

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460199

研究課題名(和文)環境要因による変動を反映する薬物トランスポーター機能予測バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Identification of endogenous biomarkers to predict the altered activities of drug transporters by environmental factors

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンとは、ポリフェノールの一種で、ウコンなどに含まれている黄色の色素成分である。本研究では、環境要因の一つとしてクルクミンによるBCRP基質薬物(SASP)の体内動態への影響を評価した。その結果、4-5日前のクルクミン投与ではSASP体内動態への影響は認めなかった。その一方で、小腸から分泌された血漿中exosome内のmiRNA(miR-328)発現量とSASPのAUCとの間には有意な正の相関( $P < 0.05$ )を認めたことから、exosome中のmiR-328発現量は生体内におけるBCRP機能予測のバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Curcumin, a commonly used spice, is a naturally occurring polyphenol. In this study, we assessed the influence of prior administration of curcumin on the pharmacokinetics of SASP. Orally 4 to 5 days' time lag between SASP and curcumin intake disappeared the interaction. The disappeared interaction may be responsible for the extremely low bioavailability of curcumin and the disappearance of curcumin in the gastro-intestinal tracts before the administration of SASP. Our findings suggested that 4 to 5 days' time lag is necessary to avoid the drug interaction between BCRP substrates and curcumin. In addition to the effects of curcumin, we analyzed the correlation between exosomal miR-328 in plasma, which leaks from the intestines and BCRP activity in human. Exosomal miR-328 levels positively correlated ( $P < 0.05$ ) with SASP AUC<sub>0-48</sub>, suggesting that exosomal miR-328 in plasma has potential as a possible biomarker for estimating BCRP function in the human intestines.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬剤反応性 発現制御

## 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を解明することは、薬物治療の個別適正化を実現し医療の質の向上や医療費の削減に繋がることから重要である。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のが現状である。近年ではこれらの研究成果により、遺伝子多型に基づいた薬物療法が期待されており、各国で個別適正化医療に向けたガイドランスが示されている。一方で薬物動態に関する遺伝子多型は、分布や頻度などかなり情報が整備されてきたにも関わらず、一部の代謝酵素を除いて個別化医療の実現に十分貢献できているとは言い難い。これは、薬物動態遺伝子多型に基づいた臨床試験データの蓄積不足などが考えられるがその一方で、食事などの環境要因により薬物動態が比較的に変動しやすいことによることも想定される。

近年、遺伝子発現制御機構としてエピジェネティック機構が注目されている。エピジェネティック機構とは遺伝子の一次配列の変化を伴わない遺伝子機能制御機構であり代表的なものに DNA メチル化による遺伝子発現制御や microRNA による遺伝子翻訳制御などが知られる。DNA メチル化は塩基配列上の CG site において可逆的に起こり、メチル化が亢進することにより遺伝子発現は抑制される。遺伝子多型とは異なり後天的にそのパターンは変動することが知られ、一卵性双生児における DNA メチル化パターンは、環境要因などの影響を受け年齢とともに大きく異なってくることが知られている。一方、miRNA は長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA であり、mRNA の分解や翻訳抑制により遺伝子機能の制御に寄与することが知られている。miRNA の発現は様々な疾患において変動し、薬物や化学物質などの曝露、ストレスなどに応答して miRNA の発現が変動することも示されている。

このような背景から遺伝子多型のみでは薬物治療時点における患者の正確な遺伝子機能を予測するのは難しく、遺伝子多型のような先天的な要因に加え、環境により影響を受けるエピジェネティクス機構を組み合わせる遺伝環境相互作用のメカニズムを考慮することが薬物動態関連遺伝子機能の個人差の要因を解明するうえで重要であると考えられる。

薬物トランスポーター BCRP (遺伝子名 ABCG2) は遺伝子多型 (421C>A) により基質薬物であるスルファサラジンの血中濃度曲線下面積を有意に上昇させることが知られている (Yamasaki Y, et al., Clin Pharmacol Ther, 2008)。しかしながらその一方で、同一遺伝子型内においても大きな個体差が残されておりその原因は不明であった。最近我々は microRNA の一種である miR-328 の発現が BCRP 発現の個人間変動要因となることを示し、miR-328 発現は

DNA メチル化により制御されていることを明らかにした (Saito J, Hirota T, et al., PLoS One, 2013)。microRNA は遺伝子機能を制御する機能性小分子 RNA であるが、多数の microRNA がウコンの主成分の一つであるクルクミン (CUR) により DNA 脱メチル化を介しての発現変動することが報告されている (Teiten MH, et al., Mol Nutr Food Res, 2013)。CUR は DNA メチル基転移酵素阻害作用を持つ代表的な成分の一つであることから (Liu Z, et al., Bioorg Med Chem Lett, 2009)、CUR 服用による DNA 脱メチル化による miRNA 発現上昇とそれに伴う遺伝子発現変化が予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、(a) CUR が BCRP 発現を変化させるかを明らかにした上で、(c) クルクミン前投与による BCRP 基質薬物の体内動態への影響評価と BCRP 遺伝子多型ならびに miRNA と薬物動態パラメーターとの比較を行うことでジェネティクス・エピジェネティクスを組み合わせた薬物動態予測バイオマーカーの確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 消化管由来細胞に対する CUR 曝露実験

CUR による脱メチル化作用がみられた条件であるクルクミン 72 時間曝露により検討を行った (Hou XL, et al., Int J Pharm, 2008)。また曝露に先立ち、消化管モデルとする Caco-2 を長時間培養し、単層膜を形成させる。細胞回収後、抽出した DNA は CpGenomeTM DNA Modification Kit (CHEMICON 社) によりパイサルファイト処理を行ったのち PCR、パイロシーケンスにより DNA メチル化を定量的に評価した。mRNA はランダムプライマー、miRNA は miR-328 特異的逆転写プローブを用いて逆転写を行い TaqMan リアルタイム PCR により BCRP mRNA、miR-328 発現量を定量した。BCRP 発現量については Western blotting により解析した。

### 臨床試験によるヒトでの評価

#### 遺伝子検査 (NAT2, BCRP)

健康診断に先がけて、同意の得られた被験者最大約 200 名を対象に、全血 2mL を EDTA-2Na 添加採血管で採血し、NAT2 (\*4, \*6A, \*7B, ) BCRP : 421C>A (142Gln>Lys) の遺伝子検査を行った。NAT2 の遺伝子型が \*4/\*4 あるいは \*4/\*6A, \*4/\*7B であることを確認した被験者について BCRP の遺伝子型 (421C/C, C/A, A/A) に基づき、それぞれ最大 15 名ずつを本臨床試験の対象被験者として選択した。

クルクミンとスルファサラジン投与による臨床試験

NAT2 と BCRP の遺伝子検査の後に行われる健康診断の結果、本臨床試験参加に適格と判断された日本人の健康な成人志願者最大 45 名を対象とした。試験スケジュールは以下に示す 2 期にて実行した。

#### 1 期目

スルファサラジン (SASP) 服用前に血中 miRNA

定量用の血液を 28 mL 採血した。SASP 2,000 mg を単回経口投与し血中濃度測定用に経時的に採血した。

wash out 後 (SASP の消失半減期 (T1/2=約 10hr) より、SASP 投与後最低 3 日間) クルクミン 2 g を経口投与した。

2 期目

クルクミンの血中 miR-328 発現に与える影響は服用 4 から 6 日後であることが予想されるため、クルクミン投与 4 から 6 日後に miRNA 定量用の血液を 28 mL 採血し、SASP 2000 mg を単回経口投与後、血中濃度測定用に経時的に採血した。

4 . 研究成果

#### 消化管モデル Caco-2 細胞におけるクルクミンによる BCRP mRNA 発現への影響評価

クルクミンが BCRP mRNA 発現量に与える影響を評価するため、ヒト結腸癌由来細胞である Caco-2 細胞を用いて解析を行った。Caco-2 細胞は、単層膜を形成させることで消化管モデルとして用いることが出来る (22)。本検討では、Caco-2 細胞を 21 日間培養し、単層膜を形成させた。DMSO に溶解したクルクミン (0, 50, 100  $\mu$ M) を含む培地で 3 日間培養後、RNA を抽出し Quantitative real-time PCR 法により mRNA 発現量の測定を行った。コントロール (0  $\mu$ M) の mRNA 発現量を 1.0 とした時、BCRP mRNA 発現量はクルクミン 50  $\mu$ M により約 20%低下、クルクミン 100  $\mu$ M により約 40 %低下した [Fig. 1]。

この発現減少メカニズムを解明するために、miRNA に着目し、クルクミンによる影響を評価した。その結果、マイクロアレイ解析を行った miRNA 発現量への影響は認められなかった [Fig. 2]。このことから、クルクミンによる BCRP の発現変化は miRNA を介したのではないことが示唆された。

そこで次に、BCRP の転写への寄与が報告されている NF B の解析を行った。その結果、NF B のノックダウンにより BCRP 転写活性の現象を認め [Fig. 3]、クルクミン曝露により BCRP の 5' 上流域への NF B の結合量の上昇を認めた [Fig. 4]。以上のことから、クルクミンによる BCRP の発現低下は NF B 活性の低下を介したものであることが示唆された。

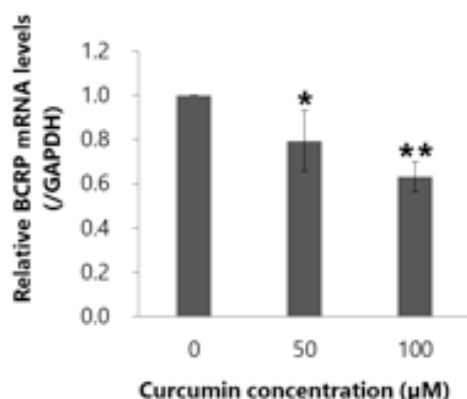


Fig. 1 Effect of curcumin on BCRP mRNA levels in Caco-2 cells

The Caco-2 cells were treated with curcumin (0, 50, 100  $\mu$ M) for 72 hr before harvest. The BCRP mRNA levels were measured by quantitative real-time PCR and were normalized by GAPDH mRNA level. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments and were analyzed using Dunnett 's multiple comparison test. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , compared with control.)

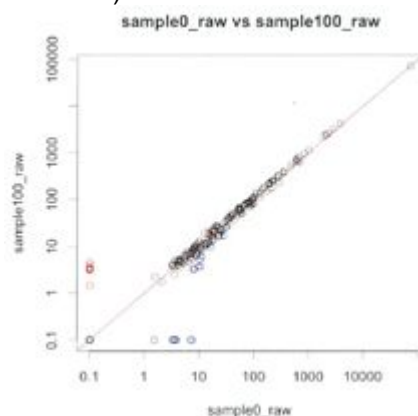


Fig. 2 Effect of curcumin treatment on miRNA expression levels in Caco-2 cells

The Caco-2 cells were treated with curcumin (0, 100  $\mu$ M) for 72 hr before harvest. The scatterplot is comparison of microarray result between control sample (0  $\mu$ M) and curcumin 100  $\mu$ M treatment sample. Red plots show up-regulated miRNA (ratio 2.0) and blue plots show down-regulated miRNA (ratio 0.5). Black plots show unchanged miRNA (0.5 < ratio < 2.0).

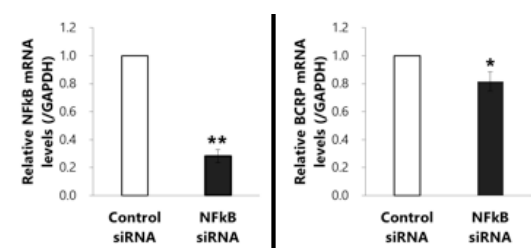


Fig. 3 Silencing effect of NF B by siRNA in Caco-2 cells

The Caco-2 cells were transfected with either control siRNA or NF B siRNA for 24 hr. After treatment with siRNA as described in Methods, mRNA expression of tested genes was determined using quantitative real-time PCR and normalized to GAPDH gene. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments and were analyzed using Welch 's t-test. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , compared with control.)

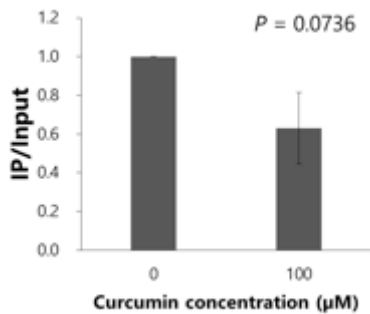


Fig. 4 Effect of curcumin treatment on NF B binding frequency in the BCRP promoter regions in Caco-2 cells. The Caco-2 cells were treated with curcumin (0, 100 μM) for 72 hr before harvest. Formaldehyde cross-linked chromatin was incubated with an antibody for NF B. Immunoprecipitated DNA was measured by quantitative real-time PCR and was normalized by Input DNA. The data represent the mean ± S.D. of three independent experiments and were analyzed using Welch's t-test.

#### クルクミン併用時の BCRP 基質薬物の体内動態解析

SASP と代謝産物である sulfapyridine (SP)、N-acetylsulfapyridine (AcSP) の血中濃度推移は、1 期目、2 期目の間で変動しているものは見られなかった。SASP は解析したすべての薬物動態パラメータについて、90%信頼区間が 0.80 ~ 1.25 の間に含まれており、クルクミン服用による SASP の薬物動態へ影響は認められなかった。SP の C<sub>max</sub> において、1 期目に比べて 2 期目の幾何平均値は 15.2% 有意に上昇していた。90%信頼区間は 1.053 ~ 1.261 であり 1.25 をわずかに超えており、クルクミンにより SP の C<sub>max</sub> は上昇した。SP の AUC<sub>0-48</sub> は、90%信頼区間が 0.80 ~ 1.25 内に含まれていることから、クルクミン服用による SP の薬物動態へ臨床的な影響は認められなかった。AcSP の C<sub>max</sub> は、1 期目に比べて 2 期目の幾何平均値が 10.4% 有意に高かったが、90%信頼区間は 0.80 ~ 1.25 内に含まれていた。また、AUC<sub>0-48</sub> の 90%信頼区間も範囲内に含まれていることから、クルクミン服用による臨床的な影響は認められなかった。AUC<sub>0-48</sub> (AcSP) / AUC<sub>0-48</sub> (SP) に関しては、1 期目と比較して 2 期目の幾何平均値は約 3% 低下していた。90%信頼区間は 0.80 ~ 1.25 内に含まれており、クルクミンによる AUC<sub>0-48</sub> (AcSP) / AUC<sub>0-48</sub> (SP) への臨床的な影響は認められなかった。

#### miRNA 発現解析と BCRP 基質薬物の体内動態との関連解析

そこで次に、in vitro にて BCRP の mRNA 分解に関与することが報告されている miR-328 の血漿 exosome 内発現量と BCRP 基質薬物の体内動態との関連解析を行い、miR-328 発現量が

BCRP 機能予測バイオマーカーとなるのか解析した。その結果、exosome 内 miR-328 発現量と BCRP の基質薬物である SASP の AUC との間に有意な正の相関を認めた [Fig. 5]。

以上の研究結果より、本研究ではクルクミンの投与による BCRP の機能変化を in vivo では確認することが出来なかったが、その一方で、これまでに遺伝子多型のみ解析に終了していた BCRP 機能の個人差解析において exosome 中の miR-328 発現量が機能予測バイオマーカーとなることを世界で初めて示唆する結果を得ることが出来た。このことは今後の薬物療法の個別適正化において重要な成果であると考えられる。

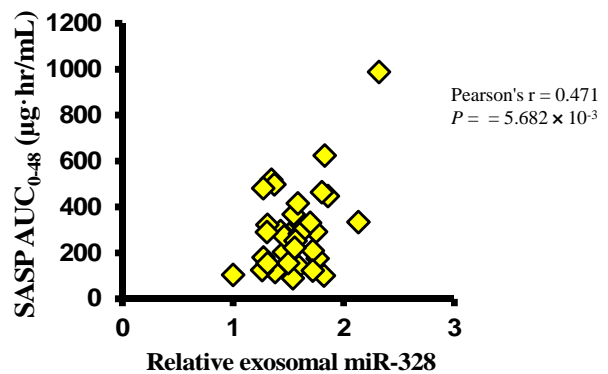


Fig. 5 MiR-328 levels in the intestine-derived exosomes and SASP AUC in healthy volunteers

Each subject received a single oral dose of 2,000 mg of sulfasalazine. Relative exosomal miR-328 levels were determined the method proposed by Jo Vandessepele.

#### 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 3 件)

1. Circulating intestine-derived exosomal miR-328 in plasma, a possible biomarker for estimating BCRP function in the human intestines. Gotanda K, Hirota T, Saito J, Fukae M, Egashira Y, Izumi N, Deguchi M, Kimura M, Matsuki S, Irie S, Ieiri I. Sci Rep. 2016 Aug 30;6:32299.
2. Effect of Curcumin on Sulfasalazine Pharmacokinetics in Healthy Volunteers. Tomoko Tokumoto, Takeshi Hirota, Keisuke Gotanda, Miyuki Kimura, Shin Irie, Masato Fukae and Ichiro Ieiri. J Drug Metab Toxicol. 2016 7 (2), 206.
3. Sulfasalazine disposition in a subject with 376C>T (nonsense mutation) and 421C>A variants in the ABCG2 gene.

Gotanda K, Tokumoto T, Hirota T,  
Fukae M, Ieiri I. Br J Clin Pharmacol.  
2015 Nov;80(5):1236-7.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 廣田 豪, 五反田 圭介, 徳本 知子,  
深江 真登, 家入 一郎, Sulfasalazine  
disposition in subject with 376C>T  
(nonsense mutation) variant in ABCG2 gene,  
The 11th International ISSX Meeting,  
2016.06.15.

2. Takeshi Hirota, Keisuke Gotanda, ICHIRO  
IEIRI, miRNA-328 on BCRP expression -  
Transcriptional regulation and clinical  
application, 19th North American ISSX and  
29th JSSX Meeting, 2014.10.

3. Keisuke Gotanda, Takeshi Hirota, ICHIRO  
IEIRI, Circulating microRNA as a possible  
novel biomarker for estimating BCRP  
function in the human intestines, 19th  
North American ISSX and 29th JSSX Meeting,  
2014.10.

4. 徳本 知子, 廣田 豪, 五反田 圭介,  
深江 真登, 木村 美由紀, 入江 伸, 家  
入 一郎, クルクミンが消化管 BCRP 発現へ与  
える影響評価, 日本薬学会第 135 年会,  
2015.03.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

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

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・准教授  
研究者番号：80423573

(2) 研究分担者

家入 一郎 (IEIRI, Ichiro)  
九州大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：60253473

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )