

薬物トランスポーターおよび薬効標的酵素の機能を 制御する microRNAの同定と臨床応用

五反田, 圭介

<https://hdl.handle.net/2324/1654819>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	五反田 圭介
論文名	薬物トランスポーターおよび薬効標的酵素の機能を制御する microRNA の同定と臨床応用
論文調査委員	主査 九州大学・薬学府・薬物動態学分野 教授 家入一郎 副査 九州大学・薬学府・薬剤学分野 教授 大戸茂弘 副査 九州大学・大学病院・薬剤部 教授 増田智先 副査 九州大学・薬学府・薬剤学分野 准教授 小柳悟

論文審査の結果の要旨

国際ヒトゲノム計画完了を契機に、ゲノム情報を利用した個別化医療が期待されるようになったが、現在、がん領域の薬物治療以外の多くの薬物治療では個別化医療の実現はなされていない。薬物動態や薬効の個人差において、表現型は、1つの遺伝情報だけで決まらず、遺伝子外情報（年齢、性別、併用薬剤など）や遺伝子転写後翻訳制御や塩基配列に依存しないエピジェネティックな発現制御の影響など関わっている。遺伝子転写後翻訳制御に関わる microRNA (miRNA) は small non-coding RNA の1つで、標的 mRNA の 3'-UTR に結合して mRNA の分解や転写後翻訳を抑制する。癌分野において、一部の miRNA は癌遺伝子や腫瘍を抑制するとの報告があり、病態診断・予後診断のバイオマーカーや治療の標的になるのではないかと期待されている。本論文では、薬物トランスポーターおよび薬効標的酵素の機能を制御する microRNA の同定と臨床応用を目的に、第1章では、排出型薬物トランスポーター Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) の抑制的な発現制御に関わる miR-328 が消化管 BCRP 機能予測に対するバイオマーカーと成り得るかについて検討し、第2章では、5-Fluorouracil (5-FU)や methotrexate (MTX) の標的酵素とされるチミジル酸合成酵素 (TYMS) の発現変動要因となる miRNA の同定とその機能評価について検討した。

第1章では、多くの薬物を排出する BCRP の 421C>A 遺伝子多型の変異型は、基質薬物 sulfasalazine (SASP) の体内暴露量を増大させ、SASP 体内動態の個人差要因となるが、同一遺伝子多型群内においても、大きな体内動態の個人差が残る。miRNA の1つである miR-328 は BCRP 発現を抑制的に制御し、胎盤組織内で BCRP 発現量と負の相関関係が知られていることから、miR-328 は遺伝子多型以外の消化管 BCRP 機能の個人差の予測マーカーとなる可能性がある。しかし、臨床応用を考慮した場合、組織内発現量の定量は容易ではない。miRNA は細胞分泌小胞 exosome に保護され、RNA 分解酵素の分解を回避した状態で血液中に存在することから、消化管組織内 miR-328 発現量を定量する代替指標として血漿中消化管由来 exosome 内 miR-328 (exosomal miR-328) に着目し、その有用性を評価した。消化管組織内で miR-328 が ABCG2 mRNA 発現を抑制することを確認するため、空腸組織を用い、ABCG2 mRNA 発現量と miR-328 発現量の相関解析を行った結果、負の相関傾向を認めた。また、exosomal miR-328 量が細胞内 miR-328 発現量を反映しているかを検討するため、Caco-2 細胞に内在性 miR-328 発現量を抑制する合成 RNA を導入し、細胞内および exosomal miR-328 量を qRT-PCR により定量した。細胞内および exosomal miR-328 量が非導入細胞と比較し、有意に低下したことから、exosomal miR-328 は内在性 miR-328 発現量に応じて変化することが示された。次に、

血漿中から消化管由来 exosome を抽出するため、消化管特異的に発現する glycoprotein A33 (GPA33) を用いた免疫沈降を行った。消化管由来 exosome の濃縮を確認するため、免疫沈降後サンプルを用い、Western blotting にて GPA33 の検出および定量 RT-PCR により消化管特異的に発現する miRNA を定量した。結果、分離した exosome は消化管特異的発現を示す GPA33 および miRNA を血漿中 exosome より多く含んでおり、消化管由来 exosome の濃縮を示す結果が得られた。最後に、健常人を対象に SASP 単回経口投与試験を行い、得られた血漿から HPLC による SASP 血中濃度測定、消化管由来 exosomal miR-328 量の定量を行った。結果、消化管 BCRP 機能の指標となる SASP AUC₀₋₄₈ と消化管由来 exosomal miR-328 量は正の相関を示し、消化管由来 exosomal miR-328 は消化管 BCRP の機能予測バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

第2章では、TYMS 発現量は、5-FU や MTX の薬効に関与することが知られているが、その発現に個人差をもたらす要因は未だ明らかとなっていない。本章では、転写後翻訳抑制に関与する miRNA に着目し、TYMS 発現を制御する新規 miRNA の同定とその機能評価することを目的とした。*In silico* 検索より TYMS mRNA を標的とする miRNA 探索を行い、候補に挙げられた miRNA と TYMS mRNA 3'-UTR との関連をルシフェラーゼレポーターアッセイにて評価した。結果、miR-433 が候補に挙がり、TYMS mRNA 3'-UTR 配列を含むベクターにおいて有意な転写活性抑制を示した。また、miR-433 過剰発現条件下で、TYMS 発現の抑制を確認するため、HeLa 細胞に miRNA 前駆体の導入を行い、TYMS の mRNA および protein 発現量の変化を定量 RT-PCR 法、Western blotting により測定した。結果、miR-433 過剰発現条件下では、TYMS mRNA、protein 発現をいずれも有意に抑制することが示された。miR-433 が 5-FU の細胞増殖活性抑制に及ぼす影響を WST-8 法で検討した。MTX では、有意な細胞増殖抑制効果の増強は認められなかった。一方、5-FU では、2 μM 以上において、miR-433 による細胞増殖抑制効果の増強が認められ、5-FU 感受性を増大させることが認められた。miR-433 による 5-FU 薬効増強は、TYMS protein の発現減少を介した dTMP の枯渇や dUMP の蓄積による DNA 合成障害の惹起によるものと考えられる。miR-433 は 5-FU の治療域を想定した濃度で薬効を増強したことから、5-FU の効果増強を指向した機能性 RNA による核酸医薬への展開や 5-FU を用いた化学療法における化学療法抵抗性の予測や予後予測のバイオマーカーとしての可能性が期待される。

薬物トランスポーターおよび薬効標的酵素の機能を制御する miRNA に着目した本論文は、第1章で、スルファサラジン単回投与臨床試験を実施し、消化管 BCRP 機能の指標となる SASP AUC₀₋₄₈ と消化管由来 exosomal miR-328 量が正の相関を有することを明らかにし、消化管由来 exosomal miR-328 は消化管 BCRP の機能予測バイオマーカーとしての可能性を示唆した。第2章では、TYMS を介して、5-FU 感受性を増大させる miR-433 の同定及びその miRNA の機能を確認し、miR-433 が 5-FU の薬効に対する個人差要因である可能性を示した。以上の検討は、miRNA を用いた診断予測をはじめ、医薬品シーズとしての活用といった医療や創薬を行う上で極めて重要な知見であり、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。