

Table 3. Pharmacokinetic parameters of CMZ in carbon tetrachloride-treated rats.

	Control	Carbon tetrachloride-treated	
		Mild	Severe
AUC (mg·hr/L)	106.6 ± 38.9	100.7 ± 10.2	210.1 ± 68.5*
MRT (hr)	100.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2
VRT	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2
CL _{tot} (L/hr)	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.1
K (hr ⁻¹)	1.8 ± 0.7	2.5 ± 0.0	1.5 ± 0.4
V (L)	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1

Data represent the mean ± SD.

**P* < 0.05 compared with control rats.

AUC, area under the serum concentrations-time curves; MRT, mean residence time; VRT, variance of residence time; CL_{tot}, total clearance; K, elimination rate constant; V, volume of distribution.

また、胆管側 ABC トランスポーターの場合、Bsep、Mrp2 および Mrp6 では低下傾向が、Mdr1a および Mdr1b では増加傾向が認められた。DNA マイクロアレイの結果を確認するために、Mdr1a、Mdr1b、Bsep、Mrp2、Mrp4 および Oat2 遺伝子において real-time RT-PCR を行った (Fig. 5)。これら 6 種の遺伝子の発現プロファイルは、DNA マイクロアレイの結果と一致した。

D. 考察

体内に投与された薬物は、主に尿および糞中に排泄される。薬物の排泄に

関しては、肝臓および腎臓の働きが重要である。しかし、肝障害が薬物の排泄に及ぼす影響については明らかにされていない。本章では、肝障害による薬物排泄能の変化を明らかにすることを目的とした。

第一に、典型的な肝毒性化合物である四塩化炭素を用いて、肝障害モデル動物の作製を行った。四塩化炭素は、肝障害に関する毒性学および薬物動態学的研究に広く用いられているため

(Park et al., 2000; Yokogawa et al., 2004; Minami et al., 2005)、本章では、SD 系ラットに四塩化炭素を連続投与することで肝障害ラットを作製した。

また、四塩化炭素による毒性は、肝特異的であるといわれているが、薬物排泄能を検討する際、腎機能も評価する

ことが必要である。本研究では、コーンオイルを投与したコントロール群と四塩化炭素投与群において、

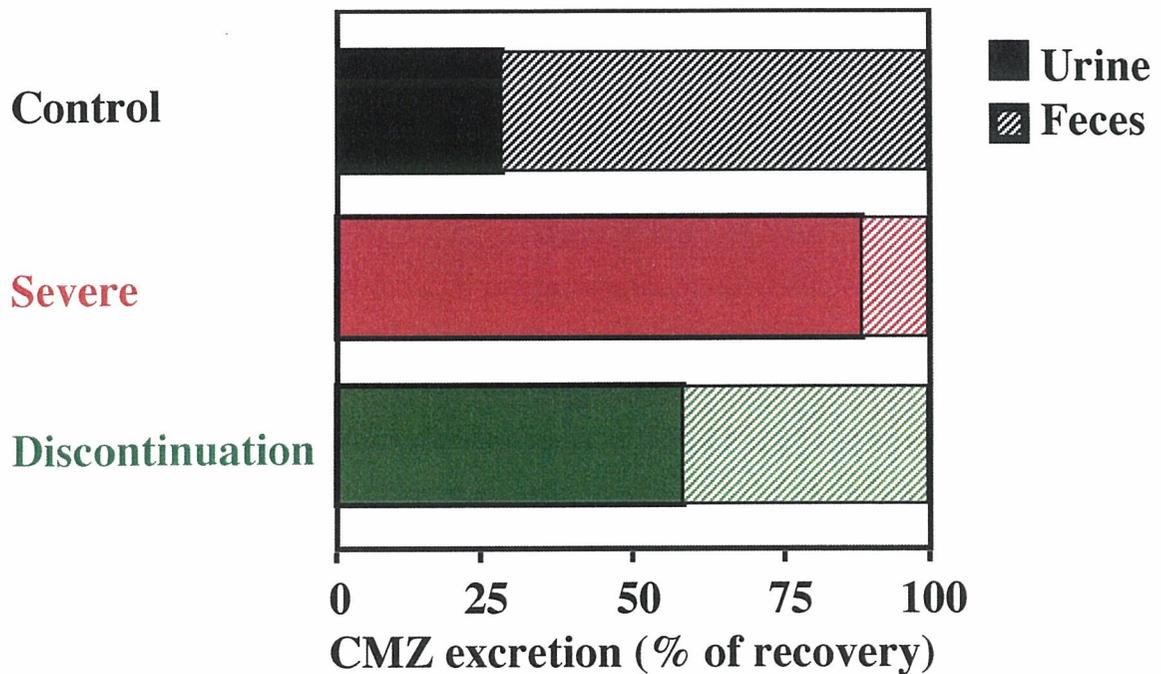


Fig. 3. Changes of CMZ excretion after 14-day discontinuation of CCl₄.

Control, corn oil treatment once every two days for 45 days; severe, CCl₄ treatment once every two days for 45 days and then showing severe liver dysfunction; Discontinuation, non-treatment for two weeks after CCl₄ treatment. Data represent the mean \pm SD (control, n = 5; severe, n = 4; discontinuation, n = 4).

Table 4. Expression changes of hepatic transporters in both mild and severe groups.

Common name	Genebank ID	Fold induction	
		Mild	Severe
Up regulation			
Mdr1a	NM_133401	4.73	8.66
Mdr1b	NM_012623	10.18	21.50
Mrp1	NM_022281	3.68	3.48
Mrp4	AW141985	3.64	3.27
Abcg1	NM_053502	2.46	3.33
Glast	NM_019225	7.56	3.24
Cat-1	NM_013111	7.23	17.46
Mct7b	BQ200772	3.82	3.47
Pit-1	NM_031148	2.97	3.72
Ant1	NM_053515	5.07	4.44
Slc35b2	NM_199111	2.11	2.33
Slc39a1	NM_133315	2.01	2.06
Down regulation			
Mrp2	NM_012833	0.40	0.35
Mrp6	NM_031013	0.41	0.20
Sur	NM_013039	0.29	0.18
Slc2a5	NM_031741	0.32	0.19
Slc6a6	NM_017206	0.41	0.33
Gat2	NM_133623	0.40	0.22
Nadc1	NM_031746	0.32	0.18
Tat1	NM_138831	0.41	0.46
Oct	NM_012697	0.46	0.28
Oat3	NM_031332	0.33	0.10
Nckx3	AY009158	0.32	0.21
NaPi-IIb	NM_053380	0.47	0.32

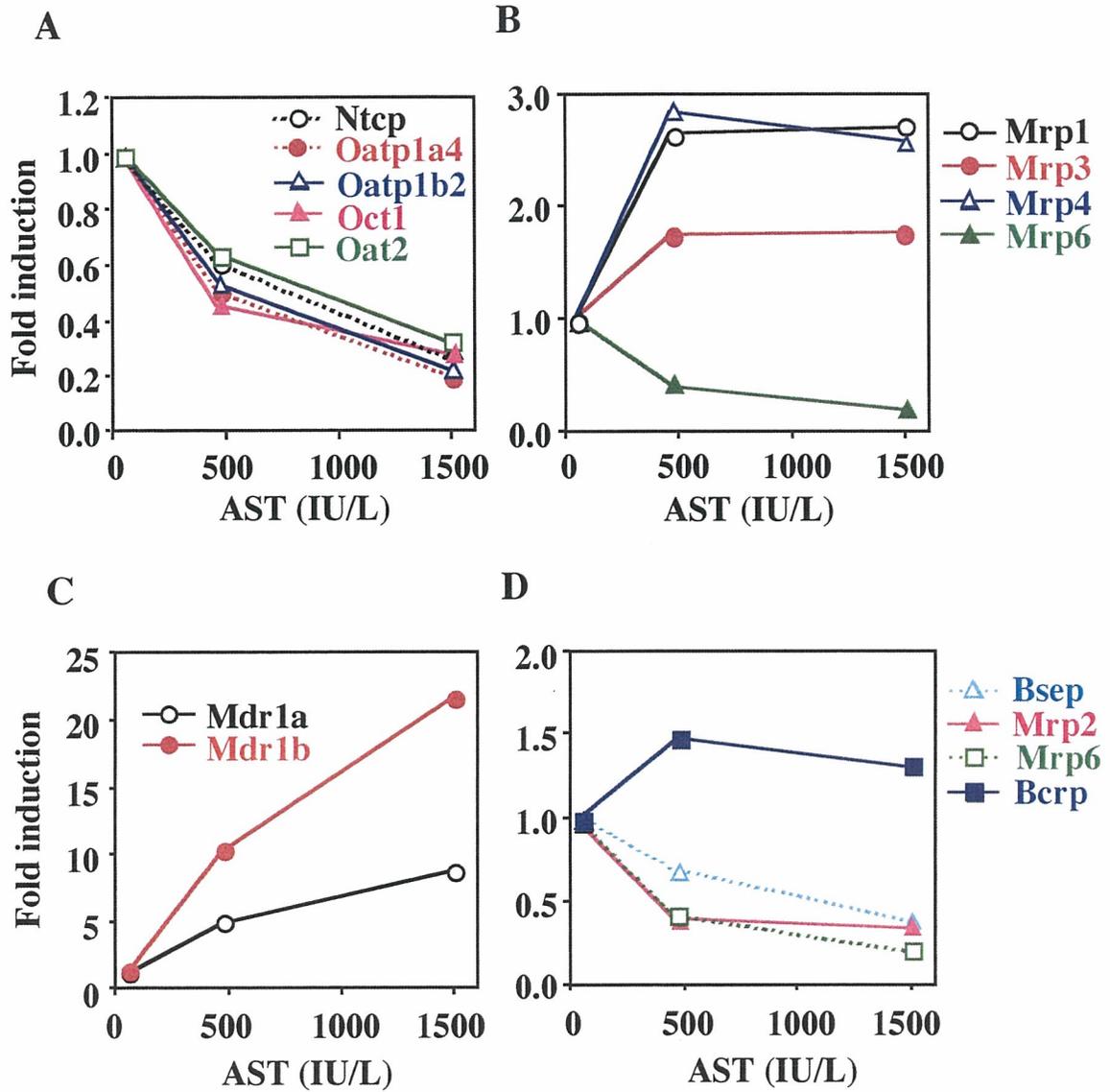


Fig. 4. Expression profile of hepatic transporters measured by DNA microarray.

A, basolateral SLC transporters; B, basolateral ABC transporters; C, canalicular Mdr1 transporters; D, canalicular ABC transporters except Mdr1.

