

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03405

研究課題名(和文)生活習慣病に伴う薬物動態変動を反映したバイオマーカーの定量的モデル解析

研究課題名(英文) Quantitative model analysis of biomarkers to predict pharmacokinetic changes associated with lifestyle-related diseases

研究代表者

廣田 豪 (Hirota, Takeshi)

九州大学・大学病院・准教授/副薬剤部長

研究者番号：80423573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：薬物トランスポーターの発現は、糖尿病により変動すると報告されている。グルコース濃度の変動とRNAメチル化機構であるN6-methyladenosine (m6A) 修飾の関連について、in vitro解析を行った。その結果、高濃度グルコース条件下において脱メチル化酵素であるFat mass and obesity-associated (FTO) の発現量が低下し、m6A修飾状態に変動を示す遺伝子としてorganic anion transporterを検出した。FTO制御に関連するmiRNAを特定したことから、血中miRNAをバイオマーカーとすることで、薬物療法の個別適正化への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は様々な疾病の発症率が高く、服用薬が多様化している。本研究にて、高血糖によりRNAメチル化が変動し、その発現量が上昇したorganic anion transporterは、幅広い薬物を基質とする。糖尿病合併症の一種である脂質異常症の治療薬であるスタチンは、一部のorganic anion transporter によって輸送される。同遺伝子の発現変動は、薬効に影響する可能性が考えられる。以上より、高濃度グルコース条件下における薬物トランスポーター発現制御機構を理解することは、多様な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上で有用な情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of drug transporters, which play an important role in pharmacokinetics, are reportedly altered by diabetes. Changes in gene expression based on lifestyle differences depend mainly on epigenetic mechanisms. In this study, therefore, we focused on the RNA methylation mechanism, N6-methyladenosine (m6A) modification. The effect of high glucose concentrations on m6A modification was analyzed in vitro. As a result, the expression of Fat mass and obesity-associated, a demethylase, was significantly reduced under high glucose conditions. Comprehensive analysis revealed variations in m6A modification in organic anion transporter. We identified miRNAs that control the expression of FTO. Using circulating miRNAs as biomarkers is expected to lead to the development of personalized medicine.

研究分野：薬物動態学

キーワード：高血糖 薬物トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は環境要因や遺伝的要因から引き起こされる代謝性疾患であり、本邦における糖尿病患者と予備軍は合わせて 2,000 万人にも上る。2 型糖尿病の進展は、脂質異常症や高血圧、がん等の様々な合併症を誘発するため、糖尿病患者の服用薬は多岐にわたる。過去の報告において、薬物の生体内輸送に関与する薬物トランスポーターの発現量が糖尿病発症により変動することが指摘された [Liu, H. et al. Drug Metab. Dispos. 40, 2109–2118 (2012)]。従って、糖尿病発症に起因する薬物トランスポーターの発現量・活性の変化は、薬物の薬効の低下や副作用を誘発する恐れがあるため、糖尿病発症時の薬物トランスポーター発現変動機構を解明することは適切な薬物治療を行う上で重要であると考えられる。

一方で近年、転写後調節機構として新たに RNA 配列中の一部の塩基に化学修飾が施されるエピトランスクリプトームが注目を集めている。そのうち、特定のアデノシン残基がメチル化される N6-methyladenosine (m6A) は肝臓、小腸、骨格筋細胞など生体内に豊富に存在する内部 RNA 修飾の一種であり、m6A 修飾は messenger RNA (mRNA) の安定性や翻訳効率、スプライシング効率、RNA 局在を変化させるなど、多岐の機能を有することが示されている。これまでに m6A 修飾と疾患の関係が報告されており、例えば m6A 修飾脱メチル化酵素である Fat mass and obesity-associated protein (FTO) 遺伝子上の SNPs は FTO 発現を増加させることで、肥満関連遺伝子の発現量増加を促し、肥満を誘発することが示唆された。また、2 型糖尿病患者は健常人と比較して肝臓内の FTO 発現量が変動することが報告されている。m6A 修飾酵素の発現変動によって、その修飾状態は動的に制御されることから、2 型糖尿病患者における遺伝子発現変動機構に m6A 修飾は重要な影響を与えている可能性が考えられる。しかし、これまでに糖尿病発症によって引き起こされる慢性的な高血糖状態等の生体内環境の変化が m6A 修飾に及ぼす影響については十分に明らかとなっていない。一般的に、2 型糖尿病患者ではインスリン抵抗性が誘発されることで、生体内のグルコース代謝能が低下し、慢性的な高血糖状態が持続する。さらに、グルコースなどの糖類は門脈を通過して肝臓に輸送されるため、糖尿病患者の肝臓は糖に高濃度に曝露されていると考えられる。また、肝臓は薬物代謝の主要な臓器であり、数多くの薬物トランスポーターの発現が確認されており、薬物の体内動態を把握する上で、肝臓内の遺伝子発現機構を明確に把握することは重要であると言える。

本研究では、糖尿病における薬物トランスポーター変動機構の解明を行うことで、生活習慣病による薬物動態変動機構を反映したバイオマーカーについて検討を加えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生活習慣病の一つである糖尿病を想定した高血糖状態が、RNA 修飾を介して薬物トランスポーター発現に及ぼす影響を評価し、薬物動態を予測するバイオマーカーの確立に向けて、当該機構の要因となる miRNA を特定することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、グルコース曝露が m6A 修飾状態に及ぼす影響を評価し、m6A 修飾を介した薬物トランスポーター発現制御機構を解析した。グルコース曝露における m6A 修飾酵素の発現量の定量を行うことで、高血糖状態と m6A 修飾の関係性を評価した。さらに、グルコース曝露により m6A 修飾状態が変動する遺伝子の同定を行うとともに、m6A 修飾を変動させる要因として miRNA 解析を実施した。

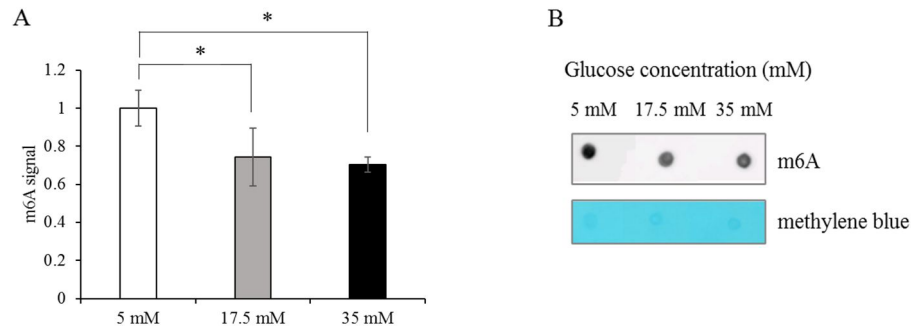
## 4. 研究成果

### (1) グルコース曝露条件下における mRNA 中の m6A 修飾状態の評価

本研究では、低濃度のグルコース培地として 5 mM、高濃度のグルコース培地として 17.5, 35 mM グルコース濃度の培地を用いて HepG2 細胞を培養し、グルコース濃度の変化が遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。m6A dot-blot assay は、mRNA 全体に含まれる m6A 修飾状態を定量することのできる手法である。そこで、グルコース濃度の変化が HepG2 細胞内に存在する m6A 修飾状態に与える影響を m6A dot-blot assay により評価した。その結果、高濃度のグルコース曝露条件下では m6A 修飾頻度の有意な減少が認められた (Fig. 1)。m6A 修飾状態の変動は mRNA の安定性や翻訳効率を変化させることから、グルコース曝露により HepG2 細胞内 m6A 修飾状態の変化によって遺伝子発現が制御されている可能性が考えられる。

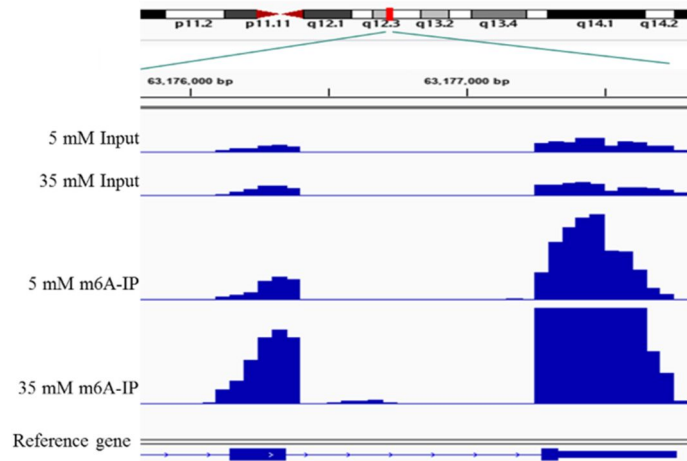
### Fig. 1 Effects of various concentrations of glucose on m6A levels in HepG2 cells

HepG2 cells were cultured in 5, 17.5, 35 mM of glucose media for 24 hr. (A, B) m6A signal was measured by m6A dot-blot assay. m6A signal was normalized to methylene blue stain. Results were expressed as fold increase in HepG2 cells with 5 mM glucose. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*P < 0.05; statistically analyzed using Dunnett's test.



(2) グルコース曝露条件下における m6A 修飾状態の解析による標的 mRNA の探索

高濃度のグルコース曝露は HepG2 細胞内の m6A 修飾状態に影響を与えることが明らかとなった。mRNA 上の m6A 修飾状態が高濃度のグルコース曝露により変動する可能性が考えられる。そこで、グルコース曝露 24 時間後の細胞を回収し、m6A 修飾を特異的に認識する抗体で免疫沈降を行い、次世代シーケンス (Methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) により解析することで、m6A 修飾状態が変化するトランスポーター遺伝子の同定を行った。その結果、高濃度のグルコース曝露時に Organic anion transporter (OAT) 上の m6A 修飾頻度の増加が認められた (Fig. 2)。

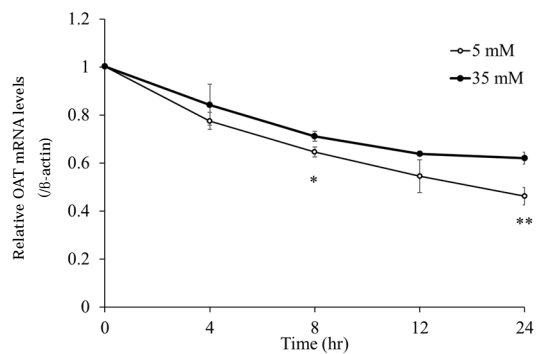


**Fig. 2 Effects of different concentrations of glucose on m6A states in HepG2 cells**

HepG2 cells were cultured in 5, 35 mM of glucose media for 24 hr. Integrative Genomics Viewer (IGV) tracks displaying MeRIP-seq read distribution in OAT mRNA.

(3) グルコース曝露条件下における OAT 遺伝子の転写活性および安定性評価

m6A 修飾は mRNA の安定性を増加させるとの報告があるため、OAT mRNA 発現増加の機構に mRNA の安定性変化が寄与していると考えられる。そこで、OAT mRNA 発現増加の詳細な機構を明らかとするため、各濃度のグルコース曝露下における OAT の転写活性と mRNA 安定性の評価を行った。転写活性の評価は、HepG2 細胞に OAT promoter 配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを導入し、グルコース曝露後 24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行うことで評価した。その結果、グルコース曝露による転写活性の有意な変化は認められなかった。mRNA 安定性の評価は、転写阻害剤である Actinomycin D (ActD) を細胞に曝露後、OAT mRNA 発現量の推移を高濃度グルコース曝露群と低濃度グルコース曝露群で比較することで評価した。ActD 曝露後 0, 4, 8, 12, 24 時間後に細胞を回収し、OAT mRNA 発現量の定量を行った。そ



**Fig. 3 Effects of different concentrations of glucose on the stability of OAT mRNA in HepG2 cells**

HepG2 cells were treated with ActD to inhibit translation and incubated with different concentrations of glucose for 24 hr. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*P < 0.05, \*\* P < 0.01: statistically analyzed using Student's t-test.

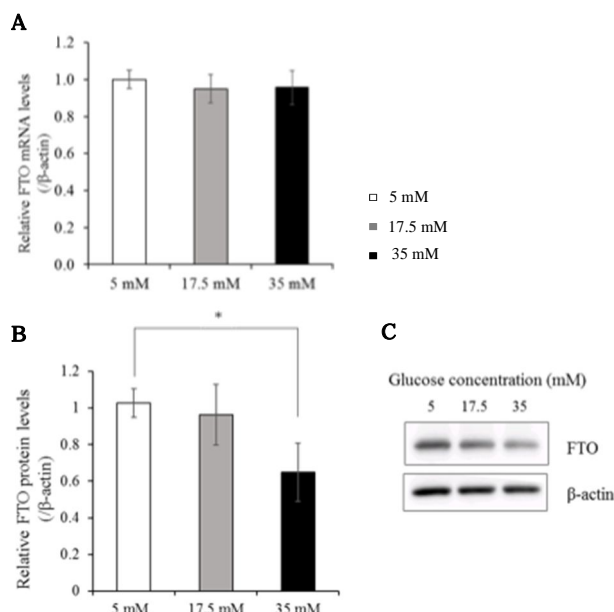
の結果、高濃度グルコース曝露群では低濃度グルコース曝露群と比較して、OAT mRNA の分解が抑制された (Fig. 3)。このことより、高濃度のグルコース曝露による OAT mRNA 発現増加は、mRNA の安定性が向上することにより引き起こされている可能性が示唆された。

#### (4) グルコース曝露条件下における m6A 修飾酵素 mRNA およびタンパク質発現量の定量

高濃度のグルコース曝露は HepG2 細胞内の m6A 修飾状態に影響を与えることが明らかとなった。そこで、HepG2 細胞を各濃度のグルコース培地にて 24 時間培養し、m6A 修飾酵素の mRNA およびタンパク質発現量の定量を行った。その結果、低濃度のグルコース曝露群と比較して、高濃度のグルコース曝露群における m6A 修飾酵素の mRNA 発現量に有意な変化は見られなかった (Fig. 4A)。一方で、脱メチル化酵素である FTO タンパク質発現量が高濃度のグルコース曝露群において有意に減少した (Fig. 4B, C)。FTO mRNA 発現には影響を及ぼさず、タンパク質発現量のみが減少したことから、高濃度グルコース曝露下において、転写後調節機構を介した FTO タンパク質発現量の減少が引き起こされている可能性が示唆された。

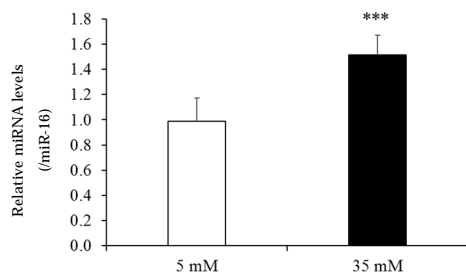
**Fig. 4 Effects of various concentrations of glucose on FTO mRNA and protein levels in HepG2 cells**

HepG2 cells were cultured in 5, 17.5, 35 mM of glucose media for 24 hr. FTO mRNA (A) and protein (B, C) levels were measured by qRT-PCR and western blotting. FTO mRNA and protein levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Results were expressed relative to FTO mRNA or protein levels in HepG2 cells with 5 mM glucose. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \* $P < 0.05$ : statistically analyzed using Dunnett's test.



#### (5) グルコース曝露条件下における FTO タンパク質発現量減少に関する miRNA の探索

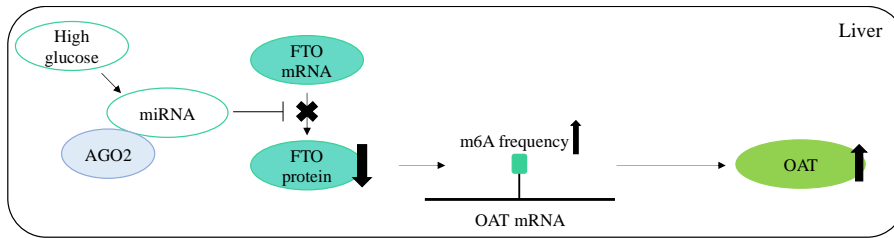
FTO-3'UTR 配列に結合する miRNA を 2 種類のデータベース (TargetScan, miRDB) を用いて解析した結果、8 種類の miRNA が検出された。そのうち、FTO-3'UTR 配列に高い相補性を有し、2 型糖尿病患者の血中において発現量が増加すると報告のある miRNA を見出した (Fig. 5)。当該 miRNA を対象に、高濃度のグルコース曝露後の Ago2 結合 miRNA 量の定量を行った。その結果、miRNA の Ago2 結合量が高濃度のグルコース曝露によって有意に増加することが明らかとなった (Fig. 5)。このことから、高濃度のグルコース曝露によって Ago2 結合 miRNA 量が増加することで、FTO タンパク質発現制御を行うことが示唆された。



**Fig. 5 Effects of different concentrations of glucose on the levels of miRNA co-immunoprecipitated with Ago2**  
HepG2 cells were cultured in 5, 35 mM of glucose media. The levels of miRNA immunoprecipitated with Ago2 were measured by qRT-PCR. miRNA levels were normalized to miR-16 levels. Results were expressed relative to miRNA levels in HepG2 cells with 5 mM glucose. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$ : statistically analyzed using Student's t-test.

#### (6) まとめと今後の展望

以上の結果より、糖尿病発症に伴う高血糖状態は miRNA を介して FTO タンパク質の発現変動を促し、m6A 修飾を促進することで OAT 遺伝子発現を制御することが示唆された (Fig. 6)。今後は、同トランスポーターの基質や薬物の輸送活性に m6A 修飾状態の変動が与える影響を評価することが重要である。また、m6A 修飾の変動メカニズムであることが示された miRNA については、血中より簡易に測定できる特性を持つことから糖尿病時の薬物動態変動のバイオマーカーへの展開が期待できる。



**Fig. 5 Hyperglycemia promotes miRNA-mediated changes in FTO protein expression and regulates OAT gene expression by promoting m6A modification**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣田 豪, 香川 竜希, 家入 一郎
2. 発表標題 RNA メチル化解析による高血糖時のトランスポーター発現変動メカニズムの解明
3. 学会等名 第9回日本くすりと糖尿病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田 豪
2. 発表標題 リキッドバイオプシーを用いた薬物動態個人差の予測とテーラーメイド医療への応用
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田 豪, 家入 一郎
2. 発表標題 リキッドバイオプシーを用いたエピジェネティクス解析の薬物動態個人差予測への応用
3. 学会等名 第5回日本臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田豪, 香川竜希, 家入一郎
2. 発表標題 RNA メチル化解析による高血糖時のトランスポーター発現変動メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------