

氏名（本籍）	大野 岳	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第136号	
学位授与年月日	平成21年9月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Analysis of single nucleotide polymorphisms in human μ opioid receptor gene and positive transcriptional regulation by poly (ADP-ribose) polymerase-1	
論文審査委員	主査	教授 吉田 正
	副査	教授 辻 勉
	副査	教授 鈴木 勉

論文内容の要旨

< 緒言 >

μ オピオイド受容体 (MOR)の作動薬であるモルヒネは、ガン疼痛緩和医療において優れた鎮痛効果を発揮すると同時に、嘔吐、便秘、呼吸抑制、身体依存などの副作用も有している。モルヒネの薬用量は患者によって異なり、投与量が少なすぎると鎮痛効果は現われずに嘔吐や便秘といった副作用のみ現われ、逆に投与量が多すぎると呼吸抑制などの重篤な副作用を伴う危険性が増す。このため、モルヒネの適正な薬用量を決定することは難しい。

このような薬効・副作用発現における個人差を説明する要因の一つに、一塩基置換遺伝子多型 (SNP) がある。疼痛緩和医療においても、患者の SNP 情報からモルヒネの薬効を予測することができれば、患者に合った最適な投与回数や容量を推定することができ、副作用を最小限に抑えた治療を行うことができると期待ができる。

近年、MOR をコードする遺伝子上に、モルヒネの鎮痛効果や副作用における個人差に関連する SNP や、MOR の発現量や機能を変化させる SNP が報告された。これらの SNP 出現頻度が解析され、MOR 遺伝子の SNP 情報は明らかになりつつある。一方、日本人の MOR 遺伝子においては、エクソン、イントロン領域に存在する SNP の解析は行われたが、転写調節領域について詳細な知見は無い。本研究は、転写調節領域に存在する SNP が MOR の発現量変化に伴うモルヒネの薬効の個人差に影響を与える可能性を推測し、以下の解析を行った。

本論文は、(1)日本人 MOR 遺伝子の転写調節領域に 5 種の SNP を検出し、-1748G/A と -172G/T による新規連鎖不平衡を見出した SNP 解析、(2)-172G/T の

近傍に結合し、塩基置換によって DNA 結合親和性が増加する poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)の検出、(3)PARP-1 の MOR 遺伝子発現促進機構の解析、について記した。

<日本人集団における MOR 遺伝子の SNP 解析>

健常日本人 52 名のゲノム DNA を対象に DNA シークエンス法を用いた SNP 解析を行った。解析領域とした翻訳開始点から 3000 bp 上流までの転写調節領域、各 exon 周辺領域、intron 2 領域に 10 種の SNP (-1748G/A, -1565T/C, -1045A/G, -172G/T, -38C/A, 118A/G, ivs2+31G/A, ivs2+691C/G, 2129A/G, ivs4+148G/A) を検出した。さらに 5%以上の出現頻度を持つ SNP (-1748G/A, -1565T/C, -172G/T, 118A/G, ivs2+691C/G, ivs4+148G/A) を対象に連鎖不平衡係数を算出したところ、-1748A と -172T による連鎖の有意性を認めた。

今回の日本人の MOR 遺伝子を対象とした SNP 解析の結果、10 種の SNP を検出し、過去に報告例の無い -1748G/A と -172G/T による連鎖不平衡を見出した。次に、本研究では MOR 遺伝子の転写調節領域に検出された 5 種の SNP(-1748G/A, -1565T/C, -1045A/G, -172G/T, -38C/A)が MOR 遺伝子の転写調節に与える影響を解析した。

<塩基置換による MOR 遺伝子転写調節への影響>

前項の SNP 解析によって転写調節領域に検出された 5 種の SNP が MOR 遺伝子の転写機構に与える影響を検討した。ヒト神経芽細胞腫株 SH-SY5Y とヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T から抽出した核内蛋白質と、塩基置換部位を中心にして作製した二本鎖オリゴ DNA を用いて electrophoretic-mobility shift assay を行った結果、対象とした 5 種の SNP 周辺領域に対する核内蛋白質の結合を認めた。しかし、-1748G/A, -1565T/C, -1045A/G, -38C/A においては塩基置換による蛋白質結合の変化は認められなかった。一方、-172G/T 配列に結合した核内蛋白質は -172G より -172T に高い結合親和性を示した。さらに -172G/T の塩基置換による転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイによって検討したところ、-172T を含む配列は -172G に比べ、1.6 倍の転写活性を示した。以上の結果から、-172G/T 配列に結合する核内蛋白質は塩基置換によって DNA 結合親和性が上昇し、高い転写活性を示すことから、-172G/T は MOR 遺伝子の転写を増強させる可能性が示唆された。

