

ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターの定量とその個人差要因の解析

武知, 大貴

<https://hdl.handle.net/2324/1931844>

出版情報：九州大学, 2017, 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）

ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターの定量とその個人差要因の解析

薬物動態学分野 3PS13016P 武知 大貴

【序論】

薬物トランスポーターは細胞内外への基質の取り込み及び排泄を担う膜タンパク質の総称で、薬物の吸収、分布及び排泄に重要な役割を果たしている。近年では、薬物トランスポーターが臨床上重要な薬物間相互作用の原因となる事例も報告されており、薬物療法における重要性が認識されている。また、薬物トランスポーターの発現量・活性の個人差が薬物の体内動態に影響することも数多くの研究で報告されており、個人差要因を解明する研究は個別化医療を実現する上で重要である。

皮膚は成人で表面積1.4~1.7 m²、総重量3.2~4.8 kgに及ぶ人体最大の組織で、経皮水分蒸散量の制御や微生物及び化学物質侵入の防御といった両方向性バリアとして機能している。皮膚は薬物投与部位の一つでもあり、初回通過効果を回避できること、非侵襲的な投与が可能であること等、他の投与経路にはない利点が数多くあり、ドラッグデリバリーの観点でも注目を集めている。これまで、薬物の経皮吸収は受動拡散によるものと考えられてきたが、近年、動物モデルやヒト皮膚由来細胞を用いた研究で皮膚にも薬物トランスポーターが発現し、生化学的バリアとして機能することが報告されるようになった。これらの報告は、薬物の投与経路に限らず薬物トランスポーターが皮膚細胞内への薬物分布に関与し、皮膚での毒性及び/又は薬効発現に影響する可能性を想起させる。しかし、ヒト皮膚における薬物トランスポーターに関するこれまでの研究報告の大部分は、培養皮膚細胞や動物モデルを用いたものであり、一連の薬物トランスポーターの発現について多数例のヒト皮膚で検討した報告はない。そこで、本研究では最大48例のヒト皮膚を用い、薬物トランスポーターの発現プロファイル、発現量及び個人差を検討した。また、遺伝子発現の個人差に影響する要因として広く知られる一塩基多型 (SNPs)、並びに遺伝子変異を伴わない遺伝子発現制御機構である「エピジェネティクス」の代表的機構であるDNAメチル化に焦点を当て、発現量の個人差要因の解明を試みた。さらに、免疫組織化学染色によりヒト皮膚における局在を検討し、臨床研究により皮脂分泌に対するトランスポーターの寄与について評価した。

【方法】

ヒト皮膚に発現するABC及びSLCトランスポーターの定量 ～DNAメチル化によるABCC3遺伝子の発現制御～

1) ヒト皮膚における薬物トランスポーターの発現解析

薬物の体内動態に重要とされているサブタイプ及びヒト皮膚由来細胞や少数例のヒト皮膚で発現検討及び/又は機能解析が報告されているサブタイプを参考に、ABCトランスポーター26種、SLCトランスポーター25種を解析対象とした。白人女性皮膚よりtotal RNAを抽出し、real-time PCR法によりC_t値に基づきmRNA発現量を探索した。探索結果に基づき、計18種のサブタイプについて絶対検量線法により発現量を定量した。

2) ヒト皮膚におけるABCC3発現量の個人差要因の検討

白人女性皮膚由来ゲノムDNAを用い、ABCC3遺伝子の5'上流域の遺伝子多型 (-1767G>A、-1328G>A、-1213C>G、-897delC、-260T>A及び-211C>T) を解析し、発現量への影響を評価した。また、CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) を用い、ABCC3遺伝子の転写開始点前後20 kbpの領域に存在するCpG island (以下、CGI) を探索した。CGI内に存在するCG siteのメチル化頻度をCOBRA法により算出し、発

現量との相関解析を行った。

3) 培養細胞におけるABCC3遺伝子発現に対するDNA脱メチル化剤の影響評価

ヒト不死化表皮角化細胞であるHaCaTをDNA脱メチル化剤である5-aza-dCで一定時間曝露後、ABCC3 mRNA発現変動をreal-time PCR法により評価した。

4) ABCC3遺伝子発現におけるCGIの機能評価

ABCC3発現量との相関を認めたCGI配列及び/又はABCC3遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターをHaCaTにトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、CRISPR/Cas9 systemを用い、CGIを欠損したHaCaTを作製し、ABCC3 mRNA発現変動をreal-time PCR法により評価した。

ヒト皮膚におけるSLC22A3発現に対する5'上流域の遺伝子多型の影響

1) ヒト皮膚におけるSLC22A3の局在

10%ホルマリン固定したヒト皮膚組織を使用した。薄切した組織切片をrabbit antibody against human SLC22A3 (一次抗体)、N-Histofine® Simple Stain MAX-PO MULTI (二次抗体) と反応させた。検出は3,3-diaminobenzidineで行い、hematoxylinとの対比染色を行った。

2) SLC22A3遺伝子発現に対する5'上流域の遺伝子多型の影響

白人女性皮膚より抽出したゲノムDNAを用い、SLC22A3遺伝子の5'上流域約2 kbpに存在する遺伝子多型をPCR-SSCP法及びダイレクトシーケンス法を用いて網羅的に解析した。同定した遺伝子多型と発現量との関係を解析し、発現量への影響を認めたSNP (-1603G>A) について、レポーターアッセイを用いて転写活性に対する影響を評価した。また、*in silico*にて-1603Gに結合すると予測された転写因子をsiRNAを用いてノックダウンし、SLC22A3遺伝子のプロモーター活性に及ぼす影響を評価した。

3) SLC22A3遺伝子発現に対するDNAメチル化の影響

CpG island searcherを用い、転写開始点近傍に存在するCGIを探索し、CGI内に存在するCG siteのメチル化頻度をCOBRA法により算出した。

4) ヒト皮脂量及び皮脂成分に対するSLC22A3遺伝子5'上流域-1603G>Aの影響

同意の得られた健康成人男性の血液よりゲノムDNAを抽出し、遺伝子検査を実施した。遺伝子検査に基づき選定した被験者16名 (-1603Gホモ型: 10名、-1603Aホモ型6名) について、額及び背部の皮脂量をsebumeter®により測定した。同時に採取した皮脂をHPLC-UV/ELSD測定に供し、皮脂に含まれるスクアレン (SQ)、ワックスエステル (WE)、遊離脂肪酸 (FFA) 及びトリグリセリド (TG) を定量した。

【結果】

ヒト皮膚に発現するABC及びSLCトランスポーターの定量 ~DNAメチル化によるABCC3遺伝子の発現制御~

解析対象とした51種の薬物トランスポーターのうち、37種についてヒト皮膚に検出可能な程度の発現を認めた ($C_t < 35$)。ヒト皮膚ではABCC3、SLCO3A1、SLC22A3、SLC16A7、ABCA2、ABCC1及びSLCO2B1の順に高発現であり、最も高発現であったABCC3は、ヒト皮膚組織に構成的に発現する薬物トランスポーター総量の20.0%を占めた (Fig. 1)。

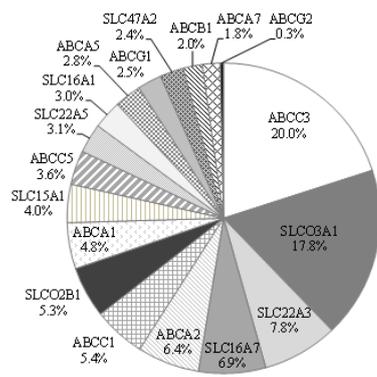


Fig. 1 Transporter mRNA content in Caucasian skin samples.

Absolute transporter mRNA levels were evaluated in human skin samples (n=18). The mean mRNA expression level of each transporter is expressed as a percentage of the total mean transporter mRNA content.

また、ABCC3発現量の個人差（9.5倍）は比較的大きかった。ABCC3 mRNA発現量の個人差要因の解明を試みた結果、プロモーター領域のSNPsとの関係は見出せなかった。一方、ヒト皮膚におけるABCC3発現は約10 kbp上流に存在するCGI-6のDNAメチル化頻度と負の相関を示した（Fig. 2）。さらに、脱メチル化剤を曝露したHaCaTではABCC3 mRNA発現がup-regulationを受けること（Fig. 3A）、当該CGI-6存在下ではルシフェラーゼ活性が有意に上昇すること、CRISPR/Cas9 systemにより当該CGI-6を欠損させたHaCaTではABCC3発現が有意に低下することを確認した（Fig. 3B）。

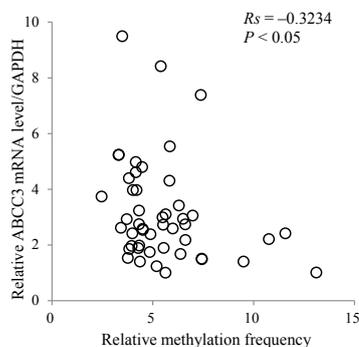


Fig. 2 Correlation analysis between ABCC3 mRNA levels and methylation frequencies of CGI in Caucasian skin samples.

Relative methylation frequencies were assessed by COBRA using human skin samples (n=48). Negative correlation between ABCC3 mRNA expression and methylation levels at the CG site (-9718 loci relative to TIS) in CGI-6 (n=48). R_s and P value are from Spearman's rank-order correlation analysis.

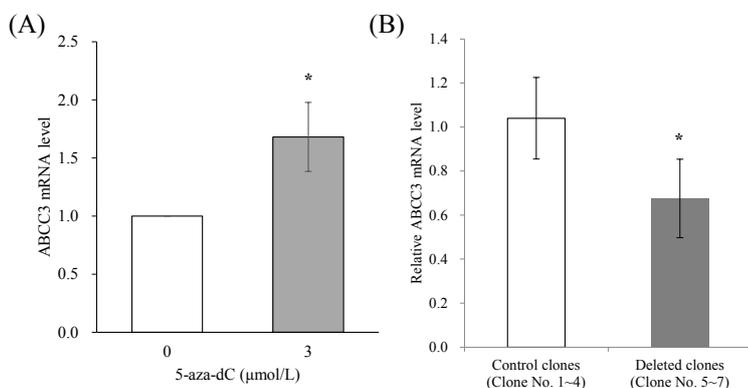


Fig. 3 Effects of 5-aza-dC or deletion of CGI-6 on ABCC3 mRNA expression in HaCaT.

(A) HaCaT cells were treated with 3 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC for 72 hr. ABCC3 mRNA expression levels were assessed using real-time PCR and normalized to the expression of GAPDH. Data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$ (B) Each ABCC3 mRNA level in the established clones was assessed by real-time PCR. Data represent the mean \pm SD and results were normalized to GAPDH mRNA levels. * $P < 0.05$

ヒト皮膚におけるSLC22A3発現に対する5'上流域の遺伝子多型の影響

免疫組織化学染色の結果、SLC22A3は表皮全層に免疫陽性反応が観察され、基底層にやや強い反応を認めた。また、皮脂腺、汗腺及び毛包にも強い反応を認めた。

SLC22A3遺伝子の5'上流域約2 kbpに存在する遺伝子多型を網羅的に解析した結果、14種のSNPsを同定し、白人女性皮膚におけるSLC22A3 mRNA発現量は-1603Aホモ型では有意に低値を示した（Fig. 4）。

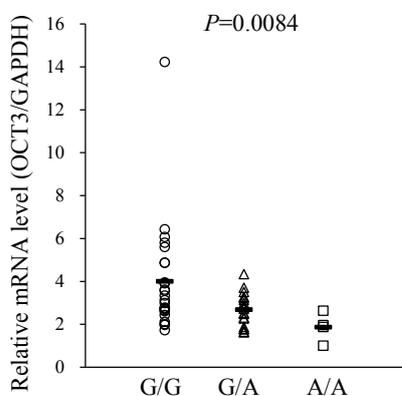


Fig. 4 Effects of -1603G>A on SLC22A3/OCT3 mRNA expression in human skin samples from Caucasian subjects.

SLC22A3 mRNA levels in human skin tissues were determined by real-time PCR and corrected to the level of GAPDH mRNA. The horizontal lines represent the mean value. Differences between the genotypes were tested by the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

次いで、-1603G>AがSLC22A3遺伝子の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、-1603Aを保有するべ

クターでは-1603Gを保有するベクターに比べ、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した (Fig. 5)。また、siRNAを用いてp53をノックダウンした場合、-1603Gを保有するベクターでのみルシフェラーゼ活性が低下した。なお、SLC22A3発現に対するDNAメチル化の影響は認めなかった。さらに、皮膚におけるSLC22A3の機能解析の一環として皮脂腺に着目し、皮脂量及び皮脂成分量の個人差とSLC22A3遺伝子発現への影響を認めた変異 (-1603G>A) との関連を検討した結果、一部の評価項目では遺伝子型間で差がある傾向を確認したが、評価部位 (額及び背部) 及び評価時点間で遺伝子型の影響は一致しなかった。

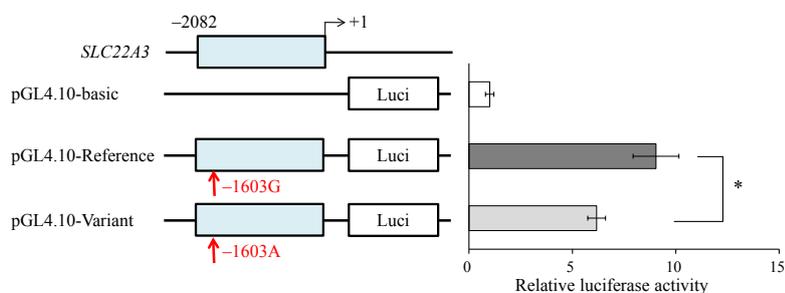


Fig. 5 Effects of -1603G>A on luciferase activities.

Luciferase (Luci) reporter gene constructs were transiently transfected into HaCaT cells. Luciferase values are normalized to the pRL-TK vector. Data represent the mean \pm SD (n=3) and mean value obtained with the pGL4.10-basic vector as 100%. * $P < 0.05$

【考察】

これまでの皮膚におけるトランスポーター研究では、相対定量に基づく発現比較に留まり、個人差の類推も困難であったが、本研究では、ヒト皮膚に発現する薬物トランスポーターの絶対発現量及びその個人差を多数例のヒト皮膚組織を用いて初めて明らかとした。また、本研究で発現を認めたサブタイプは、これまでの研究報告とほぼ一致した。

ヒト皮膚で最も高発現であったABCC3について、発現量の個人差要因を検討した結果、プロモーター領域のSNPsの影響を認めなかった。ABCC3発現に影響するSNPsの報告は限られるため、ヒト皮膚におけるABCC3発現に対するSNPsの影響を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。一方、ABCC3遺伝子の約10 kbp上流に存在するCGI-6のDNAメチル化頻度とヒト皮膚におけるABCC3発現の間には負の相関を認めた。ABCC3発現又は転写活性に対するDNAメチル化及びCGI-6の影響に関する一連の検討結果より、CGI-6がABCC3発現を調節するエンハンサーとして機能し、CGI-6のDNAメチル化がABCC3発現の個人差に寄与する可能性を考えた。転写開始点から遠位の領域がエンハンサーとして機能する報告¹⁾やエンハンサー領域のDNAメチル化により転写活性の抑制を受ける報告²⁾からも、本研究で示唆された当該CGI-6の機能は支持される。

SLC22A3に関する検討における重要な知見のひとつは、SLC22A3遺伝子の5'上流に存在する-1603G>Aによりルシフェラーゼ活性が有意に低下し、実際に白人女性皮膚におけるSLC22A3 mRNA発現量も-1603Aホモ型では有意に低かったことである。以前の研究³⁾では-29G>Aによりルシフェラーゼ活性及び肝臓におけるSLC22A3 mRNA発現量の上昇が報告されているが、本研究では影響を認めなかった。本研究ではSLC22A3 mRNAの発現変動に転写因子p53が関与する可能性を示したが、p53の発現量は皮膚に比べ肝臓で低値であったことから、組織間における変異の影響の不一致は、組織間における遺伝子発現制御の差異に由来することが示唆される。また、ヒト皮膚におけるSLC22A3の局在を本研究で初めて明らかとした。発現を確認した部位は細胞増殖及び分化が活発で、皮脂産生や発汗といった皮膚の機能維持に重要な部位であった。皮脂に関する臨床研究では、皮脂量の部位差及び皮脂成分比についてはこれまでの報告と一致する結果を得たが、遺伝子型の影響は明確にできなかった。皮脂産生に対するSLC22A3の寄与を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

【引用文献】

- 1) Ferreira et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 113:5364-9.
- 2) Yang et al., *Mol Endocrinol*. 2012 26:1203-12.
- 3) Chen et al., *Pharmacogenomics J*. 2013 13:110-20.