

審査の結果の要旨

氏名 菊地良太

生体内に投与された薬物の多くは肝臓における代謝・排泄あるいは腎臓における排泄により体内から消失する。肝臓あるいは腎臓選択的に発現するトランスポーター群の基質選択性は、薬物の肝腎振り分けに影響を及ぼす重要な因子である。これらのトランスポーターの発現・機能変動は、基質化合物の体内動態に影響を及ぼす。だが、その発現制御メカニズムについては、肝臓に発現する一部のトランスポーターについて知られているのみである。尿細管上皮細胞を介した物質輸送は糸球体濾過とともに生体異物・内因性物質の尿中排泄・再吸収に重要な役割を果たしている。Organic Anion Transporter 3 (OAT3/SLC22A8) および Urate Transporter 1 (URAT1/SLC22A12) は腎臓近位尿細管に特異的に発現し、それぞれ多様なアニオン性医薬品の血液中から上皮細胞内への取り込み、尿細管腔からの尿酸の再吸収を司っていることが明らかとされてきた。一方で、これらのトランスポーターの発現制御機構については殆ど明らかにされていない。

申請者は hOAT3 と hURAT1 のプロモーター領域について転写因子結合部位の *in silico* 予測を行い、Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) の認識配列と相同性の高い配列が存在することを明らかにした。HNF1 は HNF1 α と HNF1 β の二つの isoform 間で homodimer あるいは heterodimer を形成し、ターゲット遺伝子の転写を活性化することが知られている。これまでの研究により、薬物トランスポーターを含む多くの肝臓特異的遺伝子が HNF1 による転写制御を受けることが明らかとなっているが、本研究において申請者は腎臓に発現する OAT3 および URAT1 も HNF1 による転写制御を受けることを世界で初めて明らかとした。

だが HNF1 は腎臓のほかに、OAT3 や URAT1 の非発現臓器である肝臓・小腸・膵臓などにも発現しており、HNF1 のみでは OAT3 と URAT1 の組織選択的な発現を説明することはできない。申請者は HNF1 による組織特異的発現制御を可能にするメカニズムとして、DNA メチル化を基盤とする遺伝子発現のエピジェネティック制御を仮定した。遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は、近傍のクロマチン領域を凝集させ遺伝子発現を負に制御する。近年、DNA メチル化が遺伝子の組織特異的発現を制御する例が報告されつつあり、トランスポーターの組織特異的発現も同様にエピジェネティックなレベルで制御されている可能性がある。申請者はこれらの点に着目し、トランスポーター発現制御における DNA メチル化の関与を *in vitro*、*in vivo* の実験により明らかとした。

1. HNF1 α/β と DNA メチル化による hOAT3 の発現制御

申請者は hOAT3 のプロモーター領域について、種々 deleted promoter construct を作成し、3 種類のヒト由来細胞株 (HepG2、Caco-2、HEK293) を用いて Luciferase assay を行った。その結果、hOAT3 の minimal promoter は転写開始点上流約 300 bp の領域に位置することを明らかとした。その領域内には、TATA motif および Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) motif

が存在し、これらの motif はげっ歯類の Oat3 遺伝子においても保存されていた。Luciferase assay において、hOAT3 の promoter 活性は HNF1 α および HNF1 β の共発現により顕著に上昇したが、HNF1 β の転写活性化能は HNF1 α よりも低かった。HNF1 motif に変異を導入することにより、HNF1 α/β による転写活性化は低下した。ゲルシフトアッセイにより、hOAT3 promoter には HNF1 α /HNF1 α homodimer および HNF1 α /HNF1 β heterodimer が結合することが示された。また、hOAT3 の promoter 活性は DNA メチル化により抑制されることが明らかとなった。さらに、HNF1 α および HNF1 β を内因性に欠く HEK293 細胞に HNF1 α 単独あるいは HNF1 α と HNF1 β の両者を強制発現させた状態で DNA を脱メチル化することにより、hOAT3 の発現が新たに活性化された。一方で、HNF1 β のみの強制発現では hOAT3 の発現を活性化することはできなかった。これらの結果から、hOAT3 の腎臓特異的な発現には転写因子である HNF1 α /HNF1 α homodimer あるいは HNF1 α /HNF1 β heterodimer と DNA 脱メチル化の協奏作用が必要であることが示唆された。

