

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590186

研究課題名(和文) 血漿中miRNA濃度のバイオマーカーとしての有用性の検討

研究課題名(英文) Biomarker strategies using blood microRNA to predict pharmacokinetics

研究代表者

廣田 豪 (HIROTA, TAKESHI)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80423573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAの一つであるmiR-328はbreast cancer resistance protein (BCRP)を抑制することがin vitroにて示されている。我々はmiR-328の5'上流域上に位置するC/EBPの結合領域におけるCG siteのDNAメチル化がヒト胎盤miR-328発現と負の相関、BCRP発現の個人と正相関を持つことを明らかとした。血中miRNAが癌のバイオマーカーとなることが複数報告されていることから、我々は血中miR-328量がBCRP基質薬物の体内動態のバイオマーカーとなるのか検討を行った。血中miR-328は薬物体内動態と有意な相関を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miRNA) is a non-coding small RNA that regulates gene expression at the translational level by mainly interacting with 3'-untranslated region of target mRNA. It was reported that miR-328 expression influences on breast cancer resistance protein (BCRP) expression in cancer cells. We showed that the methylation patterns of several CpG dinucleotides proximal to identified two C/EBP binding sites in the pre-miR-328 5'-flanking regions were negatively correlated with miR-328 expression and positively associated with BCRP expression in the human placental samples. Recent studies suggested that circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. We analyzed the association between circulating miR-328 expression and the pharmacokinetics of BCRP substrate drug. Circulating miR-328 expression was not significantly associated with the pharmacokinetics.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療

### 1. 研究開始当初の背景

薬物動態関連遺伝子機能の個人差の要因解明は、薬物治療の個別適正化に重要であることから、これまで遺伝子多型を中心に多くの研究が行われてきた。近年新たな遺伝子機能の変動要因として microRNA (miRNA) が注目されている。miRNA は約 22 塩基からなる内在性 non-coding RNA であり、mature miRNA として部分的に相補的配列を持つ標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、標的遺伝子の発現制御を行う。miRNA は様々な遺伝子発現を制御している一方で、その発現量は個体間で大きく異なるという報告や (Cancer Res 2006;66:9090-8, Pharmacol Ther 2007;116:496-526)、miRNA は血漿中に分泌しており (図 1) 癌などの場合血漿中 miRNA 量は癌組織における miRNA 発現量の変動に基づいて変化するという報告がある (Cell Research 2008;18:997-1006)。このことから、薬物動態関連遺伝子を制御する miRNA をその機能予測バイオマーカーとして応用できる可能性がある。

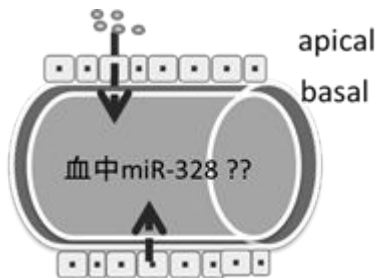


図 1. 血中への miRNA 分泌

薬物排泄トランスポーターの一つである Breast cancer resistance protein (BCRP) は小腸、脳、肝臓、胎盤など多くの臓器に発現している。特に胎盤においては、syncytiotrophoblast 細胞の apical 側に発現し、妊婦に暴露された薬物や外来物質の、母体側から胎児側への流入を防ぐ役割を果たしている (Can J Physiol Pharmacol 2006; 84:1251-8)。胎盤 BCRP 発現には、周産期における性ホルモンや機能形態発達に伴う好气的環境変化の他、一塩基多型をはじめとする遺伝子変異、DNA メチル化などのエピジェネティックな変化が影響するとの報告がある (Placenta 2012; 33:137-42)。特に遺伝子変異については、薬物動態学的・薬力学的に重要な知見が多く、BCRP の発現変動は、基質薬物の薬効・副作用発現に影響することが分かってきた (Handb Exp Pharmacol 2011; 201:325-71, Placenta 2010; 31:351-7)。しかしながら日本人において高頻度に見られる多型、または変異型を保有することで BCRP 発現に大きな影響を与え得る遺伝子変異を考慮した場合においても、タンパク発現量に説明のできない個人差が認められて

いる (Drug Metab Dispos 2005; 33:94-101)。本研究では BCRP 発現個人差要因の一つとして、in vitro において BCRP を抑制制御するとの報告のある miRNA の一つ、miR-328 に着目した。miR-328 は、第 16 番染色体上の ELMO3 遺伝子 intron 3 に逆向きにコードされる miRNA であり、がん細胞において、BCRP 発現を抑制制御する (Mol Pharmacol 2009; 75:1374-9)。また近年の研究から、miR-328 発現には上流域 DNA メチル化が関与することがわかっている (Clin Cancer Res 2011; 17:128)。

### 2. 研究の目的

本研究では、胎盤 BCRP 発現個人差に対する miR-328 発現の寄与、並びに miR-328 発現変動要因解明を行うとともに血中 miR-328 発現量の薬物トランスポーター BCRP 遺伝子機能バイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

BCRP および miR-328 発現定量:

BCRP mRNA 発現量は定量 PCR、BCRP タンパク発現量は Western blotting、miR-328 発現量は TaqMan®-PCR により定量した。

培養細胞の脱メチル化処理:

ヒトにおいて BCRP 発現が確認されている臓器由来の培養細胞である、結腸がん由来細胞 (Caco-2)、大腸がん由来細胞 (LS174T)、胎盤絨毛がん由来細胞 (BeWo)、肝がん由来細胞 (HepG2)、子宮頸がん由来細胞 (HeLa)、慢性骨髄性白血病由来細胞 (K562) を用いて、5-aza-2'-deoxycytizine (5-aza-dC) 脱メチル化処理による miR-328 発現変化を定量した。

Luciferase reporter assay:

BeWo 細胞に、メチル化状態の異なる miR-328 上流域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、メチル化が発現に影響する領域の特定を行った。

In silico analysis 及び転写因子ノックダウン:

miR-328 上流域に作用する転写因子を in silico にて探索後、small interfering RNA (siRNA) を用いた候補転写因子のノックダウン処理を行った BeWo 細胞中の miR-328 発現量を定量した。

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay):

転写因子に対する抗体で免疫沈降を行い、転写因子結合予測領域近傍に作成したプライマーを用いて、定量 PCR により 5-aza-dC 脱メチル化処理・未処理による結合の変化を定量した。胎盤検体においても同様に解析した。Promoter deletion analysis: 結合が確認された領域に存在する結合配列を欠失させたレポーターベクターを用いて luciferase assay を行った。

Electrophoretic mobility shift assay

(EMSA):

ビオチン標識プローブ、抗体を用いて、特定した配列への転写因子結合を確認した。

Bisulfite-PCR 及び cloning sequence:

胎盤組織 20 検体から抽出したゲノム DNA を用いて、bisulfite-PCR 及び cloning sequence によって miR-328 上流域メチル化状態を解析した。

miR-328 の細胞外分泌解析:

0, 12, 24, 48, 72 時間後において Caco2 細胞単層膜の apical, basal 側から培養液のサンプリングを行う。採取した培養液に対してプロトコル(図2)に従い、エキソソーム分画を回収し RNA 抽出を行う。細胞内 miR-328 のうちの程度が細胞外に分泌されているのかを輸送方向毎に定量する。

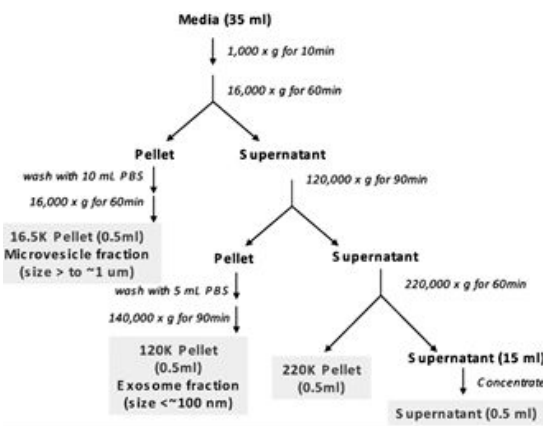


図2. 超遠心法によるエキソソーム分画(120K Pellet)の抽出

exosomal miRNA の消化管透過性:

細胞透過実験に Caco2 細胞を用いるため、Caco2 細胞に発現しておらずかつエキソソームに内包された miRNA を用いる必要がある。Caco2 細胞に発現していない miRNA として miR-223 を測定対象とし、白血病由来 K562 細胞(miR-233 発現細胞)の培養液から超遠心法により抽出した miRNA のエキソソーム分画を用いることとする。K562 細胞由来エキソソーム分画を Caco2 細胞単層膜の apical または basal 側に投与した後、0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 hr ごとにサンプリングを行い、apical basal または basal apical への miRNA の細胞透過性を解析する。

バイオマーカー臨床試験:

BCRP の基質薬物であるスルファサラジン(SASP)を用いた臨床試験を行う。スルファサラジン服用前に exosome 分取用血液を 28 mL 採血する。スルファサラジン 2,000 mg を経口投与し血中濃度測定用に経時的に採血する。体内動態を phenotype とする。体内動態は母集団薬物動態解析法(NONMEM プログラムを使用)により行う。血中 miRNA 濃度、421C>T 変異の有無を genotype とし、表現型の関連を評価する。

#### 4. 研究成果

##### ヒト胎盤検体における BCRP および miR-328 発現量の相関解析

ヒト胎盤において、miR-328 発現量は BCRP mRNA 発現量、およびタンパク質発現量と負の相関を示した(図3)。

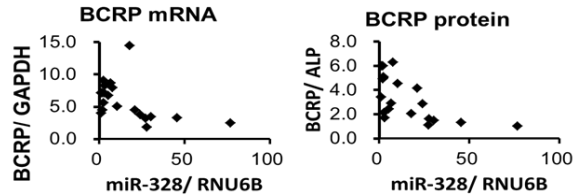


図3. Correlation analysis between miR-328 and BCRP mRNA or protein expression levels in human placental samples (n = 20)

##### miR-328 5' - 上流域 DNA メチル化による発現への影響評価

5-aza-dC 脱メチル化処理により、検討を行った6種類全ての培養細胞において miR-328 発現量は上昇した。メチル化状態の異なる miR-328 上流域のルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、上流域-4187 bp ~ -2197 bp のメチル化により、転写活性が低下した(図4)。

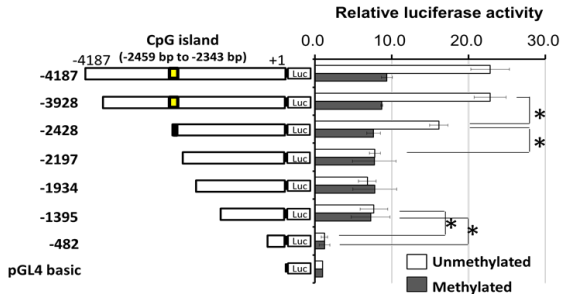


図4. Luciferase activities in pre-miR-328 5'-flanking region

##### 転写制御因子の探索・結合部位の同定

siRNA ノックダウンにより、発現を上昇させるタンパクとして C/EBP を同定した。C/EBP の結合は、上流域-2400 bp 付近の CpG 配列の脱メチル化処理により上昇した(図5)。その一方で、-1200 bp 上流域にも結合が検出されたが、メチル化状態の変化による有意な結合頻度の変化は見られなかった。C/EBP 結合部位の同定を目的に、予測結合配列欠損による活性変化(Promoter deletion analysis)、予測配列への C/EBP 結合確認(EMSA)を行った。予測された10か所の結合部位のうち、miR-328 上流域に結合し、活性に影響を与える結合部位として、-2429 bp、-2329 bp、-1173 bp (配列中の5'上流位)の3か所を同定した。

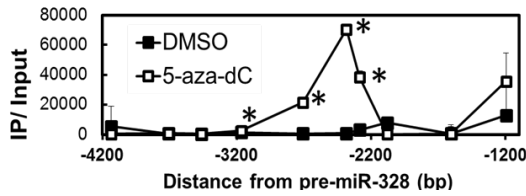


図 5. Effect of DNA demethylating agent on C/EBPα binding frequencies in the pre-miR-328 5'-flanking region

### ヒト胎盤 miR-328 上流域メチル化状態の C/EBP 結合および miR-328 発現への影響評価

C/EBP 結合における DNA メチル化の影響を評価するため、同定した C/EBP 結合部位近傍に存在する CpG 配列の DNA メチル化状態を解析し、C/EBP 結合および miR-328 発現への影響評価を相関解析により行った。その結果、結合部位 -2429 bp 近傍の -2421 bp の CpG 配列 (-2421CG、以下同義)、結合部位 -2329 bp の -2344CG および -2306CG メチル化状態が、C/EBP 結合量、および miR-328 発現量との間に有意な負の相関を認めた(図 6)。一方で、結合部位 -1173 bp 近傍の -1184CG、-1155CG メチル化状態は C/EBP 結合量、および miR-328 発現量と相関関係を示さなかった。

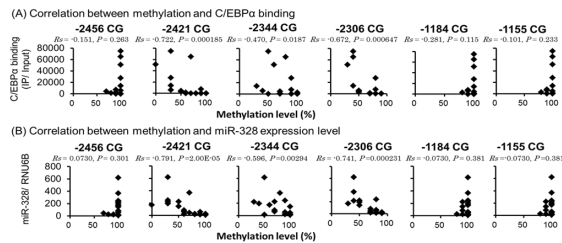


図 6. DNA methylation inhibit C/EBPα binding (A) and repress the miR-328 expression (B)

### ヒト胎盤 miR-328 上流域メチル化状態の BCRP 発現への影響評価

C/EBP 結合量および miR-328 発現量と負の相関を示した -2421CG、-2344CG、-2306CG メチル化状態は、BCRP 蛋白発現量と有意な正の相関を示した(図 7)。

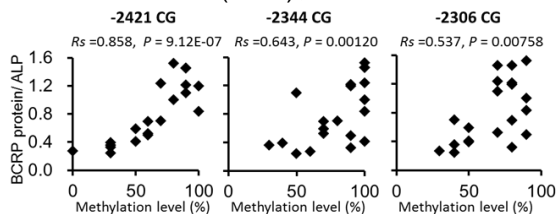


図 7. Methylation levels of CpG dinucleotides proximal to C/EBPα binding sites in the miR-328 5'-flanking region were correlated with BCRP protein expression levels in human pla-centas

### 細胞外から回収した miR-328 が exosome 由来であることの確認

各画分に対して RNase 処理または Triton-X 処理を行ってから RNase 処理を行ったところ、exosome 画分は、Triton-X 処理後の RNase 処理によって miR-328 の分解を受けた(図 8)。このことから、分取した miR-328 が exosome 由来であることが示唆された。

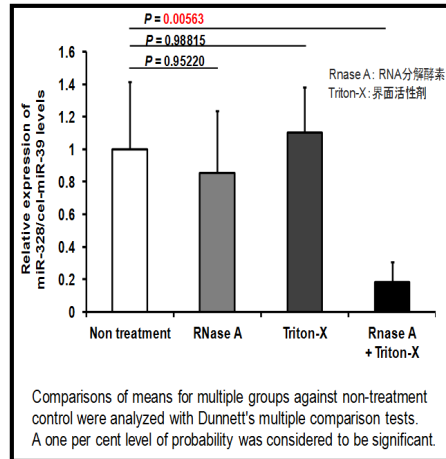


図 8. Effect of RNase A on the relative expression of miR-328

### 血中 exosome 内 miR-328 を対象としたバイオマーカー臨床試験

事前に血中 exosome を分取した被検者に対して BCRP の基質薬物 SASP を投与し、SASP の体内動態と miR-328 量との関連を解析した。また、被検者は BCRP の遺伝子多型 (C421A) により分類を行った。その結果、両者の間に有意な関連は認めなかった(図 9)。

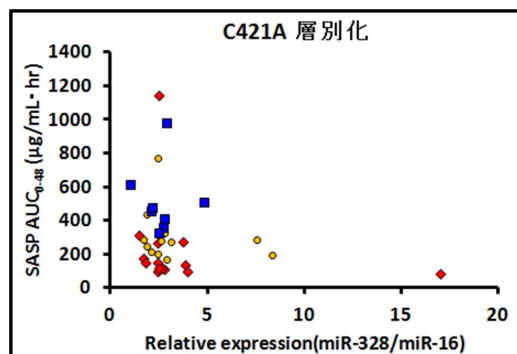


図 9. Association analysis between SASP AUC and relative expression of miR-328

以上の結果より、ヒト胎盤における miR-328 発現の個体間変動に、5'上流域 CpG island 周辺領域の DNA メチル化状態および、メチル化依存性 C/EBP 結合が関与していること、並びにこれらの因子が、胎盤 BCRP 発現の個人差要因の一つとなることが示唆された。エピジェネティックな因子による遺伝子発現調節は、胎盤形成期にダイナミックに起こり、

正常な発達に重要であることが分かっているが、DNA メチル化をはじめとする可塑的な要因が、miRNA や BCRP 発現個人差の変動要因となっている可能性がある。

血中 total exosome 由来の miR-328 は BCRP 基質薬物の薬物動態との間に関連を示さなかった。これは基質薬物の体内動態には消化管における BCRP の機能が寄与することから、血中の消化管由来 exosome を特異的に分取し、miR-328 を定量することが BCRP 機能予測バイオマーカーの確立には必須ではないかと考えられる。

#### 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)

Saito J, Hirota T, Furuta S, Kobayashi D, Takane H, Ieiri I.

Association between DNA methylation in the miR-328 5'-flanking region and inter-individual differences in miR-328 and BCRP expression in human placenta.

PLoS One. 2013 21;8(8):e72906.

DOI: 10.1371/journal.pone.0072906.

[学会発表](計 4 件)

齋藤 順平, 廣田 豪, 古田 真土, 家入 一郎

ヒト miR-328 発現に個体間変動をもたらすメカニズムの解明

第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム, 2012.09.15.

齋藤 順平, 廣田 豪, 古田 真土, 家入 一郎

DNA METHYLATION REGULATES miR-328 EXPRESSION WHICH IS ASSOCIATED WITH INTER-INDIVIDUAL DIFFERENCES IN BCRP EXPRESSION IN HUMAN PLACENTA

日本薬物動態学会 第 27 回年会, 2012.11.22.

古田 真土, 齋藤 順平, 廣田 豪, 家入 一郎

DNA メチル化によるヒト miR-328 発現制御機構の解明

第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.09.

廣田 豪, 家入 一郎

マイクロ RNA による薬物トランスポーターの発現制御とその機能予測バイオマーカーとしての可能性

第 30 回日本 TDM 学会・学術大会, 2013.05.25.

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野 Publication

<http://doutai.phar.kyushu-u.ac.jp/6.pub>

lications/publications.html

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

廣田 豪 (HIROTA, Takeshi)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 80423573