

平成 21 年 1 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790121
 研究課題名（和文） miRNA による CYP3A4 の転写後調節：薬物動態研究の新展開
 研究課題名（英文） Post-transcriptional regulation of CYP3A4 by miRNA
 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：主要な薬物代謝酵素であるヒト CYP3A4 の発現量や酵素活性に認められる大きな個人差の原因を明らかにすることを目的として、その発現制御に microRNA が関与している可能性を検討した。その結果、核内レセプターである pregnane X receptor が miR-148a によって転写後調節されており、それが原因で CYP3A4 発現量の個人差が生じていることを明らかにした。遺伝子多型や転写調節など従来の概念では説明できなかった現象を解明することができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物代謝、シトクロム P450、発現調節、マイクロ RNA、核内レセプター

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発現調節の解析が広く行われてきた。CYP3A4 は肝臓および小腸に高く発現し、臨床で使用されている医薬品の 50%以上もの代謝に関与する最も重要な薬物代謝酵素である。CYP3A4 にも多くの遺伝子変異型が存在するが、遺伝子多型と表現型との相関は認められていない。CYP3A4 の発現は核内転写

因子 pregnane X receptor (PXR) に依存している。CYP3A4 の発現量に与える PXR の影響が大きいことは、ヒト肝における CYP3A4 の発現量と PXR の発現量に相関関係が認められることから推察できる。PXR はリファンピシンやフェニトインなどの薬物がリガンドとなって結合すると活性化し、CYP3A4 遺伝子の 5'-上流の応答配列に結合して転写を促進させる因子である。しかし、PXR の遺伝子多型を考慮しても CYP3A4 発現量の大きな個人差を説明できていない。本研究では、CYP3A4 の発現を制御している可能性のある因子として microRNA (miRNA) に注目した。

miRNA は約 21-23 塩基からなる小さな RNA であり、標的 mRNA に相補的に結合して翻訳を抑制する。しかし、近年その存在が明らかにされたばかりで、その機能や標的遺伝子は未解明のことが多い。申請者は miRNA 研究を早く薬物動態領域に導入し、研究を行ってきた。エストロゲンを DNA 損傷性の代謝物へと変換する薬物代謝酵素である CYP1B1 が miR-27b によって抑制的に転写後調節されていることを明らかにしている (Tsuchiya Yuki, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. *MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1*. *Cancer Res.*, 66: 9090-9098, 2006)。これによりヒトのがん組織において CYP1B1 が高発現している原因を明らかにすることができた。このように、薬物動態制御因子への miRNA の寄与を証明することで薬物動態研究に新たな概念を提唱できる可能性があると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では薬物代謝酵素 CYP3A4 とその発現を制御する転写因子 PXR の発現が miRNA によって転写後調節されている可能性を明らかにすることを目的とした。CYP3A4 の塩基配列を検索したところ、3'-非翻訳領域に miR-148 と相同性の高い配列があることを見出した (Fig. 1)。興味深いことに、この miRNA は PXR にも結合し得ることが予想された。従って、miRNA によって CYP3A4 の翻訳が抑制されている可能性と、miRNA によって PXR の翻訳が抑制され、それによって CYP3A4 の発現が 2 次的に抑制されている可能性の 2 つが考えられた。いずれのメカニズムによっても miR-148 は CYP3A4 を負に制御している因子と予想された。そこで本研究では、CYP3A4 発現量や酵素活性の個人差に miRNA による発現制御が関与しているか明らかにすることを目的とした。

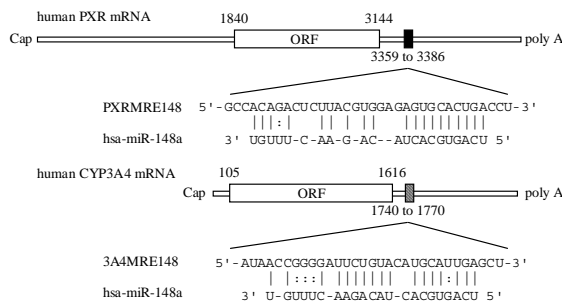


Fig. 1. Complementarity of miR-148a to the predicted target sequences of human PXR and CYP3A4.

3. 研究の方法

(1) ヒト由来細胞株における miR-148a の定量

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞、HuH7 細胞、HLE 細胞、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞、LS180 細胞、ヒト胚腎由来 HEK293 細胞、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞から total RNA を調製し、NCode SYBR Green miRNA qRT-PCR Kit (Invitrogen 社) により mature miR-148a 発現量を定量した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

レポータープラスミド pGL3p のルシフェラーゼ遺伝子の下流に、CYP3A4 または PXR の 3'-非翻訳領域に見出された miR-148 認識配列 (MRE148) を正方向または逆方向に組み込んだプラスミドを作成した。また、ポジティブコントロールとして、miR-148a に相補的な配列を組み込んだプラスミド (pGL3p/c-148a) を作成した。これらのレポータープラスミドを precursor miR-148a または miR-148a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性の変化を評価した。

(3) PXR タンパク発現量と機能の評価

HepG2 細胞または LS180 細胞に precursor miR-148a または miR-148a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。その細胞より total RNA を調製し、mature miR-148a 発現量をノーザンブロット分析により評価した。NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent (Pierce 社) を用いて核抽出液を調製し、PXR タンパク発現量をウェスタンブロット分析により評価した。また、CYP3A4 遺伝子の 5'-上流領域に存在する PXR responsive element をルシフェラーゼ遺伝子の 5'-上流に組み込んだレポータープラスミド pCYP3A4-362-7.7K を導入して、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、PXR 発現量の変動がその機能に及ぼす影響を評価した。

(4) ヒト肝試料を用いた関連実験

20 検体のヒト肝試料を HAB 研究機構 (千葉) より入手した。Total RNA を調製し、NCode SYBR Green miRNA qRT-PCR Kit により mature miR-148a 発現量を定量した。また、PXR および CYP3A4 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により評価した。さらに、total cell lysate を調製し、PXR および CYP3A4 蛋白発現量をウェスタンブロットにより定量した。これらの発現量の間に関連関係が認められるかどうか、スピアマンの順位相関分析を行い、 $p < 0.05$ の時、有意と判断した。なお、ヒト肝試料を用いた研究については金沢大学大学院医

学系研究科等ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。

4. 研究成果

(1) さまざまなヒト由来細胞株における miR-148a の発現量の評価

7種類のヒト由来細胞株における mature miR-148a の発現を評価したところ、すべての細胞株で検出された (Fig. 2)。最も高い発現が認められたのは HepG2 細胞であり、次いで、分化させた Caco-2 細胞であった。これらの細胞株における miR-148a の発現量には 37 倍という大きな差が認められることを明らかにした。以下のルシフェラーゼアッセイには、miR-148a 陰性細胞として HEK293 細胞を、miR-148a 陽性細胞として HepG2 細胞を用いた。

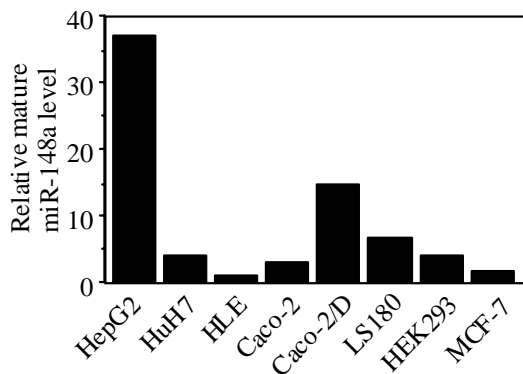


Fig. 2. Mature miR-148a levels in various human cell lines.

