (1998)
30. ES Shen, JP Whitlock Jr. The potential role of DNA methylation in the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 264(30):17754-8 (1989)
31. H Chang, LW Chang, Y-H Cheng, et al., Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol Sci.* 89(1):205-13 (2006)
32. M Ek, T Söderdahl, B Kuppers-Munther, et al., Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74(3):496-503 (2007)
33. H Li, J Wang, X Luo, et al., An improved sequentially rejective Bonferroni test procedure. *Biom J* 60(5):893-902 (2018)
34. D Cheishvili, L Boureau, M Szyf. DNA demethylation and invasive cancer- implications for therapeutics. *Br J Pharmacol* 172(11):2705-15 (2015)
35. J Mimura, M Ema, K Sogawa, et al., Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13(1):20-5 (1999)

36. M Mizuguchi, T Hara, M Yoshita-Takahashi, et al., Promoter CpG methylation inhibits Krüppel-like factor 2 (KLF2)-Mediated repression of hTERT gene expression in human T-cells. *Biochem Biophys Res* 26:100984 (2021)
37. PJ Skene, S Henikoff. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife* 6:e21856 (2017)
38. PM Warnecke, C Stirzaker, J Song, et al., Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27(2):101-7 (2002)
39. Z Xiong, PQ Laird. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25(12):2532-4 (1997)
40. CL Hayes, DC Spink, JQ Cao, et al., 17 β -estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9776-81 (1996)
41. K Shiizaki, M Kawanishi, T Yagi. Modulation of benzo[a]pyrene–DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ* 39:14 (2017)
42. MC McFadyen, HL McLeod, FC Jackson, et al., Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: A novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 62(2):207-12 (2001)
43. J Terashima, Y Jimma, K Jimma, et al., The regulation mechanism of AhR activated by benzo[a]pyrene for CYP expression are different between 2D and 3D culture of human lung cancer cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 33(4):211-214 (2018)
44. T Paullin, C Powell, C Menzie, et al., Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses. *PLoS One* 12(8):e0182930 (2017)
45. M Nishimura, H Yoshitsugu, S Naito, et al., Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 122(5):339-61 (2002)
46. ST Okino, LC Quattrochi, D Pookot, et al., A dioxin-responsive enhancer 3' of the human CYP1A2 gene. *Mol Pharmacol* 72(6):1457-65 (2007)
47. D Wang, AC Papp, X Sun. Functional characterization of CYP2D6 enhancer polymorphisms. *Hum Mol genet* 24(6):1556-62 (2015)
48. J Corchero, S Pimprale, S Kimura, et al., Organization of the *CYP1A* cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* 11(1):1-6 (2001)
49. AT Hark, CJ Schoenherr, DJ Kats, et al., CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405(6785):486-9 (2000)
50. Z Siegfried, H Cedar. DNA methylation: A molecular lock. *Curr Biol* 7(5):R305-7 (1997)
51. L Yang, Z Chen, ES Stout, et al., Methylation of a CGATA element inhibits binding and regulation by GATA-1. *Nat Commun* 11(1):2560 (2020)
52. ビダーザ®注射用100mg インタビューフォーム：2021年3月改訂（第2版、効能変更）
53. I-W Kim, N Han, GJ Burckart, et al., Epigenetic changes in gene expression for drug- metabolizing enzymes and transporters. *Pharmacotherapy* 34(2):140-50 (2014)