循環器薬物応答性の個人差に関係するチトクロームP450の遺伝子多型

5. CYP3A4 遺伝子発現調節と循環器薬物治療

家入一郎*

SNPsに加え、表現型に多様性をもたらす遺伝子発現制御機構として、アレル不均等発現がある。2本の対立遺伝子が異なる発現レベルを示す現象である。ヒト肝臓におけるCYP3A4遺伝子の発現の偏りをみると、2本の対立遺伝子が均等に発現する個体から父親あるいは母親由来の遺伝子のみが発現する個体まで幅広く分布する。2本の遺伝子の発現比率と肝臓に発現するCYP3A4総mRNA量や*in vitro*代謝活性との相関をみると、両者には良好な正の相関が認められる。これよりCYP3A4の発現の偏りが、個人差解明の指標となる可能性が示唆される。アレル不均等発現は、新規の遺伝情報として期待される現象である。(心電図, 2006; 26: 223~228)

I. はじめに

チトクロームP4503A4(CYP3A4)は現在臨床で使われている全医薬品の50%以上の代謝に関与し、主要臓器である肝臓での発現量やヒトでの代謝活性には数倍から数十倍の個人差が認められている。医薬品の適正使用にはCYP3A4活性の個人差解明が不可欠であることから、現在までに翻訳領域や非翻訳領域の多型解析が精力的に行われてきた。その結果、

数多くの変異が同定されたものの、人種差に加え、いずれの変異の頻度も低く、遺伝子多型からの個人差解明には至っていない。

Single nucleotide polymorphism(SNP)に加え、表現型の多様性をもたらす遺伝子発現機構としてゲノムインプリンティングなどの現象が報告されている。ゲノムインプリンティングとはDNAの塩基配列に変化を与えないエピジェネティックな機構により、父親あるいは母親由来の遺伝子が均等ではなく、偏った発現レベルを示す現象である。

近年、インプリンティング遺伝子以外にも、対立遺伝子が異なる発現レベルを示し、その発現の偏りが個体間で異なる遺伝子の存在が報告された¹⁾。その後の研究から、このような遺伝子が想像以上に多く存在することが明らかとなった²⁾。対立遺伝子の

Keywords

- チトクロームP4503A4
- アレル不均等発現
- エピジェネティクス

*九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野
(〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

発現の偏りから, allelic expression imbalance, allelic variationといった表現が用いられる。

我々はアレル発現の偏りに注目したCYP3A4の個人差解明を試みた³⁾。まず, 非翻訳領域やイントロンを含むCYP3A4遺伝子領域の多型解析を行うことで, 機能に關与するSNPsの有無を検討した。その過程で得られた頻度の高いSNPsをマーカーとして, ヒト肝臓での発現の偏りを数値化するとともに, CYP3A4遺伝子がインプリンテイング遺伝子か否かを明らかとした。さらに, 発現の偏りと遺伝子発現量や活性との関連を評価したので紹介する。

II. CYP3A4 遺伝子多型解析

白人のCYP3A4 mRNA発現量とテストステロン6 β -水酸化活性の高い肝臓4検体と著しく低い4検体から抽出したDNAを試料に, イントロンを含むCYP3A4遺伝子の全領域ならびに5', 3'-非翻訳領域, 計約60,000 bpにわたる領域で多型解析を行った。その結果, 従来の研究報告と同様に翻訳領域にはSNPsはみられなかった。

一方, 本検討では非翻訳領域に約50種類のSNPsを同定したが, 両群に特徴的な変異やそのパターンはなく, 発現量や活性を説明するSNPsは認められなかった(図1)。発現の偏りを評価するためには, 高頻度なヘテロ型SNPsをマーカーとする必要がある。白人, 日本人, アフリカ系米国人より得たDNAを試料として変異の頻度を検討した結果, 78013C>Tと78649C>T変異のヘテロ型頻度がいずれの人種においても50%以上と高かったことから, 両変異を偏りのマーカーとし, 以下に検討を進めた。

III. ヒトリンパ芽球におけるインプリント解析

家系情報が明確なヒトリンパ芽球を使用し, CYP3A4遺伝子がインプリンテイング制御を受けるか否かを検討した(図2)。まず, DNAにヘテロ型変異を有する子供の各アレルの親起源の特定をPCR-RFLPにより行う。次に同様な方法によりcDNAに

発現する遺伝子の親起源を明らかにする。

その結果, C1のcDNAには母親由来のTアレルのみの発現がみられるものの, C2では父親由来のAアレルの優位な発現が認められる。C1とC2の同胞間で親起源が異なることから, 片側アレルの発現ではあるもののCYP3A4遺伝子はインプリンテイング遺伝子ではないと考えられる。

さらに, 発現の偏りが遺伝するか否かを検討した。DNAでヘテロ型変異を有する父親のcDNAでの発現状況を検討した。その結果, cDNAにおいて不活性な父親由来のCアレルがC1に, また活性のある父親由来のAアレルがC2に遺伝されていることから, 発現の偏りは親から子へ遺伝することが示唆された。

IV. ヒト肝臓におけるアレル発現の偏り

本検討で使用したマーカーSNPsの詳細を図3に示す。78013C>T, 78649C>T, 82266G>Aはいずれもイントロンに存在し, それぞれMnl I, Aci I, Afa Iで消化される。それぞれの変異を含む領域をPCRで増幅後, 制限酵素処理する。次に, 3%アガロースゲルにて泳動し, SYBR Green I染色を行う。本解析ではそれぞれのアレルの親起源は不明であるが, 両アレルの発現量をバンド強度として得ることができ, それぞれのアレルのバンド強度を蛍光イメージアナライザーで数値化した。アレル発現の偏りは, allelic expression ratio(AER)で表現した。AERは発現量の少ないアレルのバンド強度を優位な発現を示すアレルのバンド強度で除した値とした。2本のアレルの発現が等しい検体ではratioは1となり, アレルの発現に大きな偏りがある場合には0に近づく。コントロールとしてゲノムDNAのPCR産物を用い, DNA検体でのアレルのバンド強度比を1:1として補正することで, cDNA由来のAERを算出する。

図3に示すように, アレル発現解析のマーカーはイントロン上のSNPsであるため, heterogeneous nuclear RNA(hnRNA)由来のcDNAを試料とした。cDNAへのゲノムDNAの混入は両アレルの増幅を招き, 正確な発現解析の妨げになることから, 逆転

図1 CYP3A4遺伝子を含む領域の多型解析

CYP3A4遺伝子を含む60 kbを探索した。R, Vはそれぞれ野生型, 変異型を意味する。CYP3A4遺伝子の翻訳領域には変異は認められなかった。

写反応前にHae III, Mbo IIによる処理を加えることで、2本鎖であるゲノムDNAのみを断片化した。RTを加えないRT-PCR産物をネガティブコントロールとし、ゲノムDNAの混入がないことを確認した。なお、ヒト肝臓におけるCYP3A4 hnRNAとtotal mRNAとの関連を事前に評価した結果、両者には良好な正の相関を認めた。したがって、hnRNAの定量値はmRNA発現量を良好に反映するといえる。

マーカーSNPsをヘテロ型で有するヒト肝臓から抽出したcDNAとゲノムDNAを使用し、AERのばらつきを検討した。解析の結果(図4), HHL-12では両アレル間の発現に大きな偏りがみられるものの、HHL-14ではほぼ均等な発現が認められる。図4には18検体での結果を示したが、検体間での大きなばらつきがみられる。

図2 リンパ芽球における *CYP3A4* 遺伝子発現

同胞 (C1, C2) で片側アレルの発現がみられる (cDNA)。しかし、その親起源は C1 では母親由来、C2 では父親由来であることが分かる。親起源が異なることから、発現に偏りがあるものの、*CYP3A4* 遺伝子はインプリンティング制御される遺伝子ではないと考えられる。

図3 マーカー SNPs の詳細

ゲノムでは、アレルの不均等発現はみられないので、両アレルが均等に発現する。一方、RT (+) をみると、HHL-12 では C アレルの発現がみられない。これに対して、HHL-14 では、ゲノムと同様に両アレルがほぼ均等に発現している。

V. AER と表現型との関連

ヒト肝臓での AER と *CYP3A4* mRNA 発現量、テ

ストステロン 6 β -水酸化活性との関連を評価した (図5)。その結果、*CYP3A4* mRNA 発現量 ($r^2=0.786$, $p < 0.001$), テストステロン 6 β -水酸化活性 ($r^2=0.541$,

図4 ヒト肝臓におけるAERの比較

ヒト肝臓(18検体)でのAERを示した。検体間でばらつく。AERはSNPsと同様に個人の遺伝情報であるが、ばらつきがみられる個々の代謝能を説明する指標として期待される。

図5 AERとCYP3A4 mRNA発現量、テストステロン 6 β -水酸化活性との関連

いずれの場合でも、両者には良好な正の相関が認められる。個々のアレル不均等発現がCYP3A4発現量、活性の指標となることが期待される。

$p < 0.05$), いずれの場合においても, 良好な正の相関を認めた。AERを指標とすることで, 個々のCYP3A4活性の予測が可能であることが示唆される。

VI. おわりに

本検討では, CYP3A4遺伝子にみるアレル間の発

現の偏りをAERで表現し, 表現型の個人差の解明を試みた。AERもSNPsと同様に個人の遺伝情報であるが, 図4に示すように個人間で大きなばらつきを示すことから, 定量的な遺伝情報と期待される。さらにAERを用いることで, 個々の表現型を精度よく予測する可能性が示唆された(図5)。

筆者が知る範囲では、アレル間の発現の偏りは、2002年ごろから報告される現象であり、ヒト生体中での意義については、ほとんど明らかにされていない。その後、多くの遺伝子が同様の現象を示すことが明らかにされた。興味あることに、*CYP3A4*と同じ分子種に属する*CYP3A5*遺伝子の肝臓での発現にもアレル間の発現の偏りが存在することが、最近Wojnowskiらにより報告されている⁴⁾。残念ながら、ヒトでの機能評価と直接関連した報告ではないが、*CYP3A*分子種で認められている点が注目される。

アレル間の発現の偏りの機序は不明であるが、両アレルが均等に作用されないことから、cis-acting factorの関与が考えられる。そのなかでは、シトシンのメチル化による発現抑制が一つの機序としてあげられる。今後、これらのメカニズム解明がその臨床

応用には欠かせない。

【文 献】

- 1) Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW : Allelic variation in human gene expression. Science, 2002 ; 297 : 1143
- 2) Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, Lee MP : Allelic variation in gene expression is common in the human genome. Genome Res, 2003 ; 13 : 1855 ~ 1862
- 3) Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K : Allelic expression imbalance of the human *CYP3A4* gene and individual phenotypic status. Hum Mol Genet, 2004 ; 13 : 2959 ~ 2969
- 4) Wojnowski L, Brockmoller J : Single nucleotide polymorphism characterization by mRNA expression imbalance assessment. Pharmacogenetics, 2004 ; 14 : 267 ~ 269