2. HNF1 α/β と DNA メチル化による hURAT1/mUrat1 の組織特異的発現制御

URAT1 遺伝子の組織特異的発現制御メカニズムを解明するため、hURAT1 および mUrat1 の転写調節機構が解析された。Luciferase assay により HNF1 α および HNF1 β が URAT1 遺伝子の minimal promoter を正に制御していることが示された。またゲルシフトアッセイにより hURAT1 promoter 内の HNF1 motif への HNF1 α および HNF1 β の結合が示された。さらに HNF1 α -null マウス腎臓において、mUrat1 の発現は wild type マウスと比較して低下しており、URAT1 遺伝子の構成的発現に HNF1 α が不可欠であることが明らかとなった。プロモーターの *in vitro* メチル化は、ヒトおよびマウスにおいて URAT1 遺伝子のプロモーター活性を顕著に低下させることが分かった。さらに、*in vivo* において、mUrat1 のプロモーター領域は肝臓および腎臓髄質において高メチル化状態である一方で、腎臓皮質においては比較的低メチル化状態であることが示された。これらの DNA メチル化プロファイルは、近位尿細管特異的な mUrat1 の発現と良く一致していた。

以上のように、申請者は腎臓トランスポーターの発現制御機構を *in vitro*、*in vivo* の実験により解析し、OAT3、URAT1 の転写制御にジェネティックな因子 (HNF1 α/β) とエピジェネティックな因子 (DNA メチル化) が関与していることを明らかとした。OAT3、URAT1 はともに腎臓皮質近位尿細管に特異的に発現するが、HNF1 α/β は腎臓以外にも肝臓・小腸・膵臓等に発現していることが知られている。申請者が得た結果より、この組織分布の不一致は、トランスポーター発現のエピジェネティック制御により説明されることが示唆された。HNF1 motif 自身は DNA メチル化の標的配列である CpG dinucleotide を含まないが、近傍のプロモーター領域のメチル化によりクロマチンが凝集することで HNF1 の結合が妨げられ、DNA メチル化依存的な遺伝子サイレンシングが起きている可能性がある。この HNF1 と DNA メチル化の協調作用により、OAT3、URAT1 の組織特異的発現が確立していること

が示唆された。

本研究において申請者が提唱した、ターゲット遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化プロファイルやクロマチン構造が HNF1 α および HNF1 β のアクセスの有無を決定するというモデルは、HNF1 によって制御されるその他多くの組織特異的遺伝子にも適用可能かもしれない。トランスポーターに限って言えば、HNF1 は OATP1B1/1B3 などの肝臓特異的薬物トランスポーターの転写制御に関与していることが報告されている。これら肝臓トランスポーターのプロモーター領域の DNA メチル化プロファイルについては今後の検討課題であるものの、OAT3/URAT1 の例とは逆に、肝臓では低メチル化、その他の組織では高メチル化状態であることで、HNF1 による組織特異的発現制御を可能にしている可能性がある。プロモーター領域のクロマチン構造と HNF1 α 、HNF1 β の結合の協奏作用は、これらの転写因子による組織特異的な遺伝子発現制御をより深く理解するための重要な手がかりになるだろう。

このように、本研究はこれまで殆ど知られていなかったトランスポーターの組織特異的発現制御機構に関して初めて具体的な知見を得ており、その研究意義はトランスポーター研究に留まらず、より普遍的な遺伝子発現制御という観点からも非常に大きい。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。