そこで、本研究では -172G/T 配列に結合する蛋白質を同定した。ビオチン修飾を施した -172T のプローブとアビジンビーズを用いた精製により分離された核内蛋白質を、SDS-PAGE を行った結果、プローブに特異的な分子量約 120 kDa

の蛋白質を検出した。この蛋白質は MALDI-TOFMS を用いた質量分析により、poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) と判明された。さらに非 RI 標識のオリゴ DNA を用いた競合実験から、PARP-1 が -172G/T の 4 から 10 塩基上流までの配列に結合することを確認した。

PARP-1 は核内に存在する分子量 116 kDa の DNA 修復酵素であり、DNA 修復作用以外にも遺伝子の転写調節作用が多く報告されている。本研究の結果から、-172G/T の近傍に結合し、塩基置換によって DNA 結合親和性が増強する PARP-1 と MOR 遺伝子発現機構との関連性を解析することで、-172G/T が MOR 発現に与える影響をより明確にすることができると考え、次の解析を行った。

< PARP-1 による MOR 遺伝子転写調節機構の解析 >

PARP-1 が MOR 遺伝子の転写調節に与える影響を解析するために以下の実験を行った。HEK293T において、PARP-1 過剰発現により -172G/T 配列への結合増加が認められ、さらに MOR 遺伝子の転写活性は 2.5 倍増加した。また、SH-SY5Y において、PARP-1 の酵素活性を阻害する bezamide (BZD) による MOR 遺伝子の発現量の低下を認めた。また、BZD 添加による PARP-1 の -172G/T 配列への結合量の低下は認められたが、PARP-1 の発現量の低下は遺伝子、蛋白質ともに認められなかった。以上の結果より、PARP-1 は MOR 遺伝子の発現を増強させる因子であると考えられる。

さらに本研究では、PARP-1 が TNF- α による MOR 遺伝子発現促進機構への関与を見出した。SH-SY5Y において、PARP-1 の -172G/T 配列への結合は TNF- α により増加し、BZD は、TNF- α による MOR 遺伝子の発現量の増加と PARP-1 の DNA 結合量の増加を抑制した。さらに TNF- α による MOR 遺伝子の転写活性上昇は、-172T は -172G に比べ 2.2 倍の増加を示した。

以上の結果より、PARP-1 が TNF- α などの炎症性サイトカインによる MOR 遺伝子発現促進機構に関与する可能性が示唆され、PARP-1 の DNA 結合親和性を増強させる -172G/T の塩基置換は、TNF- α による MOR 遺伝子の発現増加を増強する可能性が示唆された。

< 結論 >

日本人集団の MOR 遺伝子を対象とした SNP 解析の結果、-1748G/A と -172G/T による連鎖不平衡が認められた。この連鎖は他国における解析では認められていないことから、MOR 遺伝子を対象とした遺伝子解析や臨床研究において、日本人特有な因子として認知される可能性が期待される。

また、-172G/T の近傍に結合する PARP-1 は、MOR 遺伝子の転写を正に調節

し、発現量を増加させる因子であることが判明した。また、TNF- α などの炎症性サイトカインによる MOR 遺伝子発現機構においても一役を担う可能性が明らかとなった。PARP-1 の DNA 結合親和性は-172G 配列より-172T 配列が高いことから、MOR 遺伝子発現は、TNF- α の関与を問わず、-172G/T の塩基置換によって増強されると推察される。

本研究の結果から、-172G/T は、PARP-1 を介した MOR 遺伝子発現を増強させることにより、MOR を介したオピオイド鎮痛薬の薬効の個人差に影響する遺伝的な要因として、ガン疼痛緩和医療における有用な情報になりうると期待される。

