

論文内容の要旨

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

三浦 利貴

I. 研究目的

薬物や環境化学物質の曝露を受けた細胞では、シトクロムP450 (CYP) 等の薬物代謝酵素の発現が誘導され解毒代謝が速やかに行われる。例えば、 β ナフトフラボン (β NF) は細胞質内で結合したaryl hydrocarbon receptor (AhR) の核内移行を促進し、標的遺伝子の転写調節領域上に存在するxenobiotic responsive element (XRE) 配列へと結合することでCYP1B1遺伝子の発現を誘導する。この発現誘導は、DNAメチル化阻害剤である5-aza-2' deoxycytidine (DAC) の前処理によるDNAの脱メチル化により更なる増強が確認されている。本研究では、AhRを介した遺伝子発現誘導経路においてDNAメチル化の役割を明らかにするため、 β NFの曝露による遺伝子発現の誘導がDNA脱メチル化により増強されるヒトがん細胞のモデルを探索した。そして、XRE配列中にDNAメチル化の標的となる5'-CG-3'配列 (CpG配列) が含まれていることに着目し、XRE上のメチル化がAhRとXRE配列との親和性を低下させる可能性を考え、AhRが非メチル化状態のXRE配列に結合することでCYP1遺伝子発現を誘導することの証明を試みた。

II. 研究対象ならびに方法

ヒト肝臓がん細胞 (HepG2, HuH7) および肺がん細胞 (A549, H2170) を対象に、 β NF単剤処理、DAC単剤処理、または β NFとDACの併用による各CYP遺伝子発現量の変動を測定した。 β NFを処理した肝臓がん細胞に抗AhR抗体を用いた免疫沈降法を行い、AhRが結合したDNA断片を選択的に回収した。回収したDNA断片にバイサルファイト処理を行い、免疫沈降法により得られたDNAと抗体処理を行わなかったDNAとの間のXRE配列のメチル化状態を比較した。また、ヒト肝臓、肺および乳腺組織におけるCYP1B1遺伝子発現量および転写調節領域のメチル化状態を評価するため、Gene Expression Omnibus (GEO) データベースより網羅解析データを入手し解析した。

III. 研究結果

β NFによるCYP1B1遺伝子発現誘導は、HepG2細胞ではDACの前処理によりさらに増強したが、HuH7細胞および肺がん細胞では増強されなかった。この細胞間の応答性の違いは、CYP1B1遺伝子発現に重要な役割を示すXRE2/XRE3のメチル化状態の差異で説明することができた。免疫沈降により回収されたDNA断片のメチル化を解析したところ、免疫沈降により得られたDNA断片ではXRE2/XRE3は常に非メチル化状態であった。これにより、AhRは非メチル化されたXREに選択的に結合することが示された。一方、CYP2、CYP3遺伝子においても遺伝子エンハンサー上にXRE配列と共通の配列が検出されたが、 β NFによる遺伝子発現の誘導はDACの前処理を行っても検出されなかった。正常組織とがん組織間でCYP1B1遺伝子発現の平均値に差は認められなかったが、がん組織において個体間での変動が大きかった。CYP1B1遺伝子上流の各CpG上のメチル化状態も、正常組織とがん組織間で中央値に差は認められなかったが、がん組織において個体間での変動が大きかった。

IV. 結 語

免疫沈降法とDNAメチル化解析を合わせた新しい手法を用いたことにより、AhRが非メチル化状態のXRE2/XRE3と選択的に結合してCYP1B1遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。これは、XRE配列におけるメチル化がAhRに対する結合の親和性が低下することによるものであり、メチル化による立体的な障害などが原因となっている可能性が考えられる。従来のゲルシフト法やレポーターアッセイとは異なり、細胞内の自然なクロマチン状態での結合の選択性を評価できることが本法の最大の利点であり、他の転写因子の解析への応用が期待できる。今回のヒトの肝臓、肺、乳腺の正常組織を対象とした検証では、個体間で約2倍のCYP1B1遺伝子発現量の変動が確認された。これはXRE3のみならず遺伝子上流の各CpG配列上のメチル化状態の変動の相加的な影響であることが示唆された。AhRにより遺伝子発現が誘導されるCYP1遺伝子上流には、AhRの認識配列のXRE配列が存在する。このXRE配列と共通配列はCYP1遺伝子以外のCYP2およびCYP3遺伝子エンハンサー領域中にも確認されたが、これらの遺伝子のDACと β NFによる遺伝子発現誘導は検出されなかった。このことから、AhRによる遺伝子発現誘導には非メチル化状態のXREのみならず、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変化が必要と推測された。

主論文

β -naphthoflavone-induced upregulation of *CYP1B1* expression is mediated by the preferential binding of aryl hydrocarbon receptor to unmethylated xenobiotic responsive elements (三浦利貴, 他4名と共著) .

(β ナフトフラボン誘導性CYP1B1遺伝子発現は芳香属炭化水素受容体の非メチル化異物応答配列への優先的な結合により制御される)

Experimental and Therapeutic Medicine 22巻, 6号 (2021) .

参考論文

- 1) Recent progress in prediction systems for drug-induced liver injury using *in vitro* cell culture (小澤正吾, 他3名と共著) .

(*in vitro*細胞培養による薬剤性肝障害予測システムの最近の状況)

Drug Metabolism Letters 14巻, 1号 (2021) : p25-p40.

- 2) Cellular irinotecan resistance in colorectal cancer and overcoming irinotecan refractoriness through various combination trials including DNA methyltransferase inhibitors: A review (小澤正吾, 他2名と共著) .

(大腸癌におけるイリノテカン耐性とDNAメチル基転移酵素阻害剤を含む様々な併用試験によるイリノテカン不応答性の克服: 総説)

Cancer Drug Resistance 4巻, 4号 (2021) : p946-p964.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐塚 泰之 (医療薬科学講座創剤学分野)
副査 教授 大橋 綾子 (生物薬学講座生体防御学分野)
副査 教授 杉山 晶規 (医療薬科学講座衛生化学分野)

論文審査の結果の要旨

申請者の学位論文タイトルは「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」である。核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AhR) は転写因子として働き、ヒト薬物代謝酵素である Cytochrome P450 (CYP) family (CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1) の発現誘導に関与する。本研究では、AhR を介した遺伝子発現誘導経路において DNA メチル化の役割を明確にするため、 β -naphthoflavone 曝露による遺伝子発現の誘導が DNA 脱メチル化により増強されるヒトがん細胞モデルを探索、xenobiotic responsive element (XRE) 上のメチル化が AhR と XRE 配列との親和性を低下させる可能性を考え、非メチル化状態の XRE 配列と AhR の結合による CYP1 遺伝子発現誘導の証明を試みた。

ヒト肝臓がん細胞、肺がん細胞を対象に免疫沈降法と DNA メチル化解析を合わせた新しい手法により、AhR が非メチル化状態の XRE2/XRE3 と選択的に結合して CYP1B1 遺伝子発現を誘導することを明らかにした。申請者の方法は、既存法とは異なり細胞内の自然なクロマチン状態での結合選択性を評価できることが特長であり、他の転写因子解析への応用が期待される。更に、ヒトの肝臓、肺、乳腺の正常組織に比べ、CYP1B1 遺伝子発現量はがん細胞において約 2 倍の個体間変動が確認され、XRE3 のみならず遺伝子上流の各 CpG 配列上のメチル化状態の変動の相加的な影響を示唆した。局所的な DNA メチル化と遺伝子発現との関連性をヒト由来生細胞内で初めて明らかにした本研究は、テーラーメイド医療への展開・貢献が期待される。

試験・試問の結果の要旨

申請者は、学位論文の内容が多く発表時間内に収まらないため、他分野の研究者にも分かるように研究の意義や作業仮説を明確に提示した上で研究成果を厳選し、わかりやすく構成された発表を行った。薬剤師としてのがん治療への強い関心のもとに本研究テーマを設定しており、全体像も良く伝わる発表であった。非常に活発な質疑応答があり、質問された専門的な内容についても適切に対応できていた。適宜質問の意

味を問い直すなど、質問者へ誠実に対応しようとする姿勢がみられた。中間報告まで取り組んできた実験を中止し、新技術を活用した研究方法へと転換した経緯に関する回答では、申請者の研究に対する理解力と軌道修正力を評価できるものであった。

本研究で開発した新規の方法や研究結果の医療への応用に関する将来像などの説明できた点から、博士の最終試験としても評価できるものであり、博士に求められる「新規性」「独創性」についても十分に主張できていた。

以上の点より、最終試験に合格と判断し、博士（薬学）の学位にふさわしいものと考えらる。