

ヒト皮膚に発現する薬物トランスポーター遺伝子多型・発現解析と経皮吸収への影響

九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野

廣田 豪

Membrane transporters have broad specificity and facilitate the uptake and efflux of their substrates across plasma membranes. Two major superfamilies, the ATP-Binding Cassette (ABC) and Solute Carrier (SLC) families, strongly influence the absorption, distribution, and excretion of drugs. Although the skin penetration of xenobiotics was previously attributed to passive diffusion, increasing evidence indicates that transporters have a function in the biochemical barrier of skin epithelial cells beneath the stratum corneum. The identification of drug transporters expressed in human skin and inter-individual differences in gene expression are important for understanding the role of drug transporters in human skin. Twenty-two ABC and 15 SLC transporters were expressed at detectable levels in human skin, and ABCC3, SLC22A3, SLCO3A1, SLC16A7, ABCA2, ABCC1, and SLCO2B1 were strongly expressed in skin. The expression of ABCC3 (MRP3) and SLC22A3 (OCT3) mRNAs showed large inter-individual variabilities. None of the SNPs tested (-1767G>A, -1328G>A, -1213C>G, -897delC, -260T>A, and -211C>T) in the promoter region of the ABCC3 gene showed a significant change in ABCC3 mRNA levels. ABCC3 expression levels negatively correlated with the methylation status of the CpG island (CGI) located approximately 10 kbp upstream of ABCC3 (Rs: -0.323, $P < 0.05$). As a result of systematic screening in the 5'-flanking region of SLC22A3, fourteen SNPs were identified; of these variants, 4 were novel. Of the 14 SNPs the variant, -1603G>A suppressed transcriptional activity in reporter assays and was associated with lower expression levels of SLC22A3 in skin samples obtained from Caucasian female origin. In humans, the concentration of squalene in samples taken from the back at baseline was significantly lower in homozygotes for -1603A/A than in homozygotes for -1603G/G. These results suggest that the genetic mutation contributes to the variation in the expression and activity of the drug transporter in human skin.

1. 緒言

薬物トランスポーターは薬物の生体への取り込み及び生体からの排泄を担う膜タンパク質の総称で、薬物吸収を司る小腸、薬物排泄を担う肝臓及び腎臓、薬物の膜透過を制限する血液脳関門等、広範な組織に発現している。薬物トランスポーターは薬物の吸収、分布及び排泄の支配要因になることが明らかになっている¹⁾。実際、近年では臨床上重要な薬物間相互作用の原因についても、一部又は全てを薬物トランスポーターにより説明できることが報告されている²⁾。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事例も数多くの研究で報告されており³⁾、その個人差要因を解明する研究も個別化医療を実現する上で重要となる。

遺伝子発現の個人差に影響する要因としては一塩基多型 (SNPs) が広く知られており、薬物の体内動態及び薬物応答を担う数多くの遺伝子についても、SNPsが個人差の原因となることが報告されている^{1,3,4)}。また、近年では遺伝子の塩基配列の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」も注目されている。その代表的な

制御機構は、ゲノム中でCpGジヌクレオチドの出現頻度が高いCpG islandsと呼ばれる領域内のシトシンがメチル化を受けるDNAメチル化であり⁵⁾、特に癌等の疾患における遺伝子発現の変動とエピジェネティック修飾との関連研究については多数報告されている⁶⁾。

皮膚は、成人で表面積1.4~1.7m²、総重量3.2~4.8kgにも及び、人体で最大の臓器である肝臓よりも大きい組織と言える。皮膚は皮膚表面から角質層を有する表皮、真皮及び皮下組織から成り、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。皮膚は薬物の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、投与及び投与中止が簡便であること、非侵襲的な投与が可能であること、頻回投与することなく血中薬物濃度を維持できる可能性があること等、他の投与経路にはない利点が数多くある。しかし、元来皮膚は外部環境から生体を保護する役割を担っており、消化管等からの吸収に比べると皮膚からの薬物の吸収は極めて少なく、吸収速度や効果発現に要する時間も遅い。また、長らくの間、薬物の皮膚透過は受動拡散によるものと考えられてきたため、これまでの経皮吸収に関する研究では、物理的バリアである角質層の克服に主眼が置かれ、薬物をいかに効率よく透過させ、標的部に運ぶかという製剤的な技術開発が中心であった。そうした中、近年、皮膚にも薬物トランスポーターが発現し、皮膚において生化学的バリアとして機能することを示す研究が報告されるようになった。正常ヒト角化細胞を用いた研究では、MRPファミリー及びOATPファミリートランスポーターが構成的に



