

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390043

研究課題名（和文） ヒト肝薬物代謝能を制御する microRNA：個人差解明のための革新的基盤研究

研究課題名（英文） microRNA regulating human drug metabolism: innovative study for the interindividual variability

研究代表者

中島 美紀 (NAKAJIMA MIKI)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70266162

研究成果の概要（和文）：ヒト肝臓中に発現している転写因子 HNF4 α が miR-24 と miR-34a によって、PPAR α が miR-21 と miR-27b によって、そして ARNT が miR-24 によって制御されていることを明らかにした。この発現制御機構は、それぞれの下流遺伝子の発現量にも影響を及ぼし、薬物代謝能だけでなく胆汁酸合成、脂質代謝、異物解毒能やストレス応答の個人差の原因となっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that the expression of HNF4 α , PPAR α , and ARNT in human liver is regulated by miRNAs. The miRNA-dependent regulation of these transcription factors affects the expression of their downstream genes, being a crucial factor of interindividual variability of drug metabolism, bile acid synthesis, lipid metabolism, detoxification of xenobiotics, and response to stimuli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	8,400,000	2,520,000	10,920,000

研究分野：薬物代謝

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：マイクロ RNA、転写後調節、核内レセプター、シトクロム P450、個人差

1. 研究開始当初の背景

薬の効果や副作用の個人差は、体内動態に大きな役割を果たす薬物代謝酵素活性の個人差に起因することが多い。そのため、個別化医療の実現を目的として、薬物代謝酵素の遺伝子多型や転写調節の研究が広く行われてきた。しかし、それらをもってしても薬物代謝能の個人差を完全に説明できていない。申請者は、薬物代謝能を制御する新たな因子

として microRNA (miRNA) に注目した。

miRNA は蛋白質をコードしない 19-25 塩基の小さな RNA であり、標的 mRNA に結合して翻訳を抑制あるいは mRNA を分解することにより発現を制御する。miRNA はすべての多細胞真核生物の遺伝子発現制御に多大な影響を与えている。ヒトでは 1500 種類以上の miRNA が発見され、分化、発生、発達、アポトーシスや癌に関連していることが報告されている。ヒト全遺伝子の約 3 分の 2 が miRNA

によって調節されていると推定されているものの、ヒト miRNA の機能および標的となる遺伝子は未解明のものが多く。

申請者は miRNA 研究を早く薬物動態領域に導入し、エストロゲンを DNA 損傷性の代謝物に変換する CYP1B1 が miR-27b によって転写後調節されていることを明らかにした。乳癌組織における CYP1B1 蛋白の高発現は miR-27b の発現量低下に起因するものと考えられた。これは miRNA が薬物代謝酵素の発現制御を担っていることを報告した世界初の論文となった。次に、薬物代謝酵素の誘導的発現に重要な pregnane X receptor が miR-148 によって調節されており、主要薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現量に大きな影響を与えていることを明らかにした。以上の研究成果を踏まえ、本研究では薬物代謝酵素の発現を制御する master regulator の miRNA による発現調節を明らかにする着想に至った。

2. 研究の目的

多くの薬物代謝酵素の発現を調節する転写因子 hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)、peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) および AhR nuclear translocator (ARNT) に焦点を絞り、これらが miRNA によって制御されていることが薬物代謝能の個人差の原因となっている可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結合する miRNA の予測

miRanda や MicroCosm、TargetScan などのウェブサイトを利用し、結合し得る miRNA を予測した。また、肝臓中における miRNA の発現量や mRNA に対するアクセシビリティなどを考慮して絞り込みを行った。

(2) miRNA 認識配列の機能解析

ルシフェラーゼ遺伝子の下流に miRNA 認識配列を含む 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) の配列を組み込んだレポータープラスミドを作成し、precursor miRNA (pre-miRNA) または miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AsO) を導入し、ルシフェラーゼ酵素活性に変動が認められるか評価した。

(3) mRNA または蛋白質発現量に及ぼす miRNA の影響

細胞に pre-miRNA または miRNA に対する AsO を導入して miRNA の発現を上昇または低下させ、標的 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により、蛋白質発現量をウェスタンブロットにより解析した。また、各転写因子のリガンドを処置して、下流遺伝子 mRNA 発現

誘導または常在的発現量に及ぼす miRNA の影響をリアルタイム RT-PCR により評価した。

(4) ヒト肝組織中における miRNA による発現制御の役割

複数サンプルのヒト正常肝組織における当該蛋白質発現量をウェスタンブロットにより、mRNA 発現量および miRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定し、それらの相関関係を解析した。

4. 研究成果

(1) miR-24 と miR-34a による HNF4 α の発現制御

薬物代謝酵素をグローバルに制御する master regulator であるヒト HNF4 α が miRNA によって制御されている可能性を検討した。ルシフェラーゼアッセイなどの検討により、ヒト HNF4 α の発現が miR-24 と miR-34a の 2 種類の miRNA により制御されていることを明らかにした。興味深いことに、miR-34a は HNF4 α の 3'-UTR に結合して翻訳を抑制し、一方、miR-24 は翻訳領域に結合して mRNA の低下を招く、という異なるメカニズムより、HNF4 α 蛋白質発現量を負に制御していることが示された。これらの miRNA による HNF4 α の発現抑制は、胆汁酸合成酵素 CYP7A1 や CYP8B1、糖新生酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の発現量にも影響を与えることを明らかにした (図 1)。

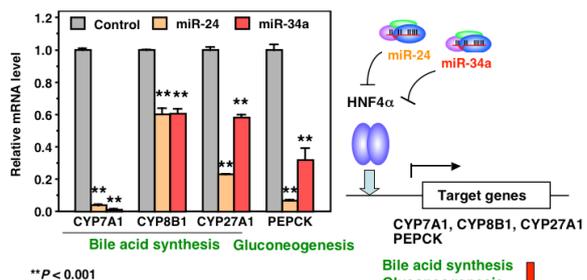


図 1. miR-24 と miR-34a による HNF4 α の発現抑制がその下流遺伝子の発現量に及ぼす影響

胆汁酸は HNF4 α の発現を低下させる作用があり、胆汁酸合成を抑制するネガティブフィードバック機構が働く。その詳細なメカニズムはこれまで不明であったが、胆汁酸による mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の活性化が miR-24 および miR-34a の発現量を増加させ、HNF4 α 発現低下の要因となっていることを初めて明らかにした (図 2)。

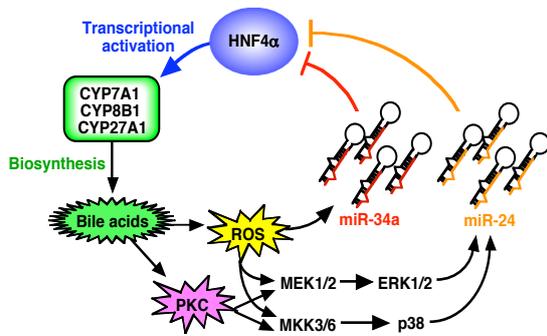


図 2. 胆汁酸合成のネガティブフィードバック機構への miRNA の関与

(2) miR-21 と miR-27b による PPAR α の発現制御

脂質代謝や異物代謝に関わる多くの酵素の発現を制御する転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の発現調節に miRNA が関与する可能性を検討した。In silico 解析により、ヒト PPAR α mRNA の 3'-UTR に結合し得る miRNA を探索し、肝臓に高く発現する 6 つの miRNA について検討した。その結果、ヒト肝臓由来細胞株における PPAR α 蛋白質発現量が、miR-21 および miR-27b の過剰発現またはノックダウンにより有意に減少または増加することを明らかにした。この時、PPAR α mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 と miR-27b は翻訳抑制により PPAR α の発現を制御していることが示唆された。また、PPAR α の下流遺伝子である acyl CoA synthetase の発現にも影響を及ぼすことを明らかにした (図 3)。

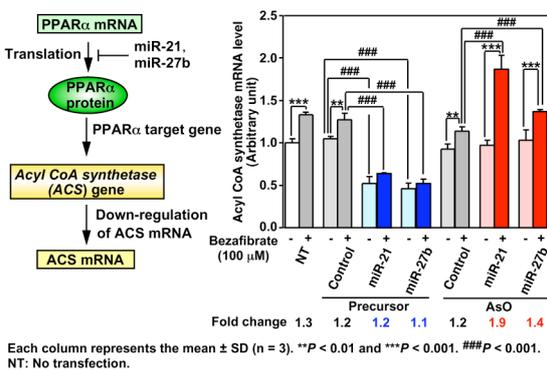


図 3. miR-21 と miR-27b による PPAR α の発現抑制がその下流遺伝子の発現量に及ぼす影響

複数サンプルのヒト正常肝臓において、PPAR α 蛋白質と mRNA 発現量の間には正の相関が認められなかったことから、転写後調節の関与が支持された。また、PPAR α 蛋白質発現量および翻訳効率は miR-21 発現量と逆相関を示したが、miR-27b とは示さなかった。したがって、ヒト肝臓における PPAR α の発現

制御に miR-21 が大きく寄与していることを明らかにした。本研究成果は、ヒト肝臓における常発的な PPAR α の発現調節機構について新しい知見を与えた意義あるものである。

(3) miR-24 による ARNT の発現制御

ダイオキシン受容体 AhR や低酸素誘導因子 HIF-1 α とヘテロダイマーを形成し、異物応答ならびにストレス応答に関与する多くの遺伝子の転写活性化を担うヒト ARNT の発現調節に miRNA が関与する可能性を検討した。ARNT 蛋白質の発現は過酸化水素や活性酸素種への曝露により低下することが知られているが、その際 miR-24 発現量の増加が認められる現象に注目した。ヒト肝臓由来 HuH-7 細胞または HepG2 細胞に miR-24 を過剰発現させた時、内因性の ARNT 蛋白質発現量の低下が認められた。ARNT mRNA 発現量には変化が認められなかったことから、miR-24 は翻訳抑制により ARNT 発現を主に抑制していることが示された。AhR のリガンドである 3-メチルコラントレン処置により標的遺伝子である CYP1A1 mRNA の顕著な誘導が認められたが、miR-24 の過剰発現によりその誘導は完全に消失した。さらに HIF-1 α の分解を抑制して蓄積を高めるデフェロキサミンの処置により HIF-1 α の下流遺伝子である炭酸脱水酵素 IX mRNA の誘導能も miR-24 の過剰発現により顕著に抑制された。複数サンプルのヒト正常肝臓において、ARNT 蛋白質と mRNA 発現量の間には正の相関が認められなかったことから、転写後調節の関与が支持された。ARNT 蛋白質発現量は miR-24 発現量と有意な負の相関関係を示した。以上より、ヒト肝臓における ARNT の発現制御に miR-24 が働いており、異物応答関連因子の発現量に個人差をもたらす原因となっていることを明らかにした (図 4)。

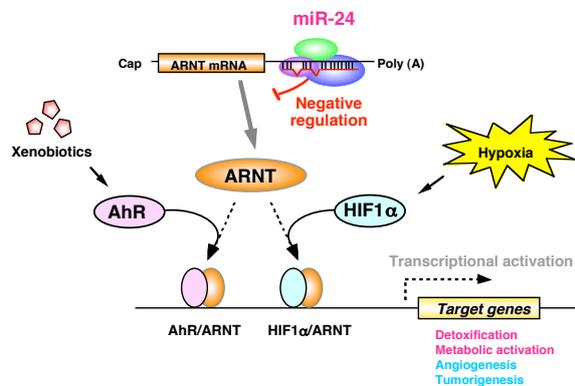


図 4. miR-24 による ARNT の発現抑制が異物応答およびストレス応答遺伝子の発現量に及ぼす影響

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9件)

- ① Oda Y, Nakajima M, Mohri T, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T, Yokoi T. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human livers is regulated by miR-24. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 260:222-231 (2012), doi:10.1016/j.taap.2012.02.012, 査読有
- ② Yokoi T, Nakajima M. Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs. *Toxicol. Sci.*, 123:1-14 (2011), doi:10.1093/toxsci/kfr168, 査読有
- ③ Nakajima M, Yokoi T. MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.*, 131:330-337 (2011), doi:10.1016/j.pharmthera.2011.04.009, 査読有
- ④ Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, Yokoi T. PPAR α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharma. Res.*, 28: 2467-2476 (2011), doi:10.1007/s11095-011-0473-y, 査読有
- ⑤ 中島美紀. シトクロム P450 と転写因子の microRNA による発現制御. *薬学雑誌*, 132: 107-116 (2011), doi:10.1248/yakushi.132.107, 査読有
- ⑥ Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T, Yokoi T. MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4 α , modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 285: 4415-4422 (2010), doi:10.1074/jbc.M109.085431, 査読有
- ⑦ Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem. Pharmacol.*, 79: 1045-1052 (2010), doi:10.1016/j.bcp.2009.11.015, 査読有
- ⑧ Komagata S, Nakajima M, Takagi S, Mohri T, Taniya T, Yokoi T. Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol. Pharmacol.*, 76: 702-709 (2009), doi:10.1124/mol.109.056986, 査読有
- ⑨ Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer*, 125: 1328-1333 (2009), doi:10.1002/ijc.24459, 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 中島美紀, マイクロ RNA : 毒性学・異物代謝研究の新展開, フォーラム: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011年10月28日, 金沢エクセルホテル東急(石川県)
- ② 中島美紀, 薬物動態と microRNA の働き, 第319回 CBI 学会研究講演会, 2011年8月26日, 東京大学山上会館(東京都)
- ③ 中島美紀, 薬物動態における microRNA の役割と microRNA の発現変動, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011年7月11日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ 中島美紀, マイクロ RNA の薬物動態への関与と新規毒性評価への展望, 第25回日本薬物動態学会ワークショップ, 2011年5月12日, 東京大学鉄門講堂(東京都)
- ⑤ Nakajima M, Yokoi T, Regulation of human cytochrome P450s and nuclear receptors by microRNAs, 4th Asia Pacific International Society for Study of Xenobiotics Meeting, 2011年4月22日, 国立成功大学(台湾)
- ⑥ 中島美紀, miRNA の基礎と毒性研究, 第4回応用トキシコロジーリカレント講座, 2010年9月30日, 金沢大学サテライトプラザ(石川県)
- ⑦ Nakajima M, MicroRNA regulation of nuclear receptors and drug metabolizing cytochrome P450, 9th International Society for Study of Xenobiotics Meeting, 2010年9月7日, Istanbul Lutfi Kirdar Convention and Exhibition Center (Turkey)
- ⑧ Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, Yokoi T, Human PPAR α is regulated by miR-21, 9th International Society for Study of Xenobiotics Meeting, 2010年9月7日, Istanbul Lutfi Kirdar Convention and Exhibition Center (Turkey)
- ⑨ 中島美紀, マイクロ RNA によるシトクロム P450 の発現調節, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月16日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県)
- ⑩ Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T, Yokoi T, Human hepatocyte nuclear factor 4 α is regulated by stress-induced microRNAs, 第24回日本薬物動態学会, 2009年11月27日, 国立京都国際会館(京都府)
- ⑪ Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T, Human CYP2E1 is post-transcriptionally regulated by microRNA, 第24回日本薬物動態学会, 2009年11月27日, 国立京都国際会館(京都府)

[その他]

ホームページ等

[http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/
index.html](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・准教授

研究者番号：70266162

(2) 分担研究者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし