

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02647

研究課題名（和文）体液中臓器特異的miRNAに注目した病態時における体内・薬効動態変動の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of changes in pharmacokinetics during disease state focusing on organ-specific miRNAs in body fluids

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病を始めとする生活習慣病により、後天的なmiRNA発現とRNAメチル化の変動をとらえることで、薬物動態関連遺伝子の機能を予測し薬物治療の適正化を目指した。高血糖状態を想定した高濃度のグルコース曝露により、肝由来HepG2細胞内miRNAの発現減少が引き起こされることが示唆された。また、特定のmiRNAは標的遺伝子である薬物トランスポーターの3' UTRに直接結合することで発現制御を行うことが示唆された。高血糖状態はmiRNA発現への影響のみならず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薬物トランスポーター遺伝子発現を制御す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

本研究では糖尿病の病態時に主徴とされる高血糖状態および、薬物動態において主要な臓器である肝臓に着目した。本研究にて、高血糖により後天的な遺伝子発現制御機構であるmiRNA発現とRNAメチル化が変動した。複数の薬物トランスポーターの発現量に影響を認め、これらトランスポーターは幅広い薬物を基質とする。生活習慣病患者は多くの薬物を服用することが一般的に知られており、薬物トランスポーターの発現変動は、薬効に影響する可能性が考えられる。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）：By analyzing variations in miRNA expression and RNA methylation caused by lifestyle-related diseases such as diabetes mellitus, we aimed to predict the functions of pharmacokinetic-related genes and to optimize drug treatment. Our results suggest that exposure to high levels of glucose, assuming a hyperglycemic state, causes a decrease in the expression of HepG2 intracellular miRNAs. It was also suggested that the specific miRNA regulates the genetic expression by directly binding to the 3' UTR of drug transporter gene. The hyperglycemic condition not only affected the miRNA expression but also changed the expression of FTO protein. Diabetes may regulate drug transporter gene expression by promoting m6A modification.

研究分野：薬物動態学

キーワード：生活習慣病 miRNA RNAメチル化 薬物トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者の割合が年々増加する我が国では、生活習慣病の罹患者も増加している。生活習慣病の治療において、薬物療法は重要な手段の一つであるが、病態時の遺伝子発現変化により薬物動態が変動することが近年報告されている。生活習慣病の代表的な疾患である糖尿病において、薬物トランスポーターに輸送される薬物の血中濃度が糖尿病患者では健常成人と比較して減少することが示されている。糖尿病モデルラットと健常ラットでは、肝臓、脳、小腸などの臓器で P 糖タンパク質 (P-glycoprotein, P-gp; 遺伝子名, ABCB1) の発現量が異なり、それによって薬物の体内動態にも違いが生じることが示唆されている。また、糖尿病は腎に特異的に発現するトランスポーターである sodium glucose cotransporter 2 を増加させることも報告されている。これらの報告から、病態時の薬物動態関連遺伝子の変動を考慮に入れた薬物治療の重要性が示唆されている。一般的に疾患に伴う肝障害や腎障害については、各種マーカー等の検査値からその重篤度が分類され薬物投与の際に考慮されている。しかしながら、疾患による薬物動態関連遺伝子の変動を反映したバイオマーカーは同定されておらず、後天的な因子の影響による薬物動態の変動は薬物投与設計に反映されていない。

エピジェネティクスは遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構である。これまでに遺伝子の発現を制御する機構として一塩基多型 (SNPs) が知られており、SNPs は基質薬物の体内動態や薬効発現に影響を与える因子として盛んに研究されてきた。しかし近年、SNPs のようなゲノミクスでは説明できない個人差が存在していることが明らかとなっており、後天的な遺伝子発現制御機構としてエピジェネティクスが注目を集めている。代表的なエピジェネティクスとして DNA メチル化やヒストンアセチル化が挙げられ、これらは遺伝子発現の個人差に寄与し得ることが示唆されている。さらに、エピジェネティクスと 2 型糖尿病の関連を示した論文もここ数年で多数上がっており、高脂肪食摂取や肥満などの環境要因の変化は DNA メチル化やヒストンアセチル化状態を変動させることで、遺伝子発現制御に寄与することが示された。したがって、2 型糖尿病とエピジェネティクスの関係性を明らかにすることで、糖尿病発症時の遺伝子発現調節機構に関する新たな知見が得られると想定される。エピジェネティクスの中でも近年、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。近年では、前立腺がんや肺がん、アルツハイマー病などの様々な疾患に対してバイオマーカーとしての有用性が報告されており、miRNA を臨床現場で活用することが期待されている。また、糖尿病患者においては、血漿中の miRNA 発現プロファイルが健常成人と比較して大きく異なるという報告も挙げられている。このことから、miRNA に着目した遺伝子発現制御機構を解明することができれば、miRNA を新たなバイオマーカーとして利用できる可能性が考えられる。

また近年、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。2 型糖尿病患者は健常人と比較して肝臓内の RNA 修飾酵素である 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。

以上より、糖尿病を始めとする生活習慣病により、後天的な miRNA 発現と RNA メチル化の変動をとらえることで、薬物動態関連遺伝子の機能を予測し薬物治療の適正化を目指すことを着想した。本研究では、生活習慣病を対象とした薬物動態関連遺伝子発現の変動要因として miRNA 発現量と m6A 修飾を解析した。

## 2. 研究の目的

本研究では、代表的な生活習慣病である糖尿病に焦点を当てて、miRNA ならびに RNA メチル化を対象に病態時における薬物動態変動の機序解明を目指した。具体的には、糖尿病を想定した高血糖状態が、miRNA 発現ならびに m6A 修飾の変動を介して、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することである。

## 3. 研究の方法

(1) グルコース曝露条件下における発現変動 microRNA の網羅的解析

2 種類のグルコース濃度 (低濃度: 5 mM、高濃度: 35 mM) 条件下で培養したヒト肝由来細胞 (HepG2) から small RNA 画分を抽出し、マイクロアレイ解析を行うことで、高濃度グルコー

ス条件下で発現変動する miRNA を網羅的に探索した。マイクロアレイ解析により、高濃度のグルコース条件下で発現変動の確認できた miRNA について、データベース (TargetScan, miRDB) 上から遺伝子の 3' -UTR に結合の予測される薬物動態遺伝子を検出し、mRNA およびタンパク質の発現量を real-time PCR 法および western blot 法により定量した。候補 miRNA と薬物トランスポーター mRNA 3' UTR 配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを HepG2 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行うことで、miRNA による薬物トランスポーター発現制御を評価した。

#### (2) グルコース曝露条件下における RNA メチル化の網羅的解析

本研究では、上記 miRNA と併せて mRNA の修飾機構の一つである RNA メチル化 (m6A) 解析を行なった。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発現変動 microRNA の網羅的解析

マイクロアレイ解析の結果、低濃度グルコース条件下と比較して、高濃度グルコース条件下で発現が 2 倍以上変動する約 70 個の miRNA が確認された。

高グルコース条件下で発現変動する microRNA の標的薬物動態遺伝子探索を行った。データベース上から検出されたすべての標的遺伝子 mRNA について、高濃度グルコース条件下で有意な発現変動を確認することができなかった。そこで、miRNA が標的 mRNA の分解促進ではなく、翻訳抑制としての機能を有している可能性を考え、標的遺伝子のタンパク質発現量の定量を行った結果、高濃度グルコース条件下で MATE1 蛋白質の発現増加が認められた (Fig. 1)。

miRNA による MATE1-3' UTR を介した MATE1 発現制御を評価するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、MATE1-3' UTR をトランスフェクトした HepG2 細胞において、miR-7111-5p mimic を導入したルシフェラーゼ活性に変化はなかったが、miR-1343-5p mimic を導入した場合にルシフェラーゼ活性の有意な減少が認められた (Fig. 2)。

#### (2) グルコース曝露条件下における RNA メチル化の網羅的解析

グルコース曝露条件下における mRNA 中の m6A 修飾状態の評価を行った。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 RNA メチル化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. 3)。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。

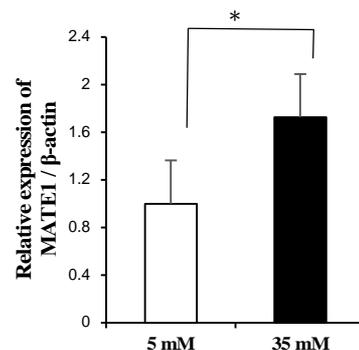


Fig. 1 Effects of different concentrations of glucose on MATE1 protein levels in HepG2 cells.

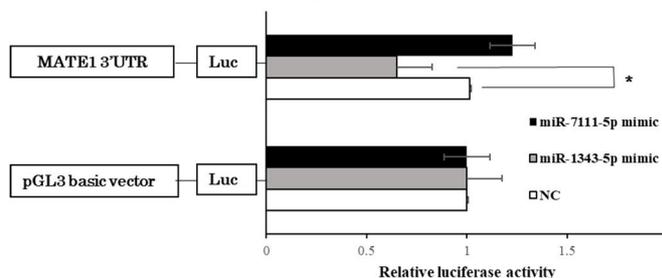


Fig. 2 Effects of miRNAs on luciferase activities of reporter constructs containing MATE1-3'UTR region.

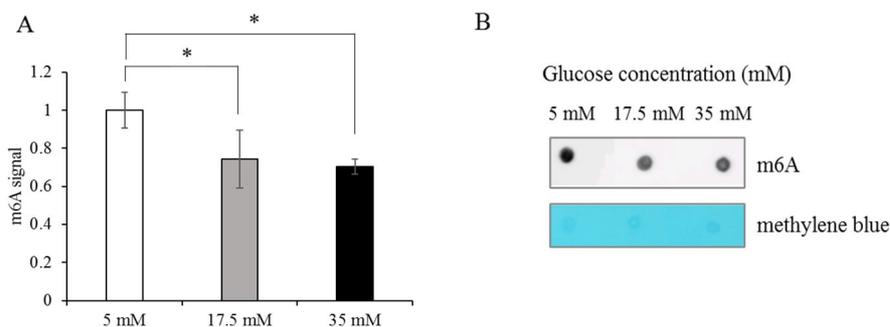


Fig. 3 Effects of various concentrations of glucose on m6A levels in HepG2 cells

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 の探索を行った結果、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. 4)。

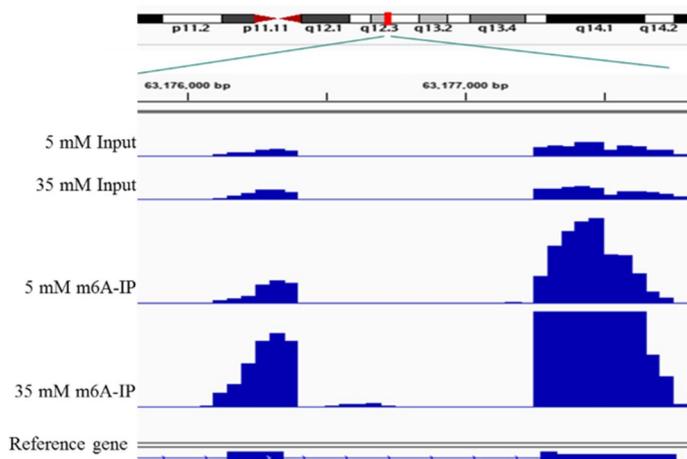


Fig. 4 Effects of different concentrations of glucose on m6A states in HepG2 cells

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の評価を行った。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. 5)。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。

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

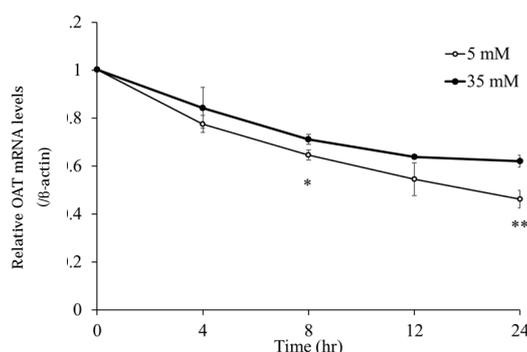


Fig. 5 Effects of different concentrations of glucose on the stability of OAT mRNA in HepG2 cells

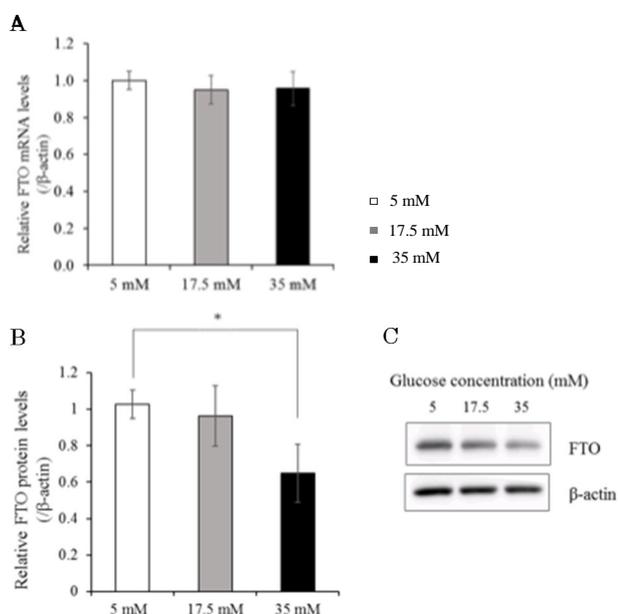


Fig. 6 Effects of various concentrations of glucose on FTO mRNA and protein levels in HepG2 cells

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. 6A)。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. 6B, 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。

### (3) まとめと今後の展望

本研究の結果から、高濃度のグルコース曝露により HepG2 細胞内 miR-1343-5p および miR-7111-5p の発現減少が引き起こされることが示唆された。また、そのうち miR-1343-5p は標的遺伝子である MATE1 の 3' UTR に直接結合することで発現制御を行うが示唆された。

また、高血糖状態は miRNA 発現への影響のみならず 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。今後は、薬物トランスポーターの基質や薬物の輸送活性に miRNA 発現ならび RNA メチル化状態の変動が与える影響を評価することが重要である。

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 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
研究分担者	廣田 豪  (Hirota Takeshi)  (80423573)	九州大学・大学病院・副薬剤部長    (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
---------	---------