

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15004

研究課題名(和文) 生体試料中miRNA濃度測定による薬物代謝酵素・トランスポーターの臓器別機能予測

研究課題名(英文) Analysis of miRNA as a novel biomarker for estimating transporter's function in the human organs

研究代表者

家入 一郎 (Ieiri, Ichiro)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臓器別機能予測の解析対象とするトランスポーターとしてBreast Cancer Resistance Protein (BCRP)とOrganic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)を取り上げた。BCRP基質のSASPのAUCと消化管由来exosomal miR-328量の相関解析を行った結果、正の相関を認め、miR-328がバイオマーカーとなることが示唆された。一方、OATP1B1ではmRNA発現量と負の相関を有するmiRNAを同定した。これら成果はmiRNAが臓器内薬物トランスポーターの機能予測に有用であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) for evaluating miRNA expression as a biomarker to predict the activities in the drug transporters. A variant in the breast cancer resistance protein (BCRP) gene, 421C>A is a useful biomarker for describing large inter-individual differences in the pharmacokinetics of sulfasalazine (SASP), a BCRP substrate. However, large intra-genotypic variability still exists in spite of the incorporation of this variant into the pharmacokinetics of SASP. Our study showed that intestine-derived exosomal miR-328 levels positively correlated with SASP AUC0-48. OATP1B1, which is expressed specifically in human liver, mediates the various drugs, such as bile acid and statins. We identified one miRNA which was negatively correlated with OATP1B1 mRNA levels. Our results suggest that miRNA is a novel biomarker for estimating transporter's function in the human organs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬剤反応性 miRNA 生体試料中濃度 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

本研究では、臓器別機能予測の解析対象とするトランスポーターとして Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) と Organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) を取り上げた。

BCRP は胎盤、結腸、小腸、肝臓に高発現しており、ヒト空腸においては排出型薬物トランスポーター P-gp と同等のタンパク質発現量を示すことが報告されている。生体外に基質薬物を排出する生体防御の役割を有しており、消化管では基質薬物を消化管腔側に排出することで薬物の吸収を抑制する。実際、BCRP の基質薬物である抗炎症薬 Sulfasalazine (SASP) や高脂血症薬 Statins の経口バイオアベイラビリティは 30% 以下と低いことが知られている。近年の PGx 研究により、BCRP のタンパク質発現量や BCRP 基質薬物の体内薬物動態に影響を与える ABCG2 421C>A 遺伝子多型 (rs2231142, 141Q>K) が存在することが明らかとなり、この遺伝子多型の変異アリルを有する場合、抗がん剤である Topotecan や SASP のバイオアベイラビリティを増大させることが報告されている。このような事実より、ABCG2 421C>A 遺伝子多型は BCRP 基質薬物の体内薬物動態の個人差要因の一つとして考えられている。しかし、ABCG2 421C>A 遺伝子多型で層別化を行っても、無視できない体内動態の大きな個人差が残る (Figure 1)。

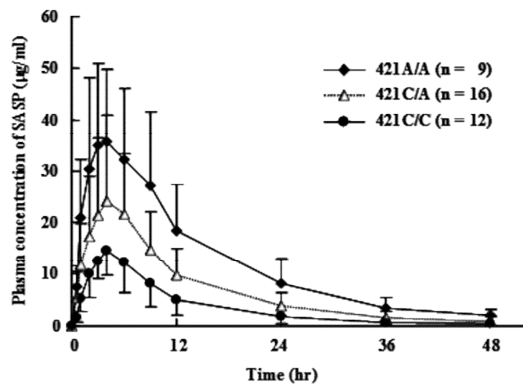


Figure 1 Effect of ABCG2 genotype on pharmacokinetics of sulfasalazine
Plasma concentration-time profiles of SASP after oral administration of a 2,000 mg conventional SASP tablet to 421C/C subjects (closed circles, n = 12), 421C/A subjects (open triangles, n = 16), and 421A/A subjects (closed diamonds, n = 9).

このような大きな個人差は適切な薬物療法の弊害となるため、BCRP に関しては、ABCG2 421C>A 遺伝子多型以外の因子による個人差予測が可能バイオマーカーを見出すことが重要である。しかし、消化管吸収性に影響を与える内因性因子として、この遺伝子多型以外で個人差を予測する有用なバ

イオマーカーは見出されていない。

BCRP のタンパク質発現量は ABCG2 421C>A 遺伝子多型を統一しても、個体間差があり、mRNA との相関もないとの報告があることから転写後の制御機構が BCRP タンパク質発現量に関与すると予想される。転写後制御機構に関わる内在性因子としては、mRNA の分解や翻訳抑制に関わる microRNA (miRNA) があり、miRNA の一つである miR-328 は BCRP 発現を抑制的に制御し、胎盤組織内で BCRP 発現量と負の相関関係にあることを我々は以前報告している (Figure 2)。

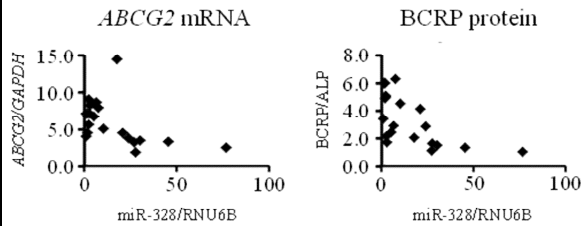


Figure 2 Correlation analysis between miR-328 and ABCG2 mRNA or protein expression levels in the human placental samples (n = 20)

Each ABCG2 mRNA, protein and miR-328 expression level was normalized by minimum value.

mRNA and protein levels showed significantly negative correlation with miR-328 expression levels (mRNA, rs = -0.560, P = 0.00526; protein, rs = -0.730, P = 0.000132).

以上より miR-328 は BCRP 発現の予測バイオマーカーとなる可能性がある。

一方、同じ薬物トランスポーターである OATP1B1 は、肝細胞血管側膜上に特異的に発現している SLC トランスポーターであり、様々な化合物の肝臓への取り込みに寄与している重要なトランスポーターであるが、OATP1B1 基質薬物の体内動態や副作用発現に影響することが報告されている。OATP1B1 の基質薬物であるスタチン系薬剤の副作用にミオパシーや横紋筋融解症などの筋障害が知られているが、体内曝露量が副作用の規定要因になると考えられているため、OATP1B1 機能・発現量の個人差を予測し、重篤な副作用を回避することは非常に重要である。これまでに BCRP 同様、遺伝子多型で被験者を層別化し、スタチン系薬剤の体内動態を検討した報告は複数存在するが、同一遺伝子型内においても無視できない個人差が確認されている。BCRP とは異なり、OATP1B1 発現制御に関連する miRNA はこれまでに報告されていない。

以上より、本研究では BCRP 発現の制御に関与する miRNA 濃度測定によるヒト小腸における BCRP 機能予測を試みるとともに、ヒト肝における OATP1B1 発現制御に関与する

miRNA を同定することで OATP1B1 のヒト肝での機能予測のための準備とする。

2. 研究の目的

本研究では以下2点を明らかにすることを目的とする。

- 血漿中 exosome 内の miR-328 量と消化管 BCRP 機能との関連
- ヒト肝 OATP1B1 発現の個人差要因となる miRNA の同定

3. 研究の方法

ヒト血漿中 exosome 抽出

Sulfasalazine 投与前の血漿検体 600 μ L を 4、15,000 \times g、15 min 遠心分離し、上清を Millex®-LG 0.20 μ m フィルターで濾過した。濾液 200 μ L に ExoQuick Exosome Precipitation Solution 50 μ L を加え 6 回転倒混和した。4、30 min 間静置後、4、1,500 \times g、30 min 遠心分離し上清を除去した。再度 4、1,500 \times g、5 min 間遠心分離し上清を除去したのち、Phosphate buffered saline (PBS) 200 μ L を加え懸濁した。

血漿中消化管由来 exosomes 抽出と miR-328 定量

Dynabeads と Anti-GPA33 抗体混合液をマグネット上に 5 min 静置し、上清除去後、PBS 800 μ L を加え、緩やかに転倒混和した。この洗浄操作を 3 回行った Dynabeads- 抗体複合体に前項の PBS 懸濁液 (血漿中 exosome 含有) を加え、転倒混和による攪拌を行った。攪拌後、4、2 h ローターで緩やかに混合した。混合後、マグネット上に 5 min 静置し、PBS 800 μ L を加え、緩やかに転倒混和した (洗浄)。この洗浄操作を 4 回行い、最後に PBS 100 μ L で懸濁した。得られた懸濁液について RNA 抽出、逆転写反応、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) により miR-328 の定量を行った。試験薬 Sulfasalazine を用いた臨床試験

本研究は、消化管 BCRP 機能予測に対する血漿中 exosomal miR-328 濃度の有用性評価を目的として、健常日本人成人を対象に ABCG2 及び N-acetyltransferase 2 (NAT2) 遺伝子多型を同定する遺伝子診断試験及び Sulfasalazine 単回経口投与試験を実施した。臨床試験プロトコールは、各実施施設の倫理委員会において承認を受け、全被験者から書面によるインフォームドコンセントを得た。なお、本研究は UMIN Clinical Trials Registry に登録されている。(http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm (UMIN000009976))

健常日本人成人 156 名を対象に ABCG2 (421C>A) 及び NAT2 (*4 (野生型)、*5B、*6A、*7B) 遺伝子多型診断を行い、NAT2 変異ホモ型以外を保持する ABCG2 412C>A の遺伝子多型が明らかとなった 34 名 (年齢: 20 - 24 歳、体重: 43.3 - 68.6 kg、BMI: 17.6 - 24.3 kg/m²、野生型 (421C/C) 13 名、変異ヘテロ型

(421C/A) 13 名、変異ホモ型 (421A/A) 8 名) に Sulfasalazine 単回経口投与試験を実施した。12 時間以上絶食後にサラゾピリジン錠 (500 mg \times 4 錠) を水 200 mL とともに単回経口投与を行った。血漿中濃度測定のため、投与前、投与後 0.5、1、2、3、4、6、9、12、24、36、48 時間後に経時的な採血を行った。各時点の血液検体から 4、3,000 rpm、10 min 間の遠心分離により血漿を分取した。血漿検体は、分析時まで -20 以下で凍結保存した。

ヒト肝臓組織内 OATP1B1 mRNA 発現量測定と遺伝子多型

22 検体のヒト肝臓組織を用いて、OATP1B1 mRNA 発現量を qRT-PCR 法により測定した。また、遺伝子多型が OATP1B1 mRNA 発現量に影響を与える可能性を考慮し、qRT-PCR 法と PCR-RFLP 法により遺伝子多型診断を行った。OATP1B1 制御候補 miRNA 探索

OATP1B1 mRNA 発現量を基準にヒト肝臓組織を層別化し、miRNA microarray を行った。miRNA の発現量と群間発現変動率に基準を設け、候補 miRNA の絞り込みを行った。その後、データベースを用いて、OATP1B1 または OATP1B1 発現に関わる転写因子に作用する可能性のある miRNA の絞り込みを行った。

ヒト肝臓組織内 OATP1B1 mRNA、HNF1 mRNA、miR-191p 発現量の相関解析

上記の絞り込みの結果、miR-191p が候補に挙がった。そのため miR-191p 発現量に加え、OATP1B1 との間で介在することが予測された HNF1 の mRNA 発現量を qRT-PCR 法により測定し、相関解析を行った。

ヒト肝臓がん由来細胞を用いた miR-191p 機能解析

ヒト肝臓がん由来細胞 (HepG2 細胞) に miR-191p の mimic と inhibitor を導入し、導入後の HNF1 mRNA 発現量とタンパク質発現量を qRT-PCR 法と Western blotting 法にて測定した。

miR-191p による OATP1B1 転写制御機構の解明
HepG2 細胞に SLC01B1 プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼベクターと miR-191p 発現ベクターを導入し、経時的なルシフェラーゼ活性の変化を Dual-Luciferase® Reporter Assay System にて測定した。

4. 研究成果

ABCG2 421C>A 遺伝子多型が及ぼす SASP 体内動態への影響

BCRP 基質薬物である SASP の体内動態に与える ABCG2 421C>A 遺伝子型の影響を SASP 経口投与後 48 時間の SASP の血漿中濃度推移と体内動態パラメータを用いて評価するため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、SASP 単回経口投与試験で得られた血漿から血漿薬物濃度を測定した。解析の結果、AUC₀₋₄₈ の平均値 (\pm S.D.) は、野生型 421C/C (n = 13)、ヘテロ型 421C/A (n = 12) および変

異ホモ型 421A/A (n = 8) においてそれぞれ、 167 ± 76 , 292 ± 97 及び 525 ± 208 g/h/mL であり、変異ホモ型の AUC_{0-48} は、野生型と比較して、有意な平均値の差が認められ ($P < 0.05$)、SASP 薬物体内暴露量が 3 倍増大することが示された (Figure 3)。この結果は、我々の以前の報告 (Figure 1) と一致するものであった。

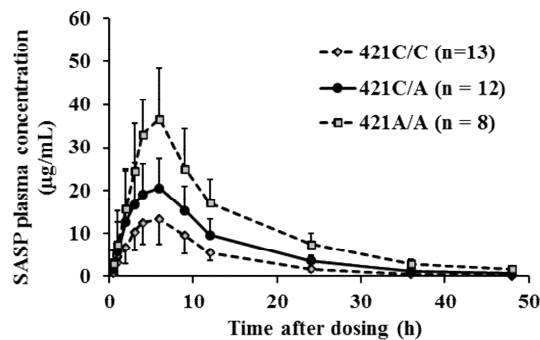


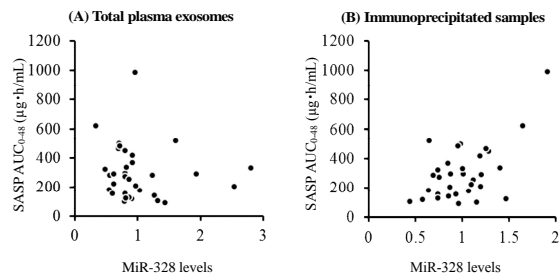
Figure 3 Effect of ABCG2 genotype on pharmacokinetics of SASP.

The mean (\pm S.D.) plasma concentration-time profiles of SASP in different ABCG2 genotype groups after the oral administration of 2,000 mg SASP to 421C/C subjects (closed gray diamonds, n = 13), 421C/A subjects (closed circles, n = 12), and 421A/A subjects (closed gray squares, n = 8).

Exosomal miR-328 量と SASP 体内曝露量の関係

本研究では、消化管 BCRP 機能を予測するバイオマーカーとして、miR-328 が有用であることを評価するため、BCRP 機能の指標と考えられる SASP AUC_{0-48} と消化管由来 exosomal miR-328 量の相関解析を行った。結果、血漿中 exosomal miR-328 は、SASP AUC_{0-48} に対して、相関が認められず ($r_s = -0.157$, $P = 0.382$, Figure 4A)、一方、消化管由来 exosomal miR-328 は、SASP AUC_{0-48} に対して正の相関を認めた ($r_s = 0.346$, $P = 0.049$, Figure 4B)。この結果より、消化管特異的 exosomal miR-328 は、消化管組織以外の他組織由来の exosomal miR-328 を含有する血漿中 exosomal miR-328 と比較し、消化管 BCRP 機能の指標となる SASP AUC_{0-48} に対して、より精度の高いバイオマーカーであることが示唆された。従って、消化管組織内 miR-328 が高発現する場合、消化管 BCRP 発現・機能が低下し、SASP 体内曝露量が高くなると同時に、血漿中消化管由来 exosomal miR-328 量も高くなる可能性が示唆された。

Figure 4 Relationship between miR-328 levels in the total exosomes or intestine-derived exosomes in plasma and SASP AUC_{0-48}



miR-328 levels were normalized with the most stable reference genes selected by geNorm for all samples. Significance was determined by Spearman's correlation test (Total plasma exosomes: $r_s = -0.157$, $P = 0.382$, Immunoprecipitated samples: $r_s = 0.346$, $P = 0.049$).

ヒト肝臓組織における OATP1B1 発現と関連した miRNA の探索

22 検体のヒト肝臓組織を用いた検討の結果、OATP1B1 mRNA 発現量に約 50 倍程度の個人差が確認された。また、OATP1B1 mRNA 発現量に影響する遺伝子多型は確認されなかった。その後、OATP1B1 mRNA 発現量に影響を与える候補 miRNA の探索を行った結果、miR-191x が転写因子 HNF1 の発現を制御し、OATP1B1 の転写を制御している可能性が示唆された。

ヒト肝臓組織における OATP1B1 発現と miRNA 発現との相関解析

miR-191p が OATP1B1 発現量と関連する因子であるか検討するために、ヒト肝臓組織を用いて相関解析を行った。その結果、miR-191p 発現量と OATP1B1 mRNA 発現量との間に有意な負の相関が確認された (Figure 5)。この結果より、ヒト肝臓組織内の miR-1915-3p を測定することで OATP1B1 発現量の予測が可能であることが示唆された。

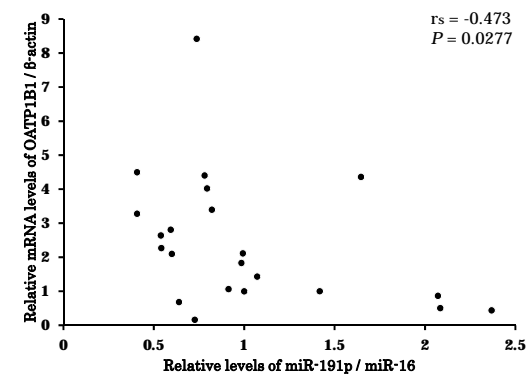


Figure 5 Relationship between OATP1B1 mRNA and miR-191p expression in human livers

miRNA の OATP1B1 発現に対する in vitro 機能解析

miR-191p の mimic と inhibitor を HepG2 細胞に導入した機能解析の結果、HNF1 タンパク質発現量は mimic で約 30% の減少、inhibitor で約 30% の増加が確認された。し

かし、どちらの検討においても mRNA 発現量に有意な変化が確認されなかった。そのため、miR-191p が HNF1 発現を抑制する機構は、mRNA 分解ではなく翻訳阻害によるものであると考えられた。

ルシフェラーゼベクターと miRNA 発現ベクター導入したルシフェラーゼアッセイの結果、導入後 72 時間にて Negative Control ベクターと比較して、miR-191p vector を導入した群の活性が有意に約 40 %低下した。この結果、miR-191p により OATP1B1 の転写活性が低下したことが明らかとなった。

以上の研究結果より、exosome を臓器特異的に分離することで臓器内の薬物トランスポーターの機能予測が可能であることが示唆された。また、miRNA が薬物トランスポーター機能の個人差要因となるメカニズムは、これまで報告のあった BCRP のみならず、ヒト肝における OATP1B1 においても認められたことから、薬物トランスポーターの制御の普遍的な機構である可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Circulating intestine-derived exosomal miR-328 in plasma, a possible biomarker for estimating BCRP function in the human intestines. Gotanda K, Hirota T, Saito J, Fukae M, Egashira Y, Izumi N, Deguchi M, Kimura M, Matsuki S, Irie S, Ieiri I. Sci Rep. 2016 Aug 30;6:32299.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 廣田 豪, 五反田 圭介, 徳本 知子, 深江 真登, 家入 一郎, Sulfasalazine disposition in subject with 376C>T (nonsense mutation) variant in ABCG2 gene, The 11th International ISSX Meeting, 2016.06.15.

2. Takeshi Hirota, Keisuke Gotanda, ICHIRO IEIRI, miRNA-328 on BCRP expression - Transcriptional regulation and clinical application, 19th North American ISSX and 29th JSSX Meeting, 2014.10.

3. Keisuke Gotanda, Takeshi Hirota, ICHIRO IEIRI, Circulating microRNA as a possible novel biomarker for estimating BCRP function in the human intestines, 19th North American ISSX and 29th JSSX Meeting, 2014.10.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

家入 一郎 (IEIRI, Ichiro)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60253473

(2)研究分担者

廣田 豪 (HIROTA, Takeshi)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：80423573

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()