(2) ルシフェラーゼアッセイによる MRE148 の評価

miR-148a 陰性の HEK293 細胞に pGL3p/c-148a を導入した時、precursor miR-148a の導入によりルシフェラーゼ活性が 10%以下にまで低下したことから、mature miR-148a が機能的に働いていることが確認された (Fig. 3)。この条件下、CYP3A4 の MRE148 を正方向に組み込んだプラスミドを導入した時、precursor miR-148a を導入してもルシフェラーゼ活性の変動は認められなかった。一方、PXR の MRE148 を正方向に組み込んだプラスミドを導入した時、precursor miR-148a の導入により、ルシフェラーゼ活性が約 30%まで有意に低下した。PXR の MRE148 を逆方向に組み込んだプラスミドでは、活性の変動が認められなかったことより、mature miR-148a が特異的に PXR の MRE148 を認識して発現を制御していることが示唆された。

次に、miR-148a 陽性の HepG2 細胞に pGL3p/c-148a を導入した時、miR-148a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入によりルシフェラーゼ活性が約 2 倍に増大したことから、mature miR-148a が抑制されたことが確認された。この条件下、PXR の MRE148 を正方向に組み込んだプラスミドでは、miR-148a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入により、ルシフェラーゼ活性が約 1.2 倍に有意に増大した。一方、CYP3A4 の MRE148 を正方向に組み込んだプラスミドでは、活性の変動が認められなかった。以上の結果より、CYP3A4 の MRE に対し miR-148a は機能的に働かないものの、PXR の MRE を認識して、発現を負に制御していることが明らかになった。

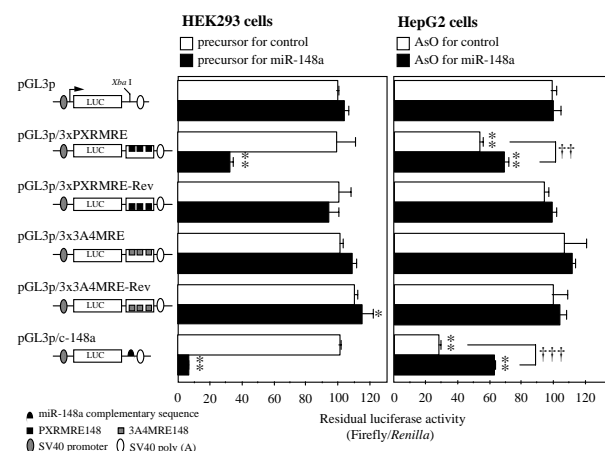


Fig. 3. Luciferase assays to investigate whether MRE148s on PXR and CYP3A4 are functional in regulation by miR-148a.

(3) 内因性の PXR 発現量に及ぼす miR-148a の影響

HepG2 細胞に precursor miR-148a を導入した時、mature miR-148a 発現量が顕著に増大していることが確認された。その時、PXR タンパク発現量がコントロールの 56%まで有意に低下していることが明らかになった (Fig. 4)。その時、PXR のヘテロダイマーパートナーである retinoid X receptor α (RXR α) のタンパク発現量には変動が認められなかったため、PXR に特異的な現象であることが示された。PXR タンパク発現量の変動により、その誘導能が変化するか評価するため、pCYP3A4-362-7.7K を用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、リファンピシンによる転写活性化能および常在的な転写活性が precursor miR-148a の導入により、有意に抑制されることが示された。

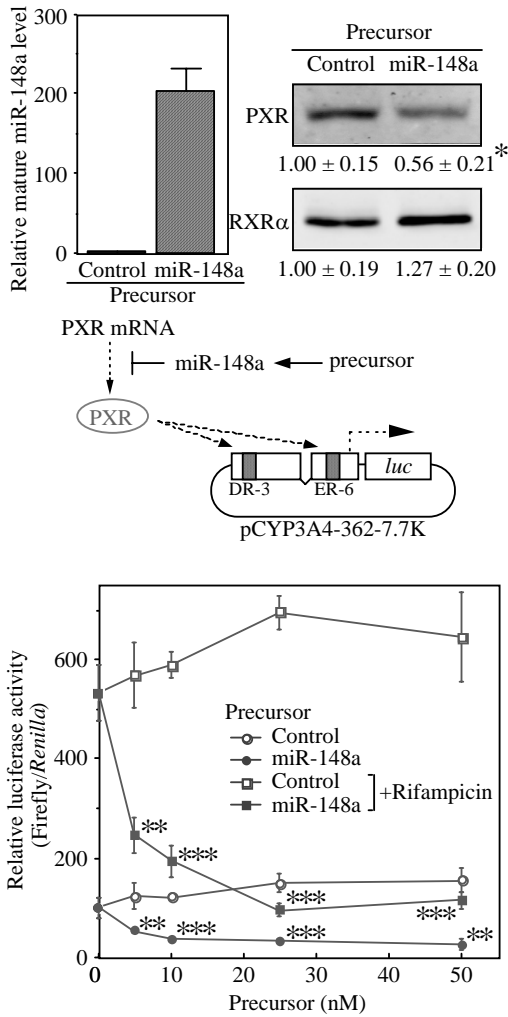


Fig. 4. Effects of overexpression of miR-148a on the PXR protein level in HepG2 cells.