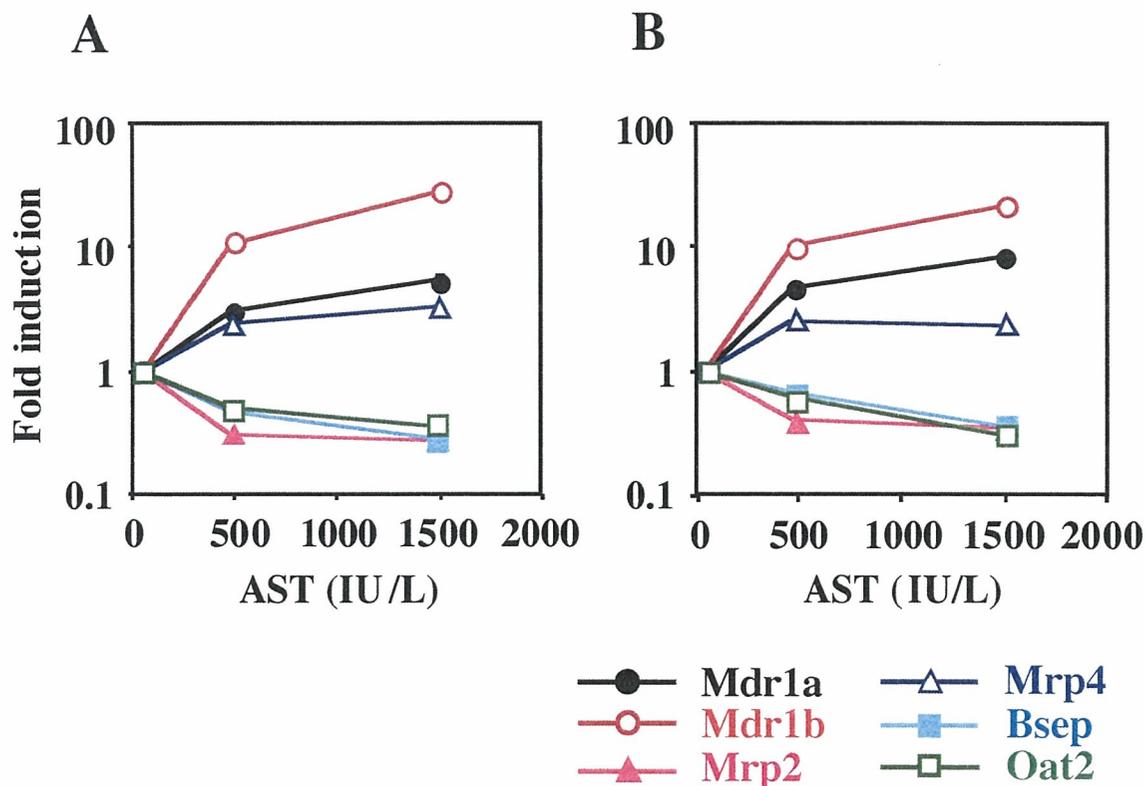


Fig. 5. Comparison of expression profile of hepatic transporters between real-time RT-PCR (A) and DNA microarray (B).

血清中クレアチニン濃度に有意な差は認められなかったことから、四塩化炭素による腎障害は起きなかったと考えられる。同一条件で四塩化炭素投与を投与したが、肝障害ラットにおいて血清中 ALT および AST 値は、大きな差が認められた。ラット肝における組織学研究から、四塩化炭素による肝毒性には大きな個体差が認められたとの報告がある (Cikrt et al., 1975)。これより、血清中 ALT および AST 値の大きな差は、四塩化炭素に対する感受性の個体差と推測できるが、そのメ

カニズムは不明である。

CMZ は、正常ラットにおいて主に胆汁中に排泄される (Murakawa et al., 1980)。本章の結果でも、コントロール群の CMZ 排泄率は、平均で尿中排泄率が 28%、糞中排泄率は 72%であり、主に胆汁排泄であった。また、四塩化炭素投与群では、CMZ の尿中排泄の増加および糞中排泄の低下が認められた。以前に、四塩化炭素誘導性の肝障害により、CMZ の胆汁排泄が低下したとの報告がなされており、今回の結果と矛盾しない (Lopez et al., 1992)。

本章では、CMZ の総回収率は、63.8%であった。しかしながら、6週齢のSD系ラットにCMZを筋肉注射した結果では、CMZの総回収率は88.4%であった (Murakawa et al., 1980)。この差異は、ラットの週齢および投与方法が異なるためと考えられる。CMZの尿中および糞中排泄率は、AST値50 - 600 IU/LおよびALT値25 - 200 IU/Lの範囲において大きく変化した。CMZの排泄パターンは、軽度の肝障害時や進行初期に変化しやすいと考えられる。また、胆汁排泄される胆汁酸のような化合物は、肝障害時に腎排泄が増加すると報告されている (Makino et al., 1975; Cochet et al., 1981; Boscia et al., 1983)。このような排泄経路の変化は、肝障害により胆汁排泄が障害され、血中濃度が上昇した化合物を体外へ排泄するための機構の一つと考えられる。本章で認められた肝障害によるCMZ排泄経路の変化も、同様の機構と考えられる。従って、肝障害に対して、生体内の防御機構が鋭敏に働く可能性が考えられる。

肝障害回復後のCMZ排泄パターンを検討するために、45日間の四塩化炭素投与が終了した後、2週間の休薬を行い、その後CMZ排泄試験を実施した。その結果、休薬後のラットにおけるCMZ排泄パターンは、コントロール群の排泄パターンに戻る傾向を示

した。従って、肝機能の変化に伴いCMZの排泄能が変化する可能性が示された。また、休薬後のラットの血清中ASTおよびALT値は、コントロール群とほぼ同レベルまで減少していた。しかし、休薬後のラットのCMZ尿中および糞中排泄率は、コントロール群と同程度ではなかった。これより、肝障害進行時の薬物排泄能の変化は、ASTおよびALT値の変化に対応しているが、肝障害回復期の薬物排泄能の変化は、ASTおよびALT値の変化に完全には一致していないと考えられる。

肝障害による薬物の体内動態変化が報告されている (Faber et al., 2003; Chandra and Brouwer., 2004; Shitara et al., 2005)。本章では、重度の肝障害群においては、血清中濃度を測定したすべての時間で、コントロール群および軽度の肝障害群より高いCMZ血中濃度が認められ、AUCもコントロール群より有意に高値を示した。しかし、軽度の肝障害群においては、CMZの排泄パターンの変化が認められたものの、CMZのAUCは、コントロール群と比較してほとんど変動が認められなかった。従って、軽度の肝障害群では、肝障害によるCMZの糞中排泄の低下と同時に、CMZ尿中排泄の増加が起るため、CMZの血中濃度が大きく上昇しないと考えられる。肝障

害時には、AUC の変化よりも早く、排泄パターンに影響が現れると考えられる。また、重度の肝障害群では、総 CMZ 排泄量がコントロール群および軽度の肝障害群より高かった。この理由としては、傷害を受けた肝臓での薬物の滞留が短くなり、速やかに排泄された可能性が考えられるが、この機構を明らかにするためには更なる検討が必要である。

近年では、肝トランスポーターが、生体内での薬物移行および分布において、重要な働きをされると考えられている。P-glycoprotein (P-gp) に関しては、代表的な阻害薬のキニジンと併用することで、胆汁排泄クリアランスが低下することが知られている (Angelin et al., 1987)。本章では、肝障害時の薬物排泄能の変化に肝トランスポーターが関与していると考え、DNA マイクロアレイを用いて、肝障害時の肝トランスポーター発現変動を網羅的に解析した。その結果、多くの肝トランスポーターにおいて肝障害時の発現変化が認められた (Table 4)。これらの大きな発現変動を示した肝トランスポーターが、薬物の体内分布や排泄に大きな影響を与えている可能性が考えられる。しかし、遺伝子発現変動が認められた肝トランスポーターの多くは、詳細な機能が明らかになっていない。四塩化炭素投与により、血管

側 SLC トランスポーター遺伝子の発現低下および血管側 ABC トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた (Fig. 4)。Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp) および Organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) は、肝臓内に薬物などを取り込む肝トランスポーターであり、四塩化炭素誘導性の急性肝障害において、mRNA 発現が低下することが報告されている (Geier et al., 2003)。しかし、血管側の排泄トランスポーターである Mrp1、Mrp3、Mrp4 および Mrp6 の発現変動について四塩化炭素投与ラットでの報告はない。マウスにおいては、四塩化炭素単回投与により、肝 mrp1 および mrp4 の増加、肝 ntcp の低下が報告されている (Aleksunes et al., 2005 and 2006)。本章では、血管側の ABC トランスポーターでは、Mrp6 のみ発現が低下したが、Mrp6 は、血管側と胆管側両方に発現していると報告されている (Madon et al., 2000)。血管側の ABC トランスポーターとは異なり、胆管側の ABC トランスポーターは Mdr1 を除いて低下する傾向が認められた。これらの肝トランスポーター遺伝子の発現変動は、血管から肝細胞内への取り込みの減少、および肝細胞から血管側への排泄の増加を導くと考えられる。肝障害時の尿中排泄の増加は、血管からの取り

込みの低下および血管側への排泄の増加によって引き起こされる可能性が示された。

一方で、胆管側の ABC トランスポーターの発現変動は、各トランスポーターで異なる変化を示した。四塩化炭素の単回投与により、ラット肝の Mdr1 遺伝子の増加 (Kier et al., 2004) や mRNA およびタンパク質レベルでラット Mdr1 の増加、Mrp2 の低下が認められたとの報告 (Song et al., 2003) がある。アセトアミノフェン投与ラットでは、肝 Mdr1 および Mrp2 が増加した (Ghanem et al., 2004)。Lipopolysaccharide (LPS) を投与したラットの肝スライスでは、Mrp2 の mRNA レベルは低下、Bsep の mRNA レベルに変化は認められなかったとの報告がある (Elferink et al., 2004)。肝毒性化合物の違いが、肝トランスポーター発現に異なる影響を与えているかもしれないが、ABC トランスポーターの発現変動が、肝障害時の排泄パターンの変化に影響を与えている可能性が考えられる。肝障害時における排泄経路の変化と肝トランスポーターの発現変動の関係を明らかにするために、更なる検討が必要と考えられるが、肝障害時における肝トランスポーターの発現変動を明らかにすることは、肝障害時の薬物動態の予測に有用であると考えられる。

また、肝障害患者において、NTCP、OATP-C、OATP-8 および MRP1 発現の低下が報告されている (Kullak-Ublick et al., 2004)。肝障害の患者の肝細胞を用いた検討では、MRP1 および MRP3 遺伝子の増加が報告されている (Ros et al., 2003)。肝障害時に肝での取り込みトランスポーターの減少および排泄トランスポーターの誘導が同時におこっていると考えられる。Aleksunes (2005 and 2006) らは、協同的な肝トランスポーターの発現変化が生体異物の除去という防御機構を担っているのではないかと述べている。Cherrington (2004) らも同様に、肝トランスポーターの発現変化は、肝防御機構や代償的な過程の調節に寄与していると考察しており、本章の結果もこの考えを支持するものである。

セファロスポリン系の抗生物質は OAT ファミリーに属するトランスポーターによって輸送されるとの報告があるが (Uwai et al., 2002; Khamdang et al., 2003)、現在のところ、CMZ を輸送する肝トランスポーターについては明らかになっていない。本章で発現変動が認められた肝トランスポーターの中に、CMZ の輸送に関与している肝トランスポーターが含まれていると推測される。

以上、本章での結果をまとめると、

四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいて、CMZの尿および糞中排泄率は、AST および ALT 値の上昇に伴い変化することを明らかにした。また、DNA マイクロアレイの結果より、肝障害時の排泄パターンの変化に、肝トランスポーターの発現変動が寄与している可能性が示された。薬物の体内動態についての理解を深めるために、肝障害時の薬物排泄能を明らかにすることは意義があることと考えられる。

E. 結論

薬物動態を理解することが医薬品の適正使用を理解する上で重要である。薬物動態を決定する重要な働きを担う臓器は肝臓であり、薬物代謝および胆汁排泄などの多様な機能を有する。肝臓は年齢や障害により、その機能が変化することが知られており、肝機能の低下をもたらす肝障害と薬物動態の関係を理解することは重要である。本研究では、四塩化炭素誘導性肝障害モデルラットを用いて、肝障害時における薬物排泄能の変化について検討した。CMZ はラットにおいて主に胆汁中に排泄される薬物であるが、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいては、生化学的肝障害マーカーである AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。AST 値

> 600 IU/L および ALT 値 > 200 IU/L を示したラットでは、CMZ は主に尿中に排泄された。すなわち、CMZ の尿中および糞中排泄率は、血清中 AST および ALT 値に依存して変化することを明らかにした。また、DNA マイクロアレイの結果より、肝障害時の糞中排泄から尿中排泄への変化に、肝トランスポーターの発現変動が関与している可能性を示した。

本研究では、四塩化炭素誘導性の肝障害における薬物排泄能の変化が、生化学的肝障害マーカーの変化と相関することを明らかにしたが、CMZ 以外の複数の指標薬物を用いた検討やアルコール性肝障害など異なるタイプの肝障害での検討は今後の課題であると考えられる。また、薬物排泄とトランスポーター輸送活性の関係についての詳細を明らかにすることも重要である。薬物排泄は、薬物の体内動態を明らかにするうえで大変重要である。薬物を効果的かつ安全に使用するために、薬物のヒトにおける排泄経路や、病態時の薬物排泄能を正しく評価することが必要である。本研究は、病態時を考慮した医薬品適正使用および医薬品開発に対して有用な情報を提供できたと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 学会発表

奥村浩敏、加藤美紀、南圭一、中島美紀、横井毅：薬物排泄に及ぼす肝障害の影響、日本薬学会北陸支部会 2006.7.8 金沢

Hirotooshi Okumura, Miki Katoh, Keiichi Minami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Changes of excretory pathway of drugs by liver dysfunction. 第21回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当無し |
| 2. 実用新案登録 | 該当無し |
| 3. その他 | 該当無し |

I. 参考文献

- Aleksunes LM, Scheffer GL, Jakowski AB, Pruimboom-Brees IM and Manautou JE (2006) Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicol Sci* **89**:370-379.
- Aleksunes LM, Slitt AM, Cherrington NJ, Thibodeau MS, Klaassen CD and Manautou JE (2005) Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicol Sci* **83**:44-52.
- Angelin B, Arvidsson A, Dahlqvist R, Hedman A and Schenck-Gustafsson K (1987) Quinidine reduces biliary clearance of digoxin in man. *Eur J Clin Invest* **17**:262-265.
- Balant L, Dayer P and Auckenthaler R (1985) Clinical pharmacokinetics of the third generation cephalosporins. *Clin Pharmacokinet* **10**:101-143.
- Boscia JA, Korzeniowski OM, Snepar R, Kobasa WD, Levison ME and Kaye D (1983) Cefoperazone pharmacokinetics in normal subjects and patients with cirrhosis. *Antimicrob Agents Chemother* **23**:385-389.
- Brauer RW (1959) Mechanisms of bile secretion. *J Am Med Assoc* **169**:1462-1466.
- Chandra P and Brouwer KL (2004) The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* **21**:719-735.
- Cherrington NJ, Slitt AL, Li N and Klaassen CD (2004) Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats. *Drug Metab Dispos* **32**:734-741.
- Cikrt M, Tichy M and Holusa R (1975) Biliary excretion of ⁶⁴Cu, ⁶⁵Zn and ²⁰³Hg in the rat with liver injury induced by CCl₄. *Arch Toxicol* **34**:227-236.
- Cochet B, Belaieff J, Allaz AF, Rudhardt M, Balant L and Fabre J (1981) Decreased extrarenal clearance of cefoperazone in hepatocellular diseases. *Br J Clin Pharmacol* **11**:389-390.
- Elferink MG, Olinga P, Draaisma AL, Merema MT, Faber KN, Slooff MJ, Meijer DK and Groothuis GM (2004) LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G1008-1016.
- Faber KN, Muller M and Jansen PL (2003) Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:107-124.
- Fleck C and Braunlich H (1990) Factors determining the relationship between renal and hepatic excretion of xenobiotics. *Arzneimittelforschung* **40**:942-946.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S and Garton C (2003) Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology*

38:345-354.

Ghanem CI, Gomez PC, Arana MC, Perassolo M, Ruiz ML, Villanueva SS, Ochoa EJ, Catania VA, Bengochea LA and Mottino AD (2004) Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* **68**:791-798.

Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H and Sugiyama Y (2005) Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* **68**:800-807.

Hiron PC, Millburn P, Smith RL and Williams RT (1972) Species variations in the threshold molecular-weight factor for the biliary excretion of organic anions. *Biochem J* **129**:1071-1077.

Khamdang S, Takeda M, Babu E, Noshiro R, Onozato ML, Tojo A, Enomoto A, Huang XL, Narikawa S, Anzai N, Pivachaturawat P and Endou H (2003) Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol* **465**:1-7.

Kier LD, Neft R, Tang L, Suizu R, Cook T, Onsurez K, Tiegler K, Sakai Y, Ortiz M, Nolan T, Sankar U and Li AP (2004) Applications of microarrays with toxicologically relevant genes (tox genes) for the evaluation of chemical toxicants in Sprague Dawley rats in vivo and human hepatocytes in vitro. *Mutat Res* **549**:101-113.

Kullak-Ublick GA, Stieger B and Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**:322-342.

Lopez P, Garcia-Pardo LA, Gonzalez-Gallego J, Gonzalez P and Tunon MJ (1992) Alterations induced by fascioliasis and cirrhosis on the biliary excretion of cefmetazole in Wistar rats. *Comp Biochem Physiol C* **103**:53-56.

Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ and Stieger B (2000) Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* **57**:634-641.

Makino I, Hashimoto H, Shinozaki K, Yoshino K and Nakagawa S (1975) Sulfated and nonsulfated

bile acids in urine, serum, and bile of patients with hepatobiliary diseases. *Gastroenterology* **68**:545-553.

McLean AJ and Morgan DJ (1991) Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *Clin Pharmacokinet* **21**:42-69.

Minami K, Saito T, Narahara M, Tomita H, Kato H, Sugiyama H, Katoh M, Nakajima N and Yokoi T (2005) Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicol Sci* **87**:296-305.

Murakawa T, Sakamoto H, Fukada S, Nakamoto S, Hirose T, Itoh N and Nishida M (1980) Pharmacokinetics of ceftizoxime in animals after parenteral dosing. *Antimicrob Agents Chemother* **17**:157-164.

Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J and Sohn DH (2000) Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J Pharm Pharmacol* **52**:437-440.

Shitara Y, Sato H and Sugiyama Y (2005) Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:689-723.

Song IS, Lee YM, Chung SJ and Shim CK (2003) Multiple alterations of canalicular membrane transport activities in rats with CCl₄-induced hepatic injury. *Drug Metab Dispos* **31**:482-490.

Uwai Y, Saito H and Inui K (2002) Rat renal organic anion transporter rOAT1 mediates transport of urinary-excreted cephalosporins, but not of biliary-excreted cefoperazone. *Drug Metab Pharmacokinet* **17**:125-129.

Vlaming ML, Mohrmann K, Wagenaar E, de Waart DR, Elferink RP, Lagas JS, van Tellingen O, Vainchtein LD, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH and Schinkel AH (2006) Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:319-327.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

MicroRNA によるヒト CYP1B1 の発現制御

分担研究者 中島 美紀 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨

薬物代謝酵素である CYP1 ファミリーの一分子種である CYP1B1 は肝臓にはほとんど発現せず、主に卵巣、子宮、乳腺などステロイド関連組織に発現している。CYP1B1 は様々な癌原物質の代謝的活性化およびエストロゲンの 4 位水酸化反応を触媒し、生成した代謝物は DNA に結合することから発癌と関連している。正常部位に比べ腫瘍部位で CYP1B1 が高く発現していることが知られている。CYP1B1 は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNA レベルでは大きく変化しないことが報告されていることから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒト CYP1B1 遺伝子の発現がマイクロ RNA (miRNA) によって制御されているか検討した結果、CYP1B1 は miR-27b によって転写後調節をされていることを見出した。miR-27b を競合的に抑制すると、CYP1B1 タンパク量は、細胞レベルで約 2 倍に増加した。さらに、miR-27b は乳腺組織に高く発現していることから、乳癌患者 24 名の組織について検討した結果、CYP1B1 タンパクの発現が低い組織では miR-27b の高い発現が認められたが、CYP1B1 タンパクの発現が高い組織では miR-27b の発現量が有意に低く、逆相関が認められた。このとき CYP1B1 mRNA と miR-27b の発現量には相関関係は認められた。これより乳腺において CYP1B1 の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された。

A. 研究目的

薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) はスーパーファミリーを形成しており、多くの分子種が存在する。中でも CYP1、CYP2 および CYP3 ファミリーに属する分子種は薬物代謝型 P450 として肝臓に高く発現してお

り、様々な薬物や内因性物質の代謝反応を触媒する。CYP1 ファミリーの一分子種である CYP1B1 は肝臓にはほとんど発現せず、主に卵巣、子宮、乳腺などステロイド関連組織に発現している (1, 2)。CYP1B1 は様々な癌原物質の代謝的活性化およびエストロゲ

ンの4位水酸化反応を触媒し、生成した代謝物はDNAに結合することから発癌と関連している(3-7)。ほとんどの組織において正常部位に比べ腫瘍部位でCYP1B1が高く発現していることも知られている(8)。

MicroRNA(miRNA