

審査の結果の要旨

氏名 今井 寛己

薬物トランスポーターは医薬品を含む低分子化合物の細胞内外への輸送を司る膜タンパク質であり、一部は肝臓や腎臓など組織特異的に発現し、基質薬物の組織分布および排泄経路の決定因子となる。組織特異的な遺伝子の転写制御において、転写因子ネットワークと協調して発現を制御するメカニズムである、DNAメチル化およびヒストン修飾からなるエピジェネティクス系の果たす役割が注目を集めている。DNAのメチル化はCpG配列中のシトシン残基がターゲットとなり、メチル化DNA結合タンパク質(MBD)やヒストン脱アセチル化酵素などの結合を介して、近傍の遺伝子の転写因子による活性化を妨げる。従って、遺伝子発現はDNAメチル化と負に相関することになる。腎特異的に発現し、薬物の腎排泄・尿酸の再吸収に働く、OAT1、OAT3、OAT4およびURAT1の転写は転写因子HNF1により制御されている。一方で、本転写因子は肝臓では肝特異的トランスポーターの発現も制御している。私が主宰する分子薬物動態学教室では、こうした転写因子とその標的遺伝子の発現との乖離は、組織間のDNAメチル化状態が異なることで説明できることをこれまでに報告してきた。腎臓の個々の遺伝子ではこのように情報が蓄積されつつあるものの、肝臓など他の組織における組織特異的発現制御へのエピジェネティクス系の寄与については明らかでなかった。申請者は、トランスポーターの発現には広くエピジェネティクス系が関与していると仮説を立て、生理的条件下で組織特異性を示すトランスポーター、特に肝臓特異的トランスポーターならびにOatp/OATP遺伝子群に焦点を当て、mRNA発現とDNAメチル化との相関について検討した。さらに、トランスポーターOATP1B3に焦点を当て、がん由来細胞における新規バリエーションのmRNA発現制御へのDNAメチル化の関与について検討した。研究の詳細を以下に示す。

第1章では、申請者は組織特異性を示すトランスポーターのDNAメチル化による発現制御機構の解析を行った。D-REAMは、制限酵素HpyCH4IVがメチル化感受性であることを利用して、その認識配列(ACGT)のDNAメチル化状態をゲノムワイドに解析し、組織間でDNAメチル化状態が異なる箇所(T-DMR)を探索する手法である。マウスSolute carrier (SLC)トランスポーター全297遺伝子、ATP binding cassette (ABC)トランスポーター全49遺伝子を対象とし、肝臓で低メチル化が示唆される(T-DMRtag(肝>腎)を持つ)遺伝子をD-REAMでスクリーニングした結果、64遺伝子がT-DMRtagを保有していることを見出した。これらのうち、特に肝臓特異性が高く、生体内で内因性基質・異物の解毒代謝に重要な役割を果たしているトランスポーター(*Oatp1b2*, *Ntcp*, *Bsep*, *Abcg5*および*Abcg8*)、腎臓および大脳特異的な発現を示す*Pept2*

について、以下の解析を行った。Bisulfite sequencing 法により、転写開始点近傍の DNA メチル化状態を解析したところ、各肝臓トランスポーターは肝臓では低メチル化状態、腎臓および大脳では高メチル化状態であり、*Pept2* は肝臓では高メチル化、腎臓および大脳では低メチル化状態であり、いずれも発現の有無と一致していた。

マウス *Oatp1b2* のヒトオースログである *OATP1B1* および *OATP1B3* は 12 番染色体の *OATP1* クラスターに位置し、いずれも肝臓特異的な発現を示す。重要な転写因子として *HNF1α* が同定されているが、上述のように *HNF1α* は肝臓以外にも発現していることから、本転写因子のみが肝臓特異的な発現を制御しているわけではない。そこで申請者はこれらのトランスポーターについてもエピジェネティクス系が組織特異性を制御していると仮定し、DNA メチル化解析を行った。その結果、*OATP1B1* および *OATP1B3* の転写開始点近傍のメチル化状態は、mRNA 発現の組織特異性とよく一致していた。

D-REAM では、制限酵素の認識配列以外のメチル化状態は検出できないという限界がある。申請者は、上記で得られた、*Oatp1b2* が T-DMR を持つという知見に基づき、同一染色体上でクラスターを形成している *Oatp1* 遺伝子群 (*Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1a6* および *Oatp1c1*) に解析対象を拡張した。各アイソフォームは、*Oatp1b2* 同様に正常組織での発現は限局されており、内因性および外因性物質の輸送に必須の役割を担っている。*Oatp1b2* は上述の通り肝臓に、*Oatp1a6* は腎臓に、*Oatp1c1* は大脳に、*Oatp1a1* は肝臓および腎臓に、*Oatp1a4* は肝臓および大脳に発現している。各遺伝子の転写開始点近傍の DNA メチル化状態を解析したところ、各発現組織では低メチル化状態であり、mRNA 発現の結果とよく一致していた。

以上の結果から、多くの *Slc/Abc* トランスポーター、特に *Oatp1b2*, *Ntcp*, *Bsep* および *Abcg5/g8* の肝臓特異的な発現、同一の染色体上でクラスターを形成している *Oatp/OATP* の組織特異的発現にはエピジェネティック系が関与していることが示唆された。

第 2 章では、申請者はがん由来細胞におけるトランスポーター *OATP1B3* の DNA メチル化による発現制御機構の解析を行った。上記で解析したトランスポーターの一つである *OATP1B3* は、生理的条件下では肝臓特異的に発現する一方で、多くの腫瘍組織やがん由来細胞株において発現が亢進していることが知られている。*OATP1B3* の発現と乳がん患者の生存率が相関することも報告されており、その発現はがんを特徴づける重要な要因の一つと考えられているものの、発現制御メカニズムはほとんど知られていない。これまでの私が主宰する分子薬物動態学教室での検討から、*HepG2* 細胞など一部のがん由来細胞で DNA メチル化酵素阻害剤の添加により *OATP1B3* の発現誘導が認められることから、その発現メカニズムの一部には、DNA メチル化が関与していることが示唆されている。しかし、一部の細胞 (*PK-8* および *PK-45P*) では、*OATP1B3* mRNA を高発現する一方で、転写開始点近傍が高度にメチル化しているという矛盾点も認められていた。

そこで申請者は、これらの細胞は *OATP1B3* の異なる転写開始点を利用しており、その発現には DNA メチル化が関与しているという仮説を立て、新規バリエーションの同定、発現メカニズム解析、機能解析を行った。

5'-RACE 法により PK-8 細胞の転写開始点を同定したところ、多くのクローンの転写開始点は *SLCO1B3* のエクソン 2 とエクソン 3 の間に位置し、Cancer type *OATP1B3* (Ct-*OATP1B3*) の mRNA を生成していることが明らかとなった。mRNA 発現プロファイル調べたところ、いずれのがん由来細胞でも Ct-*OATP1B3* が主要なバリエーションとして発現していた。新たに同定した転写開始点近傍の DNA メチル化状態を解析したところ、各種がん由来細胞および正常組織の mRNA 発現の有無とよく一致していた。また、転写開始点近傍が高メチル化状態であった HepG2 および Caco-2 細胞に DNA メチル化酵素阻害剤を添加したところ、Ct-*OATP1B3* の mRNA 発現量は濃度依存的に上昇した。さらに、HepG2 および Caco-2 細胞の各種メチル化 DNA 結合タンパク (MBDs) を siRNA でノックダウンしたところ、Ct-*OATP1B3* の mRNA 発現量は MBD2 のノックダウンで顕著に増加した。以上の結果から、Ct-*OATP1B3* の発現制御には MBD2 を介した DNA メチル化が関与していることが示された。

今回同定した Ct-*OATP1B3* は、正常型の *OATP1B3* とは N 末端が異なるものの、疎水性プロットの結果から、トランスポーターに特徴的な 12 回膜貫通領域は保存されていると推定された。そこで申請者は Ct-*OATP1B3* が細胞膜上に分布し、輸送機能を保持していると仮説を立て、細胞内局在の検討、*in vitro* 輸送実験を行った。Ct-*OATP1B3* を HEK293 細胞に強制発現させた後、各種細胞内小器官のマーカーと免疫蛍光細胞染色を行ったところ、 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ とのみ共局在を示したことから、Ct-*OATP1B3* は細胞膜上に存在することが示された。さらに、HEK293T 細胞に一過性発現させた Ct-*OATP1B3* は、代表的な *OATP1B3* 基質 (エストラジオール- 17β -D-グルクロニド、フルバスタチン、リファンピシンおよび Gd-EOB-DTPA) に対する輸送活性を保持していることが明らかとなった。

以上の結果から、がん由来細胞では Ct-*OATP1B3* が特異的に発現し、輸送機能を保持していること、その発現制御には MBD2 を介した DNA メチル化が関与していることが示された。

申請者は本研究において、肝臓特異的に発現する多くのトランスポーターや、同一の染色体上にクラスターを構成しているトランスポーター *Oatp/OATP* の正常組織における発現には DNA メチル化が関与していることを示唆するデータを得た。このようなエピジェネティックプロファイルの個人間差や疾病時の情報を蓄積していくことで、薬物の体内動態の精密な予測が可能になると期待される。さらに申請者は、がん特異的なバリエーション Ct-*OATP1B3* は輸送機能を保持しており、その転写は DNA メチル化により制御されていることが明らかになった。Ct-*OATP1B3* は基質となる抗がん剤や造影剤のがん細胞へのデリバリーにも利用できる可能性がある。また、

Ct-OATP1B3 の DNA メチル化解析はがんの予後診断にも役立つ優れたマーカーになる可能性がある。本研究で得た知見は、がんの治療や診断に重要な情報を与えるものと考えられる。よって、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。