Analysis of genetic polymorphisms and expression of drug transporter genes in human skin and their effects on transdermal absorption

Takeshi Hirota

Department of Clinical Pharmacokinetics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

発現することが報告されている^{7,8)}。本研究では、ヒト皮膚組織における薬物トランスポーターの発現プロファイル、発現量及び個人差に関する情報を整理するとともに、個人差要因並びに皮膚における機能解明を試みた。

2. 方法

2.1. ヒト皮膚組織

ヒト皮膚組織は、白人の女性由来であり、部位は腹部又は胸部からなる48例である。本研究は、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会による審査を経て、承認を得たものである。

2.2. 遺伝子多型解析

ヒト皮膚組織で最も高発現であり個人差も大きかった分子種について、5'上流域の遺伝子多型解析を実施した。対象は皮膚組織検体48例とした。ヒト皮膚組織約20～30mgよりgenome DNAの抽出及び精製を行った。変異の有無をスクリーニングした後、ダイレクトシーケンス法により遺伝子型を決定した。

2.3. DNAメチル化解析

トランスポーター遺伝子周辺のCpG island内のシトシンについて、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法によりメチル化頻度を解析した。転写開始点を起点に前後20,000 bpの領域に存在するCpG islandを、CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>)を用いて検索した。調製したbisulfite変換genome DNAを鋳型とし、各CpG island領域を増幅した。得られたPCR産物に対して制限酵素処理を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、

メチル化シトシン及び非メチル化シトシン由来のバンド強度に基づき、以下に示す相対メチル化頻度を算出した。

相対メチル化頻度 = メチル化シトシン由来バンド強度 / 非メチル化シトシン由来バンド強度

2.4. 臨床試験によるヒト皮脂量及び皮脂成分に対するトランスポーターの遺伝子多型の影響

本試験は、九州大学病院臨床研究倫理審査委員会の審査、承認を得て実施した。同意の得られた20歳以上60歳未満の健康成人男性91名より全血2 mLを採取した。血液からgenome DNAを抽出し、ダイレクトシーケンス法によりSLC22A3遺伝子の-1603G>Aの遺伝子診断を実施した。診断結果に基づき、-1603Gホモ型及び-1603Aホモ型それぞれ10及び6名を選択した。額及び背部に正中線を挟んで左右対称に3×3cmの皮脂評価部位を2カ所設定し、一方を皮脂量、もう一方を皮脂成分評価用とした。

3. 結果

3.1. ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターの探索

白人女性皮膚組織由来cDNAのプール試料(n=20)を用い、ABCファミリートランスポーター26種(ABCA1~10、12、ABCB1、ABCC1~6、8、10~12、ABCG1、2、5、8)及びSLCファミリートランスポーター25種(SLC15A1、2、SLC16A1、3、7、8、SLC22A1~8、10、11、SLC46A1、SLC47A1、2、SLCO1A2、1B1、1B3、2B1、3A1、4A1)の発現をリアルタイムPCR法により探索した(Table 1)。ヒト皮膚には、ABCファミリー8種(ABCA1、2、5、7、ABCC1、3、5、ABCG1)及びSLCファミリー8種

Table 1 ABC and SLC transporter expression in human skin

Gene	C _t Mean	Gene	C _t Mean	Gene	C _t Mean	Gene	C _t Mean
<i>ABCA1</i>	28.9	<i>ABCC2</i>	33.4	<i>SLC15A1</i>	30.6	<i>SLC22A8</i>	>35
<i>ABCA2</i>	29.1	<i>ABCC3</i>	27.0	<i>SLC15A2</i>	32.5	<i>SLC22A10</i>	>35
<i>ABCA3</i>	31.1	<i>ABCC4</i>	32.2	<i>SLC16A1</i>	29.7	<i>SLC22A11</i>	>35
<i>ABCA4</i>	>35	<i>ABCC5</i>	28.4	<i>SLC16A3</i>	33.3	<i>SLC46A1</i>	32.5
<i>ABCA5</i>	29.0	<i>ABCC6</i>	32.2	<i>SLC16A7</i>	30.0	<i>SLC47A1</i>	29.2
<i>ABCA6</i>	32.3	<i>ABCC8</i>	>35	<i>SLC16A8</i>	>35	<i>SLC47A2</i>	30.4
<i>ABCA7</i>	30.7	<i>ABCC10</i>	33.2	<i>SLC22A1</i>	32.9	<i>SLCO1A2</i>	>35
<i>ABCA8</i>	31.2	<i>ABCC11</i>	33.6	<i>SLC22A2</i>	>35	<i>SLCO1B1</i>	>35
<i>ABCA9</i>	32.1	<i>ABCC12</i>	>35	<i>SLC22A3</i>	28.6	<i>SLCO1B3</i>	>35
<i>ABCA10</i>	31.2	<i>ABCG1</i>	29.9	<i>SLC22A4</i>	33.0	<i>SLCO2B1</i>	30.1
<i>ABCA12</i>	31.8	<i>ABCG2</i>	32.9	<i>SLC22A5</i>	30.2	<i>SLCO3A1</i>	28.9
<i>ABCB1</i>	32.1	<i>ABCG5</i>	34.4	<i>SLC22A6</i>	>35	<i>SLCO4A1</i>	33.7
<i>ABCC1</i>	29.3	<i>ABCG8</i>	>35	<i>SLC22A7</i>	>35		

For easy comparison (1st screening), mean cycle threshold (Ct) values of each transporter were calculated. Sixteenth of the pooled cDNA was used as template for real-time PCR. Pooled cDNA was prepared by mixing identical volume of cDNA (n=20). The Ct values of >35, in the range 31 to 35 and <31 were interpreted as absence of gene expression, presence of gene expression but being below the limit of quantitation and presence of gene expression being at the quantitative level, respectively.

Table 2 Absolute expression levels of ABC and SLC transporter mRNAs in human skin showing the lowest and highest values, means and standard deviations

Gene	Minimum ^{a)}	Maximum ^{a)}	Mean ^{a)}	SD ^{a)}	Fold Change ^{b)}
<i>ABCA1</i>	2.05	7.73	4.81	1.67	3.8
<i>ABCA2</i>	2.69	10.8	6.46	2.12	4.0
<i>ABCA5</i>	0.837	6.32	2.79	1.29	7.6
<i>ABCA7</i>	0.546	3.66	1.83	0.83	6.7
<i>ABCB1</i>	0.664	4.43	1.99	0.91	6.7
<i>ABCC1</i>	3.15	12.1	5.42	1.99	3.8
<i>ABCC3</i>	5.11	47.7	20.1	12.6	9.3
<i>ABCC5</i>	1.23	6.96	3.57	1.73	5.6
<i>ABCG1</i>	1.11	6.27	2.52	1.19	5.7
<i>ABCG2</i>	0.0370	0.635	0.338	0.182	17.1
<i>SLC15A1</i>	BD	15.3	4.00	4.44	40.8
<i>SLC16A1</i>	1.48	4.92	2.97	1.06	3.3
<i>SLC16A7</i>	2.65	17.5	6.95	4.26	6.6
<i>SLC22A3</i>	2.96	26.9	7.84	5.49	9.1
<i>SLC22A5</i>	0.894	7.80	3.08	1.65	8.7
<i>SLC47A2</i>	0.221	20.8	2.45	4.71	93.9
<i>SLCO2B1</i>	2.38	11.7	5.35	2.41	4.9
<i>SLCO3A1</i>	8.76	30.8	17.9	7.2	3.5

a) $\times 10^{-3}$ mol/mol GAPDH
 b) Maximum/Minimum ratio
 BD: Below detection

(*SLC15A1*, *16A1*, *16A7*, *22A3*, *22A5*, *47A2*, *SLCO2B1*, *3A1*)が中～高発現していた ($Ct < 31$)。また、ABCファミリー 14種 (*ABCA3*, *6*, *8-10*, *12*, *ABCB1*, *ABCC2*, *4*, *6*, *10*, *11*, *ABCG2*, *ABCG5*)及びSLCファミリー 7種 (*SLC15A2*, *16A3*, *22A1*, *22A4*, *46A1*, *47A1*, *SLCO4A1*)は低発現であり ($31 \leq Ct \leq 35$)、それ以外のトランスポーター (ABCファミリー 4種及びSLCファミリー 10種)については発現を確認できなかった ($35 < Ct$)。

3. 2. ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーター mRNAの定量

前項で中～高発現に分類された 16 分子種、並びにマウス皮膚で輸送活性が報告されている *ABCB1/MDR1* 及び *ABCG2/BCRP* について、個体別の cDNA ($n=18$) を用いて絶対検量線法により発現量を定量した (Table 2)。その結果、ヒト皮膚では *ABCC3/MRP3* の発現量が最も多く、 $20.1 \pm 12.6 (\times 10^{-3} \text{ mol/mol GAPDH})$ を示した。次いで、*SLCO3A1/OATP3A1*, *SLC22A3/OCT3*, *SLC16A7/MCT2*, *ABCA2/ABC2* 及び *ABCC1/MRP1* で高い発現が認められ、それぞれ 17.9 ± 7.2 , 7.84 ± 5.49 , 6.95 ± 4.26 , 6.46 ± 2.12 及び $5.42 \pm 1.99 (\times 10^{-3} \text{ mol/mol GAPDH})$ であった。これらの結果に基づき、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に対する個々の相対的発現量比 (平均値) を算出したところ、最も高発現である

ABCC3/MRP3 が 20.0% を占め、次いで *SLCO3A1/OATP3A1*, *SLC22A3/OCT3* がそれぞれ 17.8 及び 7.8% で続き、上位 3 分子種で約 50% を占めた。発現量が多かった上位 3 分子種について、例数を追加して Pfaffl 法により発現量の個人差をさらに検討した。ヒト皮膚では *SLC22A3/OCT3* の発現量の個人差が最も大きく、変動係数 (%CV) は 61.8% を示した。次いで、*ABCC3/MRP3* の個人差が大きく (%CV : 58.0)、*SLCO3A1/OATP3A1* は上位 3 分子種の中で最も個人差が小さかった (%CV : 40.0)。

3. 3. ヒト皮膚組織における *ABCC3/MRP3* 発現に対する DNAメチル化の影響

ABCC3/MRP3 発現に対する 5' 上流域の遺伝子多型の解析を行ったが、影響を認めなかった。このため次いで DNAメチル化の影響を検討した。CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) を用い、CpG island を探索した結果 (%CG : 50% 以上、ObsCpG/ExpCpG : 0.60 以上、Length : 200 bp 以上、Gap between adjacent islands : 100 bp 以上)、10 カ所の CpG island を同定した (Table 3)。

3. 4. ヒト皮膚組織における *ABCC3/MRP3* 発現量と DNAメチル化頻度の相関解析

DNAメチル化頻度と *ABCC3/MRP3* mRNA 発現量との相関解析を行った。その結果、-19895 位 (CpG island

Table 3 Location of CpG islands within 20 kbp up- and down-stream of the TSS in the ABCC3 gene

No.	Start	End	%GC	Obs/Exp	Length (bp)
1	-20090	-19881	53.3	0.603	210
2	-16357	-16153	56.6	0.6	205
3	-15643	-15423	50.7	0.608	221
4	-13873	-13600	60.6	0.604	274
5	-13448	-13221	57.5	0.603	228
6	-9874	-9674	57.7	0.6	201
7	-680	-532	67.1	0.602	149
8	-429	502	70.7	0.732	931
9	9717	10205	54.4	0.611	489
10	19852	20429	53.6	0.657	578

No.1) ではCG siteのメチル化頻度とABCC3/MRP3 mRNA発現量に正の相関を認めた ($P < 0.05$)。同様に、-9718位 (CpG island No.6) では負の相関 ($P < 0.05$)、-13222位 (CpG island No.5) では正の相関傾向 ($P < 0.10$) を認めた。以上より、ヒト皮膚組織におけるABCC3/MRP3 mRNA発現制御に、これらCpG islands内のDNAメチル化が関与する可能性が示された。

3.5. ヒト皮膚組織におけるSLC22A3/OCT3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 ($n=48$) より抽出したgenome 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網羅的に解析した。その結果、14種のSNPsを同定し、そのうち-1672C>T、-632insGCCCT、-626~-622delGCCCT、-295G>Aの4種は未報告の変異であった。また、アレル頻度が50%以上と高頻度で存在する変異が5種、10~30%と比較的高頻度の変異が3種存在した。

3.6. ヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3発現量と5'上流域の遺伝子多型の関係

同定したSNPsがヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3 mRNA発現に及ぼす影響を検討した。その結果、-1603G>Aでは変異による有意な発現量の低下を認めたが ($P=0.008$)、残りの遺伝子多型では有意な影響は認めなかった。

3.7. 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

これまでの検討の結果、ヒト皮膚における発現量の個人差に5'上流域のSNP (-1603G>A) が寄与する可能性が示された。SLC22A3/OCT3はテストステロン及びプロゲステロンの輸送に関わるトランスポーターであり、両ホルモンは皮脂分泌の促進に関与すると考えられていることから、皮脂に着目しその個人差とSLC22A3遺伝子5'上流域

-1603G>Aとの関連について検討を加えた。同意の得られた健康成人男性 (20歳代、86名) より採取した全血からgenome DNAを抽出し、SLC22A3遺伝子5'上流域-1603G>Aの遺伝子検査を実施した。解析の結果、野生ホモ型、ヘテロ型及び変異ホモ型はそれぞれ55、25及び6名で、アレル頻度は21.5%であった。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測定した。測定の結果、皮脂量は背部に比べ額で多く、また、定常皮脂量の方が回復皮脂量より多い傾向であった。遺伝子型と皮脂量との関係について、背部の定常皮脂量では遺伝子型による差がある傾向であった。

4. 考察と総括

「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」と題し、薬物の皮内動態及び皮内応答性に関与しうる薬物トランスポーターの発現探索及び定量と、その個人差要因並びに機能解明に関する研究を展開した。薬物動態に重要とされる分子種を中心に、ヒト皮膚組織における発現プロファイルを検討し、定量可能と判断した分子種についてその絶対発現量を評価した。合わせて、最も高発現であったABCC3/MRP3については、発現の個人差要因の一部を解明した。比較的多数例の皮膚組織を用いて取得できたこれらの知見は、皮膚での毒性・薬効発現の個人差を考察する上で重要であり、皮膚における薬物トランスポーターの生理機能等の類推にも役立つと考えている。また、ヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3発現の局在及び個人差要因を検討し、臨床研究にて皮脂量及び皮脂成分に対するSLC22A3/OCT3の影響を評価した。SLC22A1/OCT1及びSLC22A3/OCT2のparalogであるSLC22A3/OCT3が皮膚で比較的高発現であり、皮膚における局在及び個人差要因を解明できたことは、臨床的意義のある知見に繋がる可能性があると考えている。本研究では「ヒト皮膚と薬物トランスポーター」について、基礎的知見の収集から臨床研究の遂行に至るまで多岐にわたる

検討を実施できた。皮膚は薬物の投与部位としてますます多くの注目を集めているが、薬物の皮内動態及び制御に関する研究はまだ始まったばかりである。齧歯動物皮膚及びヒト皮膚由来細胞では、薬物トランスポーターが薬物輸送に寄与することが報告されていることから、ヒト皮膚（臨床）における薬物トランスポーターの寄与について明らかとしていくことが今後の課題のひとつと考える。また、各薬物トランスポーターの基質群の特性から、皮膚の恒常性維持に薬物トランスポーターが重要な役割を果たしていることを類推でき、薬物輸送のみでなく、皮膚の機能維持及び疾患発症との関連研究を展開していくことも重要と言える。本研究における成果がそうした研究の駆動力となり、皮膚科学研究が推進されることを期待する。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、助成してくださいましたコーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝いたします。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther.* 112, 457-73 (2006).
- 2) Schneck DW, Birmingham BK, Zalikowski JA, Mitchell PD, Wang Y, Martin PD, Lasseter KC, Brown CD, Windass AS and Raza A. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 75, 455-63 (2004).
- 3) Maeda K and Sugiyama Y.: Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23, 223-35 (2008).
- 4) Ieiri I, Higuchi S, Sugiyama Y. Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 5, 703-29 (2009).
- 5) Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293, 1068-70 (2001).
- 6) Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 22, 4632-42 (2004).
- 7) Baron JM, Höller D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116, 541-8 (2001).
- 8) Schiffer R, Neis M, Höller D, Rodríguez F, Geier A, Gattung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 120, 285-91 (2003).