HepG2細胞にmiR-148aに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した時、mature miR-148a 発現量が約 20%まで有意に減少していることが確認された。その時、PXR タンパク発現量がコントロールの 1.9 倍まで有意に増加していることが明らかになった。pCYP3A4-362-7.7K を用いたルシフェラーゼアッセイにおいては、リファンピシンによる転写活性化能および常的な転写活性が miR-148a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入により、有意に増大することが示された。

次に、内因性の PXR 発現量の変動が内因性の CYP3A4 の発現量に影響を及ぼすかどうか評価するため、CYP3A4 の発現量が維持されている LS180 細胞を用いて検討を行った。LS180 細胞に precursor miR-148a を導入した時、PXR タンパク発現量がコントロールの 42%まで有意に低下していることが示された (Fig. 5)。その時、PXR mRNA 発現量には変動が認め

られなかったため、miR-148a は翻訳を抑制していることが示唆された。LS180 細胞に 10 μM リファンピシンを処置すると内因性の CYP3A4 mRNA の発現量が約 5 倍に有意に誘導されたが、precursor miR-148a の導入により、その誘導が認められなくなることが示された。

以上の結果より、miR-148a は PXR の翻訳を抑制することで発現を負に制御しており、それによって CYP3A4 の発現量および誘導能を抑制的に制御していることを明らかにした。

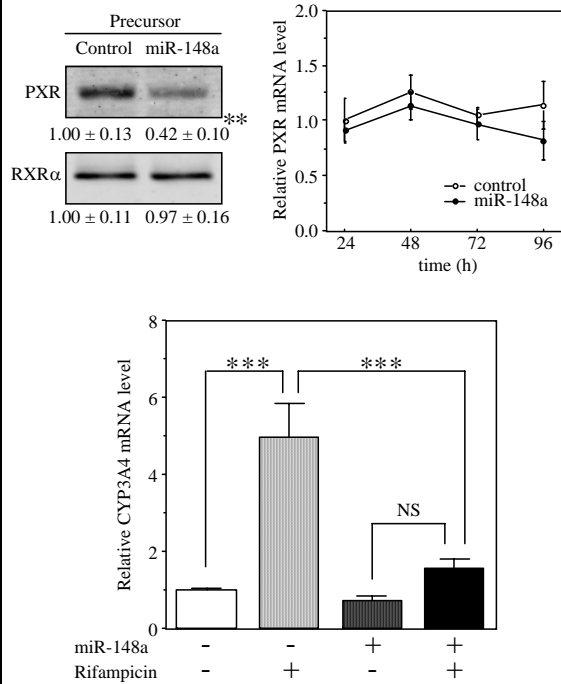


Fig. 5. Effects of overexpression of miR-148a on the induction of endogenous CYP3A4 mRNA in LS180 cells.

(4) ヒト肝における miR-148 発現量の個人差の程度と CYP3A4 や PXR 発現量との関係

25 検体のヒト肝試料における miR-148a の発現量には 95 倍という非常に大きな個人差が認められた。PXR mRNA 発現量と PXR タンパク発現量との間には正の相関関係が認められなかった ($R_s = 0.10$) ことから、転写後調節が関わっていることが示唆され、miRNA の関与が支持された (Fig. 6)。一方、CYP3A4 mRNA 発現量と CYP3A4 タンパク発現量の間には正の相関関係が認められた ($R_s = 0.67$, $p < 0.001$)。PXR の翻訳効率の指標として算出した PXR タンパク発現量/PXR mRNA 発現量の比は miR-148a 発現量と有意な負の相関関係を示した ($R_s = -0.41$, $p < 0.05$) ことより、PXR 発現が miR-148a によって抑制的に制御されていることが支持された。また、興味深い

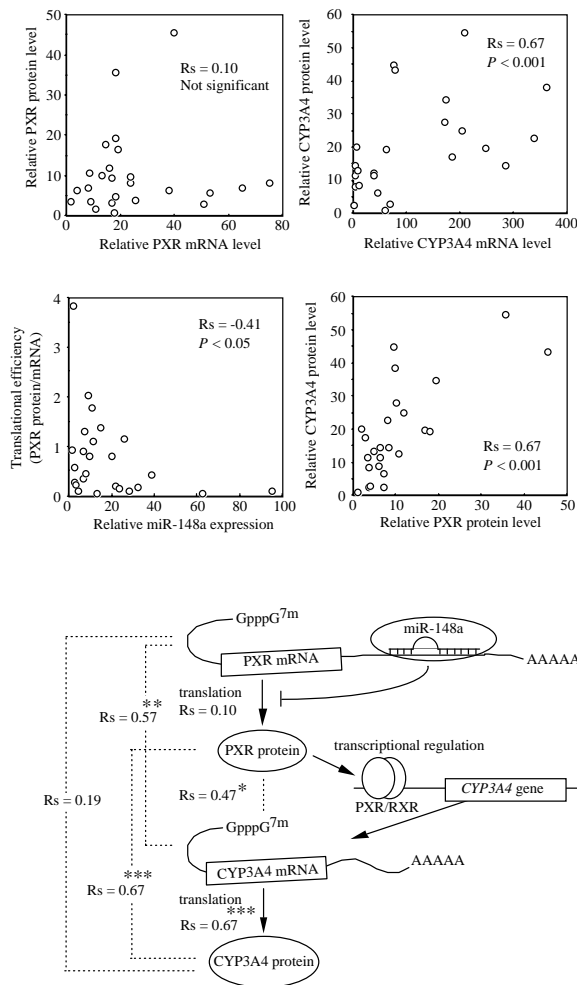


Fig. 6. Relationship between the expression levels of miR-148a, PXR, and CYP3A4 in human liver tissue.

ことに、PXR タンパク発現量は CYP3A4 mRNA 発現量 ($R_s = 0.47$, $p < 0.05$) および CYP3A4 タンパク発現量 ($R_s = 0.67$, $p < 0.001$) と有意な正の相関関係を示した。従って、miR-148a による PXR の転写後調節はヒト肝における CYP3A4 の発現量に影響を及ぼしていることが示された。

以上、本研究により、CYP3A4 の発現を制御している転写因子 PXR が miR-148a によって抑制的に発現が制御されており、それによって CYP3A4 発現量の個人差が生じていることを明らかにした。遺伝子多型や転写調節など、従来の概念で説明できなかった CYP3A4 発現量の大きな個人差の原因を新しい観点から解明することができた。

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 1 件)

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, and Tsuyoshi Yokoi. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. J. Biol. Chem., 283: 9674-9680 (2008). 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

中島美紀、高木信伍、駒形小夜香、茂利拓也、土屋佑樹、横井 毅. 薬物代謝酵素と核内レセプターの microRNA による発現制御. 第 23 回日本薬物動態学会年会, 2008.10.30-11.1, 熊本

Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. CYP enzymes and cancer: regulation by steroids and miRNA. 9th Advanced Course on Steroid Enzymes and Cancer, 2008.5.3-8, Erice, Italy

高木信伍、中島美紀、茂利拓也、加藤美紀、横井 毅. miR-148a によるヒト pregnane X receptor (PXR) の発現制御と CYP3A4 の発現に及ぼす影響. 第 17 回アンチセンスシンポジウム, 2007.12.3-4, 金沢

高木信伍、中島美紀、茂利拓也、横井 毅. ヒト PXR の microRNA による転写後調節. 第 5 回ながの遺伝子発現調節研究会, 2007.11.24-25, 上諏訪

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA post-transcriptionally regulates human PXR affecting the expression level of CYP3A4. 8th International ISSX Meeting, 2007.10.9-12, Sendai

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) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし