

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19339

研究課題名(和文) 血漿中miRNA情報を付加した治療薬物モニタリングの個別化精度向上を目指す新展開

研究課題名(英文) Advanced personalized medicine for therapeutic drug monitoring based on quantification of plasma exosomal miRNAs

研究代表者

家入 一郎 (Ieiri, Ichiro)

九州大学・大学病院・大学院担当教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血清由来exosomeが血液脳関門(BBB)における薬物トランスポーター発現を制御することを明らかにした。また、リキッドバイオプシーとしてのexosome内miRNAについても検討を加えた。解析の結果、BBBに強く発現することが知られる薬物トランスポーターMultidrug Resistance Protein(MRP)が、血清由来のexosomeの影響により、その発現が上昇することが示された。またexosomeを用いたmiRNAアレイにより、MRPに作用することが予想されるmiRNAについて、血清由来exosomeとBBB由来細胞においては2倍以上の発現量の差が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物動態の個人差が大きい薬物については、治療薬物モニタリング(Therapeutic Drug Monitoring:TDM)が重要な役割を果たす。その一方で、薬物の標的臓器への分布は、血中濃度からは十分な予測が難しいのが現状である。本研究結果を基盤として、TDM残余検体を用いたexosome内miRNAの定量解析を進めることにより、従来の血中濃度測定に基づくTDMを更に発展させ、exosome内miRNAの解析によりBBBによる薬物トランスポーター機能を予測することで、薬物の脳移行を考慮した精度の高い個別化薬物治療の実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that serum-derived exosomes regulate the expression of drug transporters that contribute to the distribution of drugs to the blood-brain barrier (BBB), and investigated the expression of miRNAs in exosomes derived from serum and BBB cells. Our results showed that the expression of multidrug resistance protein (MRP), a drug transporter known to be highly expressed in the BBB, was increased by the exposure of serum-derived exosomes. In addition, a miRNA array using exosomes detected miRNAs with more than a two-fold difference in expression between serum and BBB. miRNA binding prediction database (miWalk, miRDB, TargetScan) analysis predicted that this miRNA bind to MRP mRNA.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物トランスポーター exosome miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

薬物動態の個人差が大きい薬物については、副作用モニタリングの観点から、治療薬物モニタリング (Therapeutic Drug Monitoring : TDM) が治療技術として確立されている。その一方、TDM は、投与量と血中濃度との関係から、患者個々の薬物動態の推定は可能であるが、具体的に吸収・分布・代謝・排泄過程の詳細を説明することはできない。特に、薬物の標的臓器への分布は、血中濃度からは正確な情報を得ることが出来ないのが現状である。

ヒト脳における薬物分布は、中枢神経系 (CNS: Central Nervous System) における薬理作用および毒性作用に直接関連している。抗てんかん薬をはじめとした様々な薬物で TDM が行われているが、薬物の末梢での血中濃度と作用部位である脳での血中濃度が相関しないことも多いため、投与量から正確な薬効、副作用を予測することは出来ていない。このような脳と末梢での血中濃度の差異が現れる主要な要因として、血液脳関門 (BBB: Blood-Brain Barrier) が挙げられる。BBB は、血液と神経組織間の輸送を制限する物理的および代謝的障壁である。これは、脳組織の生理的環境の安定性を維持し、血液中の有害な薬剤や微生物による侵害から CNS を保護する上で重要な役割を果たしている。BBB の内層は、主に隣接する脳毛細血管内皮細胞間のタイトジャンクションで構成されており、このような物理的な障壁に加えて BBB はトランスポーターを有する生化学的障壁を形成している。BBB の機能異常は、様々な疾患の病因や薬物動態学的異常に繋がることのできるこれまでの研究で明らかになってきている。Leggas らは Multi Drug Resistance Protein 4 (MRP4) が BBB において抗がん剤である topotecan の排出に寄与し、MRP4 欠損マウスでは topotecan が脳組織に蓄積し、細胞毒性が増強することを報告している [Leggas, M. et al. Mol Cell Biol 24, 7612-7621 (2004)]。このように、BBB におけるトランスポーターの発現量やその機能を正確に理解することは、薬の適正使用を推進する上で非常に重要である。しかし、CNS への薬物分布に寄与する薬物トランスポーターが、健康人においてどのように発現制御されているかについては、未だ解明されていない。

BBB におけるトランスポーターの発現を制御している因子として、我々は exosome に着目した。exosome は、細胞から細胞外へと分泌される 30 ~ 150 nm の細胞外小胞体であり、血液や尿、唾液など様々な体液中に存在することが知られている。Valadi らをはじめとした多くの研究者らにより、分泌細胞由来の核酸やタンパク質、脂質などの内在性物質を内包していることが明らかとなった [Valadi, H. et al. Nat Cell Biol 9, 654-659 (2007)]。現在では、exosome は内包する物質を標的細胞内で放出することにより種々の遺伝子発現を制御し、細胞間のコミュニケーションツールとして機能すると考えられている。exosome 内に含まれている核酸のうち、microRNA (miRNA) は、機能性小分子 RNA として広く知られており、遺伝子機能に抑制的に働く。Xu B らは、神経細胞から分泌される exosome が脳血管内皮細胞へ miRNA の一種である miR-132 を輸送し、カドヘリンの発現を制御することで BBB の完全性を維持することを明らかにしている [Xu, B. et al. Cell Res 27, 882-897 (2017)]。このような背景から、我々はヒトの生体内において、exosome に含まれている miRNA が BBB において発現している薬物トランスポーターの発現を制御しており、当該 miRNA を定量することで脳内への薬物移行を予測し、血中濃度に基づく TDM の個別化精度向上に寄与できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、薬物の脳内移行に関与する薬物トランスポーター発現に及ぼす血清由来 exosome の機能を同定し、TDM の個別化精度向上に寄与するバイオマーカーとして、exosome 内 miRNA を解析することである。

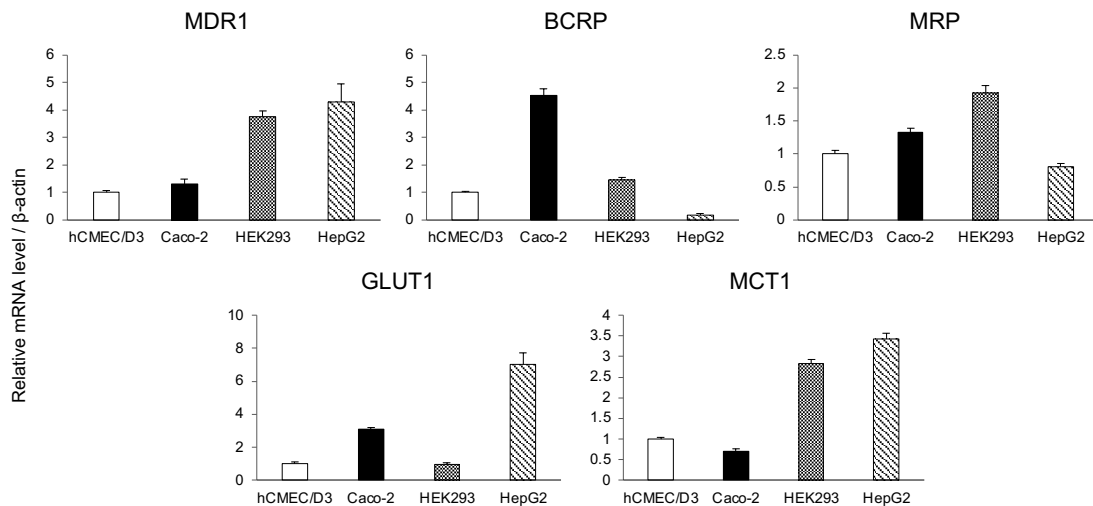
## 3. 研究の方法

ヒト血清由来 exosome を介した BBB における薬物トランスポーターの発現制御機構を、in vitro にて評価することとした。BBB モデルとして、hCMEC/D3 細胞 (ヒト脳微小血管内皮細胞) を評価対象とし、血清由来 exosome が BBB モデル細胞内の薬物トランスポーター発現に与える影響を評価した。血中 exosome 内の miRNA を、TDM の精度向上のためのバイオマーカーとするべく、網羅的な miRNA の発現解析も合わせて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) hCMEC/D3 細胞におけるトランスポーター発現評価

本研究では、既報でヒト BBB モデルとして用いられている hCMEC/D3 細胞を評価対象とした。まず始めに、ヒト BBB における薬物トランスポーターを解析する上で、hCMEC/D3 細胞が in vitro モデルとして妥当であるかを評価した。トランスポーターの遺伝子発現が既知である Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞)、HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞)、HepG2 細胞 (ヒト肝癌細胞) を用いて、薬物トランスポーター発現のコントロールとした。その結果、hCMEC/D3 細胞における MDR1, BCRP, MRP, GLUT1, MCT1 mRNA の発現量は比較的多く、qRT-PCR 法によって十分に定量可能であることが示された (Figure 1)。

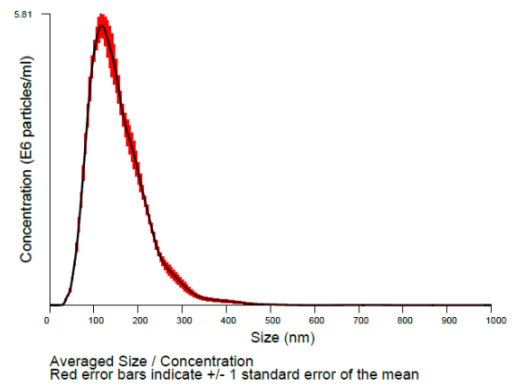


**Figure 1. The mRNA expression levels of candidate transporters in hCMEC/D3, Caco-2, HEK293, and HepG2 cells.**

The mRNA expression levels of candidate transporters in hCMEC/D3, Caco-2, HEK293, and HepG2 cells were evaluated by qRT-PCR. mRNA levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

## (2) 血清由来 exosome の抽出

健康成人の血液から遠心分離によって血清を単離し、超遠心法により exosome 画分を得た。この画分を用いて、Western blotting 法により exosome マーカーとして知られている膜タンパク質 Alix および CD9 を検出することで血清由来 exosome の存在を確認した。また、NanoSight による粒子径解析の結果、exosome 画分には、直径 121 nm (mode) の粒子が  $3.60 \times 10^{11}$  particles/mL 存在することが示され、既報で報告されている exosome の直径と一致した (Figure 2)。これらの結果より、健康成人の血清を超遠心することにより得られた exosome 画分には血清由来 exosome が含有されていることが示された。以降の研究で用いたこの画分を serum exosome と記載する。

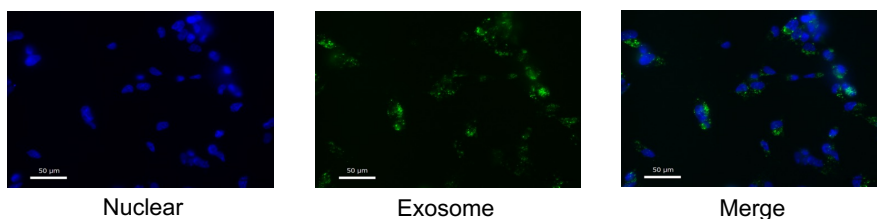


**Figure 2. Characterization of serum derived exosome**

Particle size and its concentration in serum exosome were detected by NanoSight. Red error bars indicate  $\pm$  standard error of the mean (n=5).

## (3) hCMEC/D3 細胞への血清由来 exosome の移行評価

Serum exosome の hCMEC/D3 細胞への移行を評価するために、serum exosome を PKH67 で蛍光標識し、PKH67-labeled serum exosome を Hoechst で核染色した hCMEC/D3 細胞に曝露した。蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した結果、hCMEC/D3 細胞内に serum exosome が移行していることが示された (Figure 3)。以上の結果から、血液中の exosome が BBB に取り込まれることが示唆された。

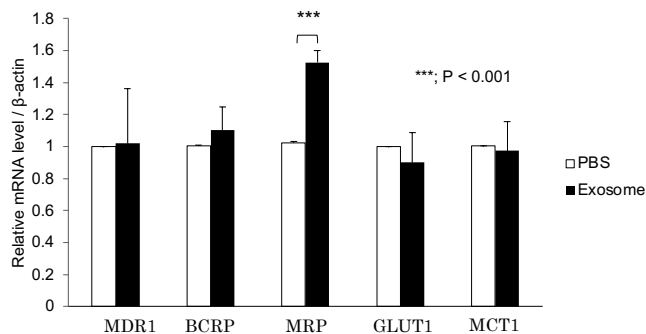


**Figure 3. The uptake of serum exosome by hCMEC/D3 cell.**

The uptake of pKH67-labeled serum exosome by hCMEC/D3 cell was analyzed by fluorescence microscopy. The nuclear of hCMEC/D3 cell was labeled by Hoechst.

## (4) 血清由来 exosome 曝露によるトランスポーター発現変動評価

血液中の exosome が BBB における薬物トランスポーターの遺伝子発現に与える影響を評価するために、serum exosome を曝露した hCMEC/D3 細胞の遺伝子発現変動を qRT-PCR 法によって評価した。この時、negative control として PBS を曝露した hCMEC/D3 細胞を評価した。その結果、MDR1, BCRP, GLUT1, MCT1 mRNA の遺伝子発現は変動しなかった。しかし、serum exosome の曝露により、hCMEC/D3 細胞における MRP mRNA 発現量が 1.6 倍上昇することが示された (Figure 4)。以上の結果から、血液中の exosome が BBB に取り込まれ、MRP mRNA 発現を促進することが示唆された。

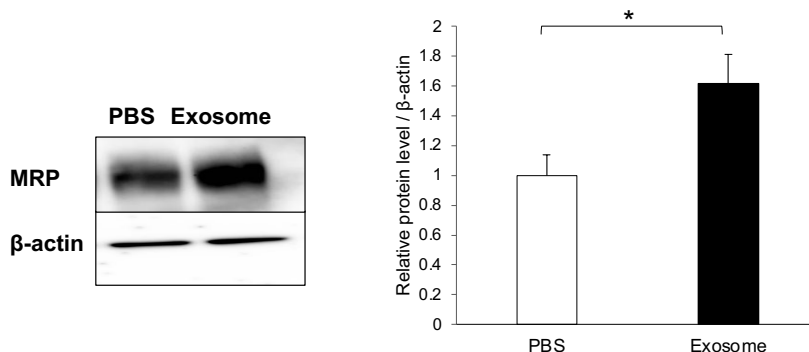


**Figure 4. Effects of serum exosome on mRNA expression in hCMEC/D3 cell**

The mRNA expression levels of candidate transporters in hCMEC/D3 cell were evaluated by qRT-PCR. mRNA levels were normalized to β-actin mRNA levels. Each column represents the mean ± S.D. (n=3). \*\*\*, P < 0.001, statically different from the NC by t-test.

#### (5) 血清由来 exosome 曝露による MRP 発現変動評価

血液中の exosome が BBB における MRP mRNA 発現を促進することが示唆されたことから、MRP タンパク質発現に与える影響を評価するために、serum exosome を曝露した hCMEC/D3 細胞のタンパク質発現変動を Western blotting 法によって評価した。この時、negative control として PBS を曝露した hCMEC/D3 細胞を評価した。その結果、serum exosome の曝露により、hCMEC/D3 細胞における MRP タンパク質発現量が 1.6 倍上昇することが示された (Figure 5)。以上の結果から、血液中の exosome が BBB に取り込まれ、MRP の遺伝子およびタンパク質発現を促進することが示唆された。



**Figure 5. Effects of serum exosome on MRP4 protein expression in hCMEC/D3 cell**

MRP4 protein expression levels in hCMEC/D3 cell were evaluated by western blotting. MRP4 protein levels were normalized to β-actin protein levels. Each column represents the mean ± S.D. (n=3). \*, P < 0.05, statically different from the NC by t-test.

#### (6) ヒト血清ならびにヒト脳微小血管内皮細胞における miRNA アレイ

ヒト血清や BBB 由来の exosome に特徴的な発現を示す miRNA を明らかとするため、miRNA アレイによる網羅的な発現解析を行った。その結果、血清と比較して BBB 由来細胞である hCMEC/D3 細胞において 2 倍以上または 1/2 以下の発現を示す miRNA を 9 種同定した。これら miRNA には miRNA 結合予測データベース (miRWalk, miRDB, TargetScan) により薬物トランスポーター MRP に結合することが予想されている miRNA が含まれていた。

#### (7) まとめと今後の展望

以上の結果より、血清由来の exosome が BBB に取り込まれることで、BBB に発現する薬物トランスポーターである MRP の発現を上昇させることが明らかとなった。また miRNA アレイの結果、MRP に作用することが予想される miRNA を検出されたことから、当該 miRNA に焦点を当てた解析を進めることが、血清由来 exosome 内 miRNA を薬物の脳への分布に寄与するトランスポーター機能予測による TDM の個別化精度向上に重要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	廣田 豪  (Hirota Takeshi)  (80423573)	九州大学・大学病院・准教授   (17102)	
研究分担者	田畑 香織 (佐々木香織)  (Tabata Kaori)  (90464388)	九州大学・薬学研究院・助教   (17102)	

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