

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15158

研究課題名(和文) マイクロRNAによるOATP輸送体の発現調節機構に基づく薬物療法最適化

研究課題名(英文) Micro RNA-mediated expressional regulation of transporters

研究代表者

玉井 郁巳 (Ikumi, Tamai)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：OATPなど薬物動態を左右する輸送体の活性変動機構として新たにマイクロRNA(miRNA)の関与に関する検討を行った。その結果、消化管、肝臓両組織で機能するOATP2B1の発現に關与するmiRNAの同定に至った。さらにOATP基質となるスタチン類に伴う筋毒性診断に応用可能な新規miRNAを示唆するに至ることができた。一方、食品との薬物の相互作用機構としてのmiRNAの検討も並行して進めた結果、リンゴ由来ナノ粒子に含まれるmiRNAが消化管輸送体の発現調節に働く可能性を示唆することもできた。一方、新たに消化管で薬物吸収に寄与する核酸輸送体の同定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanisms for altered drug absorption and disposition by co-administered drugs and foods, we studied possible involvement of micro RNA (miRNA) on the expressional regulation of drug transporter OATPs. (1) OATP2B1, which is expressed both in liver and intestine, was found to be regulated by specific miRNA by in vitro experiments. (2) Statins are very good substrates of OATPs and they have possibility to cause myopathy as side effect. We succeeded to suggest several miRNA that can be used for diagnosis of myopathy. (3) As the mechanism of drug-food interaction, it was demonstrated that apple-derived nanoparticles include many miRNAs and they affect expression of OATP2B1, suggesting that food-derived miRNAs could regulate expression of OATPs. (4) Transporters responsible for intestinal absorption of anti-cancer nucleoside analogue were identified and further studies to demonstrate the mechanisms to regulate their expression, including miRNA should be conducted.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター OATP マイクロRNA ナノ粒子 薬食相互作用 薬物間相互作用 個体間変動

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNAによるOATP輸送体の発現調節機構に基づく薬物療法最適化

OATP分子など薬物輸送体は、医薬品の吸収・分布・消失を規定する因子として働くため、その活性変動は血中・組織中濃度の変動に直結し、その結果薬理作用と安全性にも影響する。そのため、現在輸送体活性変動による医薬品の動態変動や毒性発現などとの相関に関する研究が世界的に進められている。輸送体活性変動原因としてこれまでに、輸送体上での薬物間相互作用、核内受容体による調節、遺伝子多型が原因として示されてきたが、既存情報のみでは活性変動を説明できず、個別患者における薬物の動態変動予測の向上が求められる。近年、発現調節因子としてmicroRNA(miRNA)の重要性が指摘されている。miRNAは標的遺伝子の3'-非翻訳領域に結合して発現を負に制御し、恒常的な、あるいは病態時の遺伝子発現の調節に働くなど、個体間および個体内発現変動因子として働く。輸送体としては、BCRP活性の個人差がmiRNAにより説明される知見もある。さらに、最近では食品中のmiRNAが消化管組織細胞の遺伝子発現に対して作用することを示唆する報告もなされている。

これまでに私たちは、薬物輸送体の一つであるOATP群の研究を遺伝子同定段階から開始し、各OATP分子の組織分布性や基質認識性、抗がん薬イリノテカンの活性代謝物SN-38の肝動態へのOATP1B1の関与、さらに消化管で薬物吸収に働くOATP2B1の遺伝子多型ならびに食品との相互作用による動態変動原因としての重要性を示す成果などを、世界に先駆けて報告してきた。その成果は、後のSN-38の薬効や血液毒性を説明する因子あるいは薬物吸収変動因子として、多数のOATPに関する臨床研究の基盤となるなど、OATP研究の進展にインパクトを与える実績として評価されている。これらの背景ではあるが、薬物動態変動機構については、未だ未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、薬物動態の個体差や相互作用等による変動機構について、OATP輸送体を中心に、その活性調節に働くマイクロRNA(miRNA)に着目し、薬物動態への影響に関する検討を行った。主に、肝臓と消化管で薬物吸収に働くOATPsの調節に関わるmiRNAの探索を進めるとともに、薬物輸送に働く輸送体分子の探索も並行して行い、対象となる意義のある輸送体分子の選別についても進めることとした。具体的には以下の検討項目とした。

1) 肝臓および消化管で薬物吸収に働く

OATP分子群の調節に関わるmiRNAの探索

- 2) OATP基質となるスタチン類の筋肉毒性に着目し、筋肉毒性とmiRNAの関係に関する検討。
- 3) 消化管輸送体の発現調節として、最近示唆された食品中ナノ粒子に着目し、含有されるmiRNAの可能性に関する検討。
- 4) 新規消化管薬物輸送体の探索として、核酸系薬物の吸収に働く輸送体の検討。

3. 研究の方法

1) miRNAのdatabaseならびに対象OATPの3'-非翻訳領域の情報に基づいて、候補となるmiRNAを選択する。レポーター遺伝子プラスミド下流対象3'-非翻訳領域を組み込んだベクターを用いたmiRNAの作用の確認、内因的OATP発現細胞を用いた候補miRNA過剰発現またはノックダウン時のOATP発現量と輸送活性の変動を調べる。さらに、ヒト由来組織試料における候補miRNAと対象OATPの発現量の相関性から、発現制御に対するmiRNAの寄与を評価する。一方、消化管型OATP活性への影響が既知の食品として果汁を選択し、果汁由来miRNAについても、databaseからOATPを含む輸送体制御に関わるmiRNA候補分子を探索する。Caco-2など消化管由来培養細胞を用いてそれら候補miRNAの内因性OATPへの作用を調べる。

2) 筋肉毒性についてはモデル細胞におけるスタチン曝露後におけるmiRNAの発現変動を観測し、細胞毒性との関連性を調べ、対象となるmiRNAを見出す。

3) 食品由来ナノ粒子中miRNAについては、果物から調製したナノ粒子画分を消化管由来細胞に添加時の輸送体発現変動に基づき、上述と同様にmiRNAデータベースならびに発現遺伝子の配列に基づいた探索を行う。

4) 核酸系抗がん剤トリフルリジンの吸収機構をモデル細胞並びに候補輸送発現系を用いた探索を行う。

4. 研究成果

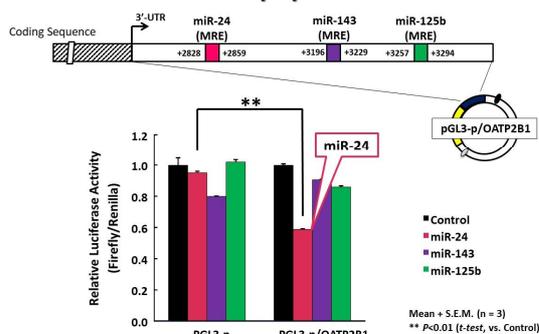
1) miRNAデータベースからならびにOATP2B1の3'-UTR配列から以下図1に示すような候補miRNAが考えられた。

図1:



この中で本検討では肝・消化管両組織に発現する OATP2B1 に着目した検討を進めた。OATP2B1 遺伝子の 3'-UTR を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、合成 miRNA の影響を調べた結果を図 2 に示す。

#### Repressive Regulation of OATP2B1 on Luciferase Activity by miRNA



その結果、miR24 によって遺伝子発現が低下し、本 miRNA が OATP2B1 の発現調節に関わることが示唆された。さらに、Caco-2 細胞において native な OATP2B1 の発現への miR24 を検討したところ、タンパク発現ならびに活性低下も観測された。以上の結果より、OATP2B1 の発現調節に働く miRNA として、miR24 の関与を示すに至った。(雑誌論文作成中)

2) スタチンの筋毒性に関連する miRNA としてセリバスタチンの筋肉由来細胞に対する毒性とその事前に変動する miRNA を探索した結果、miR-145 が筋毒性予測マーカーとなることを示すことができた。業績の関与を示すに至った。(業績、雑誌論文 1)

3) 食品として選択したリンゴ(富士リンゴ)に含有されるナノ粒子を単離し、その中に含まれる miRNA を調べた。その結果、ナノ粒子画分には多種類の miRNA が存在し、それらはリンゴ miRNA としてデータベース中にある分子と多くが一致することを確認した。また、対象とした OATP2B1 の 3'-UTR と一定の親和性を示す miRNA の存在が示唆された。本結果は、上記 miR24 とは異なる miRNA となり、今後はその同定のための検討が必要である。(雑誌論文作成中)

4) トリフルリジンの消化管吸収に働く輸送体として主には管腔側膜では CNT1 が、側底膜側では ENT1 が寄与する可能性を示すことができた。今後はこれら輸送体の発現調節に関わる miRNA の有無に関する検討が必要である。(業績、雑誌論文 2, 3)

以上、4 つの相互に関連する検討を進めた結果、OATP 輸送体の発現調節に関わる miRNA ならびに OATP の良好な基質であ

るスタチンの筋毒性予測マーカー候補となる miRNA の示唆、さらに食品による輸送体発現調節機構としての食品由来 miRNA の可能性を示唆することができた。さらに、薬物動態的にも注意すべき消化管輸送体として、特に核酸系抗がん薬の吸収に関わる輸送体の同定に至った。抗がん剤の作用・副作用には個人差があるため、今後同定された輸送体分子の発現調節に関する検討が望まれる。

なお、上記業績の多くは学術論文としての公表に至っているが、一部は学会発表にとどまっており、学術論文化を進める。

#### 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 3 件)

1: Takahashi K, Yoshisue K, Chiba M, Nakanishi T, Tamai I. Contribution of equilibrative nucleoside transporter(s) to intestinal basolateral and apical transporters of anticancer trifluridine. *Biopharm. Drug Dispos.*, 査読有, Vol. 39, No. 1, 2018, 38-46. doi: 10.1002/bdd.2110.

2: Saito S, Nakanishi T, Shirasaki Y, Nakajima M, Tamai I. Association of miR-145 with statin-induced skeletal muscle toxicity in human rhabdomyosarcoma RD cells. *J. Pharm. Sci.*, 査読有, Vol. 106, No. 9, 2017, 2873-2880. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.005.

3: Rostami-Hodjegan A, Tamai I, Pang S. Revisiting the role of gut wall in the face of orally administered drugs: Why now and to what effect? *Biopharm. Drug Dispos.*, 査読有, Vol. 38, No. 2, 2017, 87-93. doi: 10.1002/bdd.2071.

〔学会発表〕(計 9 件)

1: Fujita D, Arai T, Shirasaki Y, Komori H, Nakanishi T, Tamai I. Effect of Fruit-derived Nanoparticle on Intestinal Transporters. *Experimental Biology 2018*, April, San Diego, USA.

2: Arai T, Shirasaki Y, Fujita D, Nakanishi T, Tamai I. Effect of Fruit-derived nanoparticle on intestinal transporters. *日本薬物動態学会第 32 年会*, 2017 年 11 月, 東京.

3: Tamai I. Food-Drug and Drug-Drug Interaction. *Meet the Expert Transporter Conference*, 2017 Nov. Tokyo.

4: Tamai I. Local Transporter Drug-Drug Interaction of Donepezil with Cilostazol Increases Drug Accumulation in Heart. in *Symposium on Transporter Roles in Intracellular Drug Concentrations*, Symposium EB2017, 2017

April, Chicago, USA.

5: 荒井俊樹、白崎佑磨、小森久和、中西猛夫、玉井郁巳、果物由来ナノ粒子が及ぼす小腸輸送体への影響、日本薬学会年会第 137 年会、2017 年 3 月、仙台。

6: Fujita D, Saito Y, Nakanishi T, Tamai I, Involvement of intestinal transporter OATP2B1 in gastrointestinal toxicity induced by SN-38, an active metabolite of anticancer irinotecan, GPEN 2016, NOV, Lawrence, KA, USA.

7: Tamai I, Drug-Food Interaction and Evaluation, 日本薬物動態学会第 31 回年会, 松本, 2016 年 10 月.

8: 玉井郁巳、トランスポーターでわかってきた薬物動態と生理機構、日本薬物動態学会第 31 回年会, 松本, 2016 年 10 月.

9: Miki Y, Iwai R, Komori H, Fujita D, Nakanishi T, Tamai I, Evaluation of Food-induced Effect on Intestinal Drug Disposition. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 松本, 2016 年 10 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dmpkatku.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI, Ikumi)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

### (2) 研究分担者

中島 美紀 (NAKAJIMA, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

中西 猛夫 (NAKANISHI, Takeo)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし