

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659074

研究課題名(和文) 肝臓中 miRNA の発現変動が薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of changes in hepatic miRNA expression on drug metabolism

研究代表者

中島 美紀 (Nakajima, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)： ヒト初代培養肝細胞にリファンピシンを処置することにより40種類のmiRNAの発現が2倍以上に変化し、それらが標的遺伝子の発現変化をもたらしている可能性が示された。マウスにmiRNAに対するアンチセンスオリゴを尾静注し、肝臓中の発現をノックダウンすると、薬物代謝酵素活性が変化したことから、miRNAが薬物代謝能の制御に重要な役割を担っていることをin vivoで明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We investigated the changes in miRNA expression by rifampicin, which modulates the expression of various genes related to drug metabolism and pharmacokinetics, in human hepatocytes, and evaluated the relationship with the gene expression changes. We found that the expression of 40 miRNAs and 165 genes were changed (> 2-fold) upon treatment with 10 μM rifampicin. The changes in expression of 16 mRNA/miRNA pairs were inversely associated, indicating that some mRNA expression altered by rifampicin may result from miRNA regulation.

Knockdown of miR-122 in liver resulted in significant decrease of midazolam and tolbutamide hydroxylase activities and significant increase of morphine glucuronosyltransferase activity in mouse. These results suggested that the changes in miRNA expression in liver affect cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase activities. In addition, we found that knockdown of miR-34a has a therapeutic or protecting potential for liver cirrhosis.

研究分野：薬物代謝

キーワード：マイクロRNA 発現変動 個人差 転写後調節 薬物代謝酵素 薬物動態

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)はさまざまな疾患の発症や進行に関与していることから、新たな治療標的として注目を集めている。最も研究が先行しているのは、肝臓に高く発現している miR-122 である。miR-122 に対するアンチセンスオリゴを導入することで、血中コレステロールが低下し、C 型肝炎ウイルスの増殖が抑制されることが報告されている。miR-122 以外にも miRNA を対象としてアンチセンスまたはミミックを投与して、miRNA の発現を低下または増加させることで治療をめざす臨床試験も始まっている。1 つの miRNA は数百種類の mRNA を標的とし得ることから、生体内ではさまざまな反応が起こっていることが推定される。

利用されるリポソームやウイルスベクターおよびコレステロール修飾ヌクレオチドは、いずれも肝臓への移行性が高いことから、その影響を大きく影響を受けているのは肝臓と考えられる。病態時に薬物が投与されることを考えると、肝臓における miRNA の発現変動が薬物動態に及ぼす影響を解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

組織中における miRNA の発現量は、疾病や異物への曝露、ストレス等の様々な刺激によって変動することが知られている。本研究では、ヒト肝臓中の miRNA の発現量が変動することによって薬物代謝酵素群が受ける影響を明らかにすることを目的とした。肝臓中で最も豊富に存在し、コレステロール制御に関わる miR-122、および HNF4 $\alpha$  や RXR $\alpha$  などの転写因子の発現を制御する miR-34a を対象とし、これらの miRNA に対するアンチセンスオリゴを導入してノックダウンした時の薬物代謝能を評価し、薬物治療に有用な情報を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) miRNA および mRNA 発現変動の網羅的解析

ヒト初代培養肝細胞を 10  $\mu$ M リファンピシンで 48 時間処置した後、total RNA を RNAiso または miRNeasy Mini Kit により抽出し、TaqMan MicroRNA Array により 377 種類の miRNA の発現を網羅的に解析した。発現変動した miRNA について、TaqMan MicroRNA Assay により発現変動の再現性を確認した。また、アジレント社の 44K ヒトオリゴヌクレオチドマイクロアレイにより転写産物の発現変動を網羅的に解析した。

(2) miRNA アンチセンスオリゴ (AMO) の肝臓特異的送達脂質ナノ粒子への封入およびマウスへの投与

miR-122 または miR-34a に相補的であり、2'-O-メチル化およびホスホロチオエート修飾を加えた RNA 配列の合成を北海道システ

ムサイエンスに依頼した(AMO122 および AMO34a)。これらのオリゴヌクレオチドを YSK-13 脂質で封入し(MEND 化)、AMO122-MEND は 0.5 mg/kg を隔日で 3 回尾静注し、最終投与 6 日後に肝臓を採取した。AMO34a-MEND は四塩化炭素投与開始前あるいは 3 週間投与後に 1 mg/kg を単回投与し、1 週間後に肝臓を採取した。

(3) 薬物代謝酵素活性ならびに肝機能評価  
採取した肝臓より常法に従ってミクロソーム画分を調製し、ミダゾラム水酸化酵素活性、トルブタミド水酸化酵素活性ならびにモルヒネグルクロン酸抱合活性を HPLC により測定した。

肝繊維化の程度は、凍結肝組織から切片を作製し、HE 染色ならびにシリウスレッド染色により組織学的に評価した。また繊維化マーカーとして  $\alpha$ SMA、Colla1 ならびに Tgf $\beta$ 1 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR により測定した。

## 4. 研究成果

(1) 薬物処置によるヒト肝臓中 miRNA の発現変動

ヒト肝臓中 miRNA の発現量が薬物によってどの程度変動するか、結核治療薬リファンピシンを例として検討した。リファンピシンは核内受容体 pregnane X receptor の代表的なリガンドであり、多くの薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現を増加させることが知られている。ヒト初代培養肝細胞を 10  $\mu$ M リファンピシンで 48 時間処置した時、23 種類の miRNA が 2 倍以上の発現上昇を示し、17 種類の miRNA が 2 分の 1 以上の発現低下を示した。この時、CYP3A4 や CYP2C9 などを含む 165 種類の転写産物の発現変動も認められ、miRNA と mRNA の発現変動が逆方向で、miRNA とその標的遺伝子の組み合わせとなるものが 16 種類存在した。従って、薬物による miRNA の発現変動が標的遺伝子の発現変化をもたらしている可能性が示唆された。

(2) 肝特異的 miR-122 の発現低下が薬物代謝酵素活性に与える影響

miR-122 は肝臓特異的かつ豊富に発現している miRNA である。miR-122 のノックダウンが血中コレステロールを低下させ、また C 型肝炎ウイルスの増幅を阻害する効果があることから、miR-122 アンチセンスオリゴはそれらをねらった新たな治療薬として期待されている。さらに、肝障害時には肝臓中 miR-122 の発現が低下することも知られていることから、本研究では肝臓中 miR-122 の発現低下が薬物代謝能に及ぼす影響を検討した。

miR-122 に対するアンチセンスオリゴを肝臓特異的送達脂質ナノ粒子に封入し、マウスに尾静注したところ、肝臓中 miR-122 の顕著

な低下が認められ、ノックダウンに成功した。その肝ミクロソーム画分では、コントロール群と比べてミダゾラム水酸化酵素活性やトルブタミド水酸化酵素活性の上昇、ならびにモルヒネグルクロン酸抱合活性の低下が認められたことから、シトクロム P450 や UDP-グルクロン酸抱合酵素活性が miR-122 発現変動により影響を受けることを明らかにした。

(3) 肝繊維化に伴う miR-34a の発現上昇とそのノックダウンの線維症予防効果

核内受容体であるヒト retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ) が miR-34a で発現制御されることを見出した。RXR  $\alpha$  は肝繊維化に対して保護効果を示すことがノックアウトマウスを用いた検討により示されている。ヒト肝臓中の RXR  $\alpha$  発現量をウェスタンブロットにより解析したところ、正常の肝組織と比べて繊維化の認められる肝組織で発現量が有意に低値を示すことから、ヒトにおいても肝線維症と RXR  $\alpha$  低下との関連を明らかにした。RXR  $\alpha$  発現量の低下が miR-34a 発現変動によるものであるかどうか、四塩化炭素投与による肝繊維化モデルマウスを作製して検討を行った。四塩化炭素投与群では肝臓中 miR-34a 発現が有意に高値を示したことから、RXR  $\alpha$  低下との因果関係が示唆された。そこで、miR-34a に対するアンチセンスオリゴを肝臓特異的送達脂質ナノ粒子に封入し、マウスに尾静注射したところ、肝繊維化に伴って発現上昇していた miR-34a はコントロールレベルまで低下した。さらに、肝繊維化の進行や発症が抑制されることを、組織学的検査ならびに繊維化マーカー発現レベル等の解析により明らかにした。以上より、miR-34a 発現の抑制は、肝繊維化の新たな治療・予防法として期待できることが示された。

#### 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 6 件)

Yamaura Y, Nakajima M, Tatsumi N, Takagi S, Fukami T, Tsuneyama K, Yokoi T. Changes in the expression of miRNAs at the pericentral and periportal regions of the rat liver in response to hepatocellular injury: comparison with the changes in the expression of plasma miRNAs. *Toxicology*, 322: 89-98, 2014. 査読あり  
DOI:10.1016/j.tox.2014.05.008.  
Takahashi K, Tatsumi N, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Integrated analysis of microRNA and gene expression changes by rifampicin treatment in human hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinetics.*, 29: 333-340, 2014. 査読あり  
DOI:10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-114.  
Oda Y, Nakajima M, Tsuneyama K, Takamiya

M, Aoki Y, Fukami T, Yokoi T. Retinoid X receptor  $\alpha$  in human liver is regulated by miR-34a. *Biochem. Pharmacol.*, 90: 179-187, 2014. 査読あり  
DOI:10.1016/j.bcp.2014.05.002.  
Takahashi K, Oda Y, Toyoda Y, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Regulation of cytochrome b5 expression by miR-223 in human liver: effects on cytochrome P450 activities. *Pharm. Res.*, 31: 780-794, 2014. 査読あり DOI:10.1007/s11095-013-1200-7.  
Yokoi T, Nakajima M. microRNAs as mediators of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53: 377-400, 2013. 査読あり DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140250.  
中島美紀. 薬・異物や生体内化合物の代謝を制御する microRNA. *昭和大学薬学雑誌*, 4: 129-140, 2013. 査読あり  
[http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/showa\\_our\\_pharm/back\\_number/frdi8b000000ilk2-at/nakajima.pdf](http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/showa_our_pharm/back_number/frdi8b000000ilk2-at/nakajima.pdf)

〔学会発表〕(計 8 件)

中島美紀、小田祐輝、佐藤悠介、原島秀吉. 肝臓中の核内受容体を制御する microRNA: 肝線維症治療への応用. 日本薬学会第 135 年会. 2015.3.26-28. 神戸学院大学等 (神戸)  
中島美紀. 肝障害バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の利用. 第 35 会日本臨床薬理学会. 2014.12.4-6. ひめぎんホール (松山)  
中島美紀、横井毅. マイクロ RNA の発現変動と医薬品副作用. 第 41 回日本毒学会学術年会. 2014.7.2-5. 神戸国際会議場 (神戸)  
Nakajima M. Modulation of drug metabolism and toxicity by microRNAs. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2014.5.18-24. Stuttgart, Germany.  
小田祐輝、中島美紀、深見達基、横井毅. miR-34a によるヒト retinoid X receptor  $\alpha$  の発現制御は肝繊維化の進行の一因となる. 第 5 回日本 RNAi 研究会. 2013.8.29-31. グランドプリンスホテル広島 (広島)  
辰巳直之、中島美紀、山浦優、深見達基、常山幸一、横井毅. NAFLD の進行に関与する肝臓中 microRNAs の解析: モデルラットを用いた検討. 第 40 回日本毒学会学術年会. 2013.6.17-19. 幕張メッセ (千葉)  
高橋圭、中島美紀、深見達基、横井毅. miR-223 はヒトシトクロム b5 発現を制御してシトクロム P450 活性を調節する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012.12.11-14. 福岡国際会議場 (福岡)  
Nakajima M, Yokoi T. Toxicological implication of modulation of gene expression

by microRNAs. 19th Microsomes and Drug Oxidation and 12th European International Society for the Study of Xenobiotics Meeting. 2012.6.17-21. Noordwijk aan Zee, the Netherlands.

〔図書〕(計 1 件)

中島美紀. 異物代謝酵素のマイクロ RNA による制御 「毒性の科学-分子・細胞から人間集団まで」熊谷嘉人、姫野誠一郎、渡辺知保編 東京大学出版会, 200 (53-57), 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肝繊維化修復剤

発明者：中島美紀、小田祐輝、原島秀吉、  
佐藤悠介

権利者：金沢大学、北海道大学

種類：特許

番号：特願 2015-20308

出願年月日：平成 27 年 2 月 4 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 美紀 (NAKAJIMA, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

木村 健人 (KIMURA, Kento)

小田 祐輝 (ODA, Yuki)

佐藤 悠介 (SATO, Yusuke)

原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi)