

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K08954  
研究課題名(和文) インスリンによる薬物トランスポーター発現変動機構の解明とその機能変動予測法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of insulin-induced changes in the expression of drug transporters and the establishment of a method to predict the changes in genetic function

研究代表者  
廣田 豪 (Hirota, Takeshi)  
九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80423573  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬物排出型トランスポーターP糖タンパク質(P-gp)発現変動の原因としてインスリンに着目し、インスリンによるP-gp発現変動機構の解明を試みた。HepG2細胞において、インスリンによりP-gpのタンパク質発現量は有意に減少したが、mRNAの変化は認められなかった。翻訳抑制機能を持つmicroRNA(miRNA)のインスリンによる網羅的発現変動解析を行い詳細な検討を行った結果、miRNAがインスリンによるP-gp発現変動の原因であることが示唆された。また、末梢血から肝由来exosomeの分離することができたことから、miRNAをP-gp機能変動のバイオマーカーとして利用できることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は肝臓がんのリスクファクターであることが知られている一方で、肝臓がんに適応のあるドキソルビシンは、P-gpにより排出される。本研究によりインスリンはP-gp発現を低下させ、ドキソルビシンの細胞毒性を増加させることが示唆された。以上より、P-gpの基質薬物を服用する糖尿病患者に対して適切な投与設計を行う必要があると考えられる。また、インスリンによるP-gp発現変化の指標となるバイオマーカーとして肝由来exosomeのmiRNAが有用となる可能性を示唆した。今後バイオマーカーの感度・特異度の検証が重要となるが、糖尿病患者における薬物の個別適正医療実現において重要な研究成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：We focused on the regulation of gene expression by insulin as a mechanism to cause changes in the expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein (P-gp). In human hepatocarcinoma HepG2 cells, insulin significantly reduced the protein expression level of P-gp, but did not alter mRNA. We performed an exhaustive analysis of insulin-induced expression variation of microRNAs (miRNAs) with translational repression functions. Detailed analysis in the regulation of P-gp expression by the identified miRNAs showed that insulin increased the binding of miRNAs to Argonaute 2 (Ago2). These results suggest that up-regulation of miRNA and Ago2 binding is responsible for insulin-induced changes in P-gp expression. We established the method to isolate liver-derived exosomes from peripheral blood, suggesting that miRNA can be used as a biomarker for P-gp functional variation.

研究分野：薬物動態学

キーワード：P糖タンパク質 インスリン microRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

P糖タンパク質 (P-glycoprotein, P-gp) は、ABCB1 遺伝子にコードされる ABC トランスポーターの 1 種であり、ATP の加水分解エネルギーを利用して薬物を細胞外へ排出する。P-gp は、1976 年に Juliano らによって、多剤耐性を獲得したがん細胞膜上において発見され 1)、1990 年代には、小腸や肝臓、腎臓、血液脳関門などの正常組織においても発現することが明らかとなった 2)。基質としては、ドキシソルビシン (doxorubicin, DOX) などの抗がん剤が挙げられ 3)、抗がん剤以外にも非常に幅広い基質認識性を示すため、最も重要な薬物トランスポーターの 1 つとして知られる。

糖尿病は、インスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群であり、本邦における糖尿病患者数は 1,000 万人にも上る 4)。1 型糖尿病は自己免疫疾患が主な要因とされており、インスリンを分泌する膵臓の  $\beta$  細胞が破壊されているため、インスリン療法により治療が行われる。2 型糖尿病は、糖尿病の 90% 以上を占めており、インスリン抵抗性やインスリン分泌異常が原因となる。食事療法や経口血糖降下薬による治療を行うが、治療効果が十分でない場合、インスリン治療を行う。過去の報告で、1 型糖尿病モデルラットにおいて、正常ラットと比べて様々な臓器での p-gp 発現量が変動し、基質薬物の体内動態に違いが生じるということが報告されている 5-8)。1 型糖尿病では、 $\beta$  細胞が破壊されているためインスリン欠乏状態となっており、p-gp 発現量に違いが生じるのは、インスリンが原因である可能性が考えられる。実際に、1 型糖尿病モデルラットにインスリン治療を行うと、p-gp 発現量変動を伴って基質薬物の体内動態が変化しており 9-11)、p-gp 発現量変動にインスリンが関与する可能性は十分に考えられる。しかし、インスリンによる P-gp 発現量変動機構は、ほとんど明らかになっていない。糖尿病状態時は、高血圧や脂質異常症などの様々な合併症を患っていることが多く、幅広い基質特異性を持つ P-gp の基質薬物を服用する可能性が考えられる。高血圧や脂質異常症の治療薬にはアリスケレンやアトルバスタチンなど、P-gp の基質となるものがあり、P-gp 発現量変動に伴う体内動態の変化が予想される。体内動態の変化は、薬効の低下や副作用の発現を引き起こす可能性があり、P-gp 発現量変動機構を解明することは重要である。

近年、遺伝子発現制御を行う機能性 RNA として、microRNA (miRNA) が注目を集めている。miRNA は、18~25 個の塩基からなる non-coding RNA であり、5' 末端から 6~8 塩基の seed 配列が、標的 mRNA の 3'-untranslated region (3'UTR) に結合して mRNA の分解や翻訳抑制を行うことで、標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA は、Argonaute (Ago) に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し、この RISC が標的 mRNA に結合することで、遺伝子発現抑制を示す。現在までに、ヒトでは 2,500 種類以上の miRNA が同定されており、ヒトの全遺伝子産物の 60% 以上が miRNA の制御下にあると言われている。一方、miRNA は血中に安定して存在するためバイオマーカーとしての応用が期待されている。miRNA は exosome という細胞外小胞によって保護され、RNA 分解酵素による分解を免れた状態で血液中に分泌されることが明らかになっており、本研究では肝臓におけるトランスポーター機能を予測するバイオマーカーとして exosome 内の miRNA に注目した。当研究室ではこれまでに、ヒト消化管や結腸上皮細胞に特異的に発現している膜タンパク質である glycoprotein A33 を標的とした免疫沈降法を行うことにより、血液中から消化管由来の exosome を抽出することに成功している。そこで本研究では、当該免疫沈降法を肝臓に応用して血液中から肝臓由来の exosome の選択的な分離を試みた。以上を踏まえ本研究では、インスリンによる薬物トランスポーター P-gp 発現変動機構を明らかにし、薬物トランスポーター機能を制御する miRNA をバイオマーカーとすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 点を研究目的とした。

- (1) インスリンによる P-gp 発現変動機構の解明
- (2) 肝臓における薬物トランスポーター機能のバイオマーカーとしての exosome 分離

### 3. 研究の方法

- (1) インスリンによる P-gp 発現変動機構の解明
  - ① インスリンによる P-gp および ABCB1 mRNA 発現量に対する影響評価  
HepG2 細胞を培地交換し 18 時間後に、タンパク質発現量測定については 1、3  $\mu$ M、mRNA 発現量測定については、0.1、0.3、1、3  $\mu$ M にてインスリンを曝露した。細胞を回収後、western blotting ならびに real-time PCR により P-gp 及び ABCB1 mRNA を定量した。
  - ② インスリンによる P-gp の安定性に対する影響評価  
HepG2 細胞を DMSO に溶解したシクロヘキシミド (CHX) を 50  $\mu$ g/mL にて曝露した。CHX を曝露後 1 時間後、インスリンを 1、3  $\mu$ M にて曝露した。インスリンを曝露してから 48 時間後の HepG2 細胞からタンパク質を抽出し、Western blotting にて P-gp を測定した。
  - ③ インスリンによる ABCB1-3'UTR を介した遺伝子発現制御に対する影響評価  
ABCB1-3'UTR をタンデムに 3 つ組み込んだ pGL3 プロモーターベクターを作成した。同ベクターをトランスフェクトした HepG2 細胞に対して、インスリンを 3  $\mu$ M にて曝露した。インスリンを曝露後 48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。
  - ④ インスリンによる P-gp 発現量減少に関与する miRNA の解析  
ABCB1-3'UTR に結合する miRNA を TargetScan にて解析した結果、当該領域に結合する miRNA

を見出した。そこで、インスリンが miRNA 発現量に与える影響について HepG2 細胞を用いて評価した。

## (2) 肝における薬物トランスポーター機能のバイオマーカーとしての exosome 分離

### ① 血清中からの total exosome の抽出

血液を真空採血管に採取し、遠心して血清を分取した。得られた血清を 1200×g、4 °C で 20 min 遠心し、上清を再度 10,000×g、4 °C で 30 min 遠心して上清を分取した。上清 800 μL を ExoQuick™ のプロトコルに従って処理し、exosome 溶液 1 mL を得た。

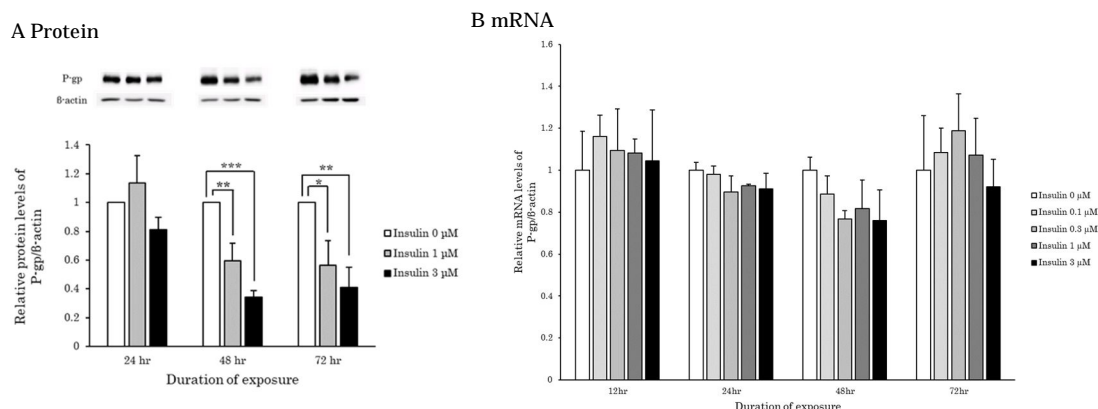
### ② total exosome からの肝臓由来 exosome の分離

Dynabeads® Antibody Coupling Kit のプロトコルに従い、肝特異的抗体を beads に結合させた。total exosome 溶液に beads を加え、ローテーターにより緩徐転倒混和した。その後、洗浄を行い、肝臓由来 exosome を得た。

## 4. 研究成果

### (1) インスリンによる P-gp 発現変動機構の解明

インスリンが P-gp のタンパク質発現量および mRNA 発現量に与える影響を、HepG2 細胞を用いて評価した。その結果、インスリンにより P-gp のタンパク質発現量が最大約 70% 減少したのに対し、mRNA 発現量は有意な変化は見られなかった (Fig. 1)。このことから、インスリンによる P-gp 発現の抑制は、mRNA 発現量減少とは異なる機構で起こることが示唆された。その機構として、mRNA の翻訳抑制または翻訳後タンパク質への影響が考えられた。

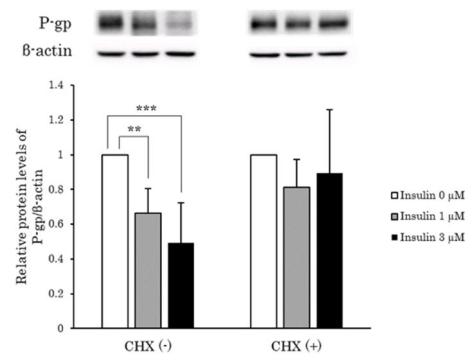


**Fig. 1 Effects of insulin on P-gp and ABCB1 mRNA expression levels in HepG2 cells.**

HepG2 cells were treated with insulin. P-gp levels (A) and ABCB1 mRNA levels (B) were evaluated by western blot analysis and quantitative real-time PCR. Protein levels and mRNA levels were normalized with β-actin levels. Each data represents the mean ± S.D. of 3 independent experiments. *P* values were obtained using Dunnett's test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, compared with group of insulin 0 μM.

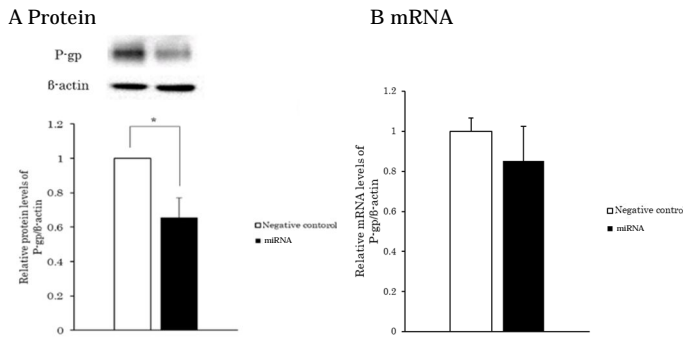
そこで、タンパク質合成阻害剤である CHX を用いてタンパク質安定性試験を行った。CHX は真核細胞リボソームの 60S サブユニットに作用し、伸長反応における転移反応を阻害することで翻訳抑制を行う。CHX 非曝露状態では、Fig. 1A と同様にインスリンによる P-gp 発現量減少が見られたのに対し、CHX を曝露すると、インスリンによる P-gp 発現量の変化は認められなかった (Fig. 2)。CHX により翻訳を阻害した状態では、インスリンによる P-gp 発現量減少は見られなくなったことから、インスリンによる P-gp 発現量の減少には翻訳後の過程ではなく、ABCB1 mRNA の翻訳抑制が関与する可能性が示唆された。

ABCB1-3'UTR を 3 個タンデムに組み込んだルシフェラーゼプロモーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、インスリンによりルシフェラーゼ活性が約 25% 減少した。したがって、インスリンによる P-gp の発現量減少は ABCB1-3'UTR を介して起こることが考えられ、HepG2 細胞に内在的に存在する miRNA が関与する可能性が示唆された。miRNA の機能の評価を行うため、miRNA による P-gp および ABCB1 mRNA 発現量への影響を評価した結果、miRNA の導入によりタンパク質発現量は約 35% 減少した一方で、mRNA 発現量は有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。このことから、miRNA は ABCB1 mRNA の翻訳抑制を介して P-gp 発現量を減少させることが示唆された。



**Fig. 2 Effects of CHX on P-gp expression levels in insulin-treated HepG2 cells.**

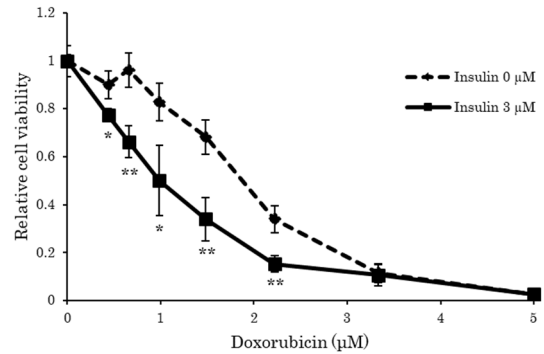
P-gp expression levels were normalized with β-actin levels. Each data represents the mean ± S.D. of 5 independent experiments. *P* values were obtained using Dunnett's test. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, compared with group of insulin 0 μM.



**Fig. 3 Effects of miRNA on P-gp and ABCB1 mRNA expression levels in HepG2 cells.**

HepG2 cells were transfected with miRNA and Negative control at 15 nM. After 72 hr, P-gp levels (A) and ABCB1 mRNA levels (B) were evaluated by western blot analysis and real-time PCR. Protein levels and mRNA levels were normalized with β-actin levels. Each data represents the mean ± S.D. of 3 independent experiments. P values were obtained using Welch's test. \*P < 0.05, compared with group of negative control.