論文審査の結果の要旨

μ オピオイド受容体 (MOR)の作動薬であるモルヒネの薬効・副作用発現における個人差を説明する要因の一つに、一塩基置換遺伝子多型 (SNP) がある。MORをコードする遺伝子上に、モルヒネの鎮痛効果や副作用における個人差に関連するSNPや、MORの発現量や機能を変化させるSNPが報告された。これらのSNP出現頻度が解析され、MOR遺伝子のSNP情報は明らかになりつつある。一方、日本人のMOR遺伝子においては、エクソン、イントロン領域に存在するSNPの解析は行われたが、転写調節領域について詳細な知見は無い。まず、健常日本人52名のゲノムDNAを対象にDNAシーケンス法を用いたSNP解析を行った。解析領域とした翻訳開始点から3000 bp上流までの転写調節領域、各exon周辺領域、intron 2領域に10種のSNP (-1748G/A, -1565T/C, -1045A/G, -172G/T, -38C/A, 118A/G, ivs2+31G/A, ivs2+691C/G, 2129A/G, ivs4+148G/A) を検出した。さらに5%以上の出現頻度を持つSNP (-1748G/A, -1565T/C, -172G/T, 118A/G, ivs2+691C/G, ivs4+148G/A) を対象に連鎖不平衡係数を算出したところ、-1748Aと-172Tによる連鎖の有意性を認めた。今回の日本人のMOR遺伝子を対象としたSNP解析の結果、10種のSNPを検出し、過去に報告例の無い-1748G/Aと-172G/Tによる連鎖不平衡を見出した。次いで、SNP解析によって転写調節領域に検出された5種のSNPがMOR遺伝子の転写機構に与える影響を検討した。ヒト神経芽細胞腫株SH-SY5Yとヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293Tから抽出した核内蛋白質と、塩基置換部位を中心にして作製した二本鎖オリゴDNAを用いてelectrophoretic-mobility shift assayを行った結果、対象とした5種のSNP周辺領域に対する核内蛋白質の結合を認めた。しかし、-1748G/A, -1565T/C, -1045A/G, -38C/Aにおいては塩基置換による蛋白質結合の変化は認められなかった。一方、-172G/T配列に結合した核内蛋白質は-172Gより-172Tに高い結合親和性を示した。さらに-172G/Tの塩基置換による転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイによって検討したところ、-172Tを含む配列は-172Gに比べ、1.6倍の転写活性を示した。以上の結果から、-172G/T配列に結合する核内蛋白質は塩基置換によってDNA結合親和性が上昇し、高い転写活性を示すことから、-172G/TはMOR遺伝子の転写を増強させる可能性が示唆された。さらに、-172G/T配列に結合する蛋白質を同定した。ビオチン修飾を施した-172Tのプローブとアビジンビーズを用いた精製により分離された核内蛋白質を、SDS-PAGEを行った結果、プローブに特異的な分子量約120 kDaの蛋白質を検出した。この蛋白質は

MALDI-TOFMSを用いた質量分析により、poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) と判明された。さらに非RI標識のオリゴDNAを用いた競合実験から、PARP-1が-172G/Tの4から10塩基上流までの配列に結合することを確認した。PARP-1がMOR遺伝子の転写調節に与える影響を解析するために以下の実験を行った。HEK293Tにおいて、PARP-1過剰発現により-172G/T配列への結合増加が認められ、さらにMOR遺伝子の転写活性は2.5倍増加した。また、SH-SY5Yにおいて、PARP-1の酵素活性を阻害するbezamide (BZD) によるMOR遺伝子の発現量の低下を認めた。BZD添加によるPARP-1の-172G/T配列への結合量の低下は認められたが、PARP-1の発現量の低下は遺伝子、蛋白質ともに認められなかった。以上の結果より、PARP-1はMOR遺伝子の発現を増強させる因子であると考えられる。

また、本研究では、PARP-1がTNF- α によるMOR遺伝子発現促進機構への関与を見出した。SH-SY5Yにおいて、PARP-1の-172G/T配列への結合はTNF- α により増加し、BZDは、TNF- α によるMOR遺伝子の発現量の増加とPARP-1のDNA結合量の増加を抑制した。さらにTNF- α によるMOR遺伝子の転写活性上昇は、-172Tは-172Gに比べ2.2倍の増加を示した。以上の結果より、PARP-1がTNF- α などの炎症性サイトカインによるMOR遺伝子発現促進機構に関与する可能性が示唆され、PARP-1のDNA結合親和性を増強させる-172G/Tの塩基置換は、TNF- α によるMOR遺伝子の発現増加を増強する可能性が示唆された。

以上、本研究の結果から、-172G/Tは、PARP-1を介したMOR遺伝子発現を増強させることにより、MORを介したオピオイド鎮痛薬の薬効の個人差に影響する遺伝的な要因として、がん疼痛緩和医療における有用な情報になりうると期待され、薬学（博士）論文として相応しいものと判断された。