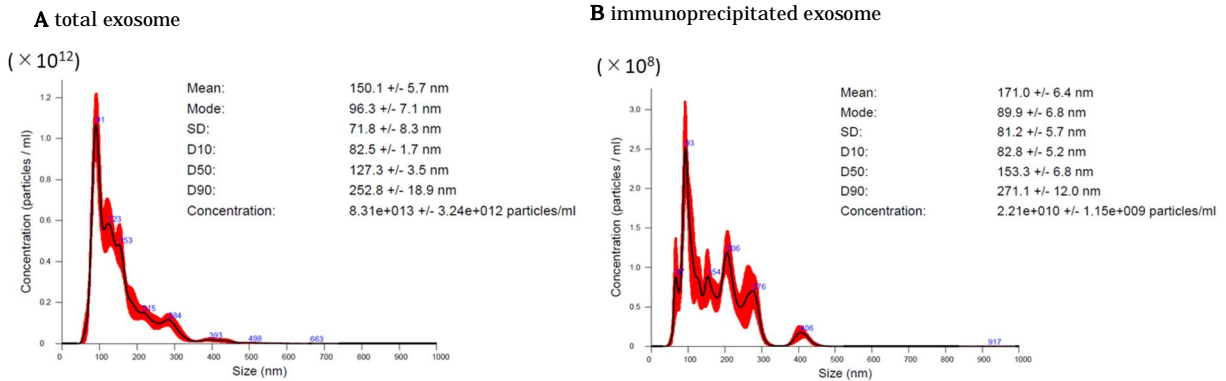
インスリンによる P-gp の発現量減少が基質薬物の薬効及ぼす影響を評価した結果、インスリン曝露により DOX による細胞生存率が最大約 55%低下し、IC50 が約 45%減少した (Fig. 4)。インスリン曝露により細胞内 DOX 蓄積量が増加する結果も得られているため、インスリンによる DOX の薬効増強は、細胞内 DOX 蓄積量の増加によるものであることが明らかとなった。本検討で曝露した DOX の濃度は、DOX 投与患者が実際にとり得る値である。糖尿病患者は健常成人と比べて、肝がんになるリスクが男性で 2.24 倍、女性で 1.94 倍に増加することが報告されており、DOX は肝臓がんに適応があるため、糖尿病患者が DOX を服用する可能性は十分に考えられる。インスリンにより P-gp 発現量が変化することを考慮すると、糖尿病患者では DOX の血中濃度や薬効が健常成人と比べて異なる可能性が考えられる。



**Fig. 4 Doxorubicin-induced cytotoxicity in insulin-treated HepG2 cells**

HepG2 cells were exposed to DOX for 48 hr after 24 hr from insulin treatment. The data represents the mean ± S.D. of 3 independent experiments and are described as the ratio of cell viability of samples without the drug. P values were obtained using Student's t-test. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, compared with group of insulin 0 μM.

(2) 肝における薬物トランスポーター機能のバイオマーカーとしての exosome 分離



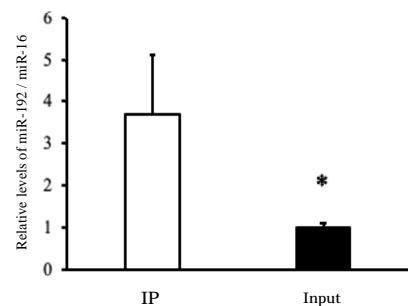
**Fig. 5 Size distribution of the isolated exosomes and immunoprecipitated samples**

Particle size and its concentration in the total exosome (A) and immunoprecipitated fractions (B). These data were obtained from five NTA assays. The black line and the red area represent the fitting curve and the error bar, respectively. The y axis is the concentration of particles. The numbers at the top of the waveform indicated the particle size.

血清中 exosome を抽出後、肝細胞特異的に発現する抗原を標的とした免疫沈降法を用い、血清中に含まれる肝由来 exosome の分離を試みた。得られた血清中 exosome 及び免疫沈降画分について NanoSight を用いた粒度分布測定により exosome を主として含む画分であるかどうかを確認した。その結果、exosome より大きな粒子径である 200-300 nm のピークを認めたと、exosome の示す 100 nm 前後の粒子径が免疫沈降画分において主要な粒子であることを確認した (Fig. 5)。

**Fig. 6 Evaluation of hepatic specificity of immunoprecipitated-exosome using miR-192 levels**

Quantitative real-time PCR was used to quantify miR-192, which is expressed at relatively high levels in the liver. Each column represents the mean ± S.D. (n = 3). \*P < 0.05: statistically different from the Input.



miR-192 は、肝臓に比較的高発現することが報告されていることから、当該 miRNA を用いて免疫沈降画分における肝由来 exosome の濃縮を quantitative real-time PCR 法にて確認した (Fig. 6)。その結果、血清中の total

exosome 画分 (Input) と比較して、免疫沈降画分 (IP) において miR-192 量の有意な増加を認めたことから、肝由来 exosome の濃縮が示唆された。

### (3) まとめ

我々は、薬物排出トランスポーターである P-gp の発現変化を引き起こすメカニズムとして、インスリンによる遺伝子発現制御に着目した。ヒト肝癌細胞 HepG2 細胞において、インスリンは P-gp のタンパク質発現レベルを有意に低下させたが、mRNA は変化しなかった。翻訳抑制機能を有する miRNA のインスリンによる発現変動を網羅的に解析した。その結果、miRNA がインスリンによる P-gp 発現変動の原因であることが示唆された。末梢血から肝由来 exosome を単離する方法を確立したことから、miRNA が P-gp の機能変化のバイオマーカーとして利用できることが示唆された。

### <引用文献>

1. Juliano R, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants permeability. *Biochim Biophys Acta*. 1976;**455**(1):152-162.
2. Cordon-Cardo C, O'Brien J, Boccia J, *et al*. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem*. 1990;**38**(9):1277-1287.
3. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, *et al*. Expression of a full-length cDNA for the human "MDRI" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;**84**:3004-3008.
4. 厚生労働省栄養指導栄養調査係 平成28年国民健康・栄養調査結果の概要.
5. Liu H, Xu X, Yang Z, *et al*. Impaired function and expression of P-glycoprotein in blood – brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res*. 2006;**1123**(1):245-252.
6. Hyun J, Lee A, Oh J, *et al*. Comparative pharmacokinetic study of paclitaxel and docetaxel in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biopharm Drug Dispos*. 2012;**33**(8):474-486.
7. Liu H, Wu B, Pan G, *et al*. Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats. *Drug Metab Dispos*. 2012;**40**(11):2109-2118.
8. Maeng H, Kim M, Jin H, *et al*. Functional induction of P-glycoprotein in the blood-brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for the involvement of nuclear factor-kappaB, a nitrosative stress-sensitive transcription factor, in the regulation. *Drug Metab Dispos*. 2007;**35**(11):1996-2005.
9. Zhang L, Lu L, Jin S, *et al*. Tissue-specific alterations in expression and function of P-glycoprotein in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;**32**(7):956-966.
10. Liu H, Liu X, Jia L, *et al*. Insulin therapy restores impaired function and expression of P-glycoprotein in blood – brain barrier of experimental diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2008;**75**(8):1649-1658.
11. Anger G, Piquette-miller M. Mechanisms of reduced maternal and fetal lopinavir exposure in a rat model of gestational diabetes. *Drug Metab Dispos*. 2011;**39**(10):1850-1859.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Hirota
2. 発表標題 Epigenetic regulation of drug transporter expressions in human tissues
3. 学会等名 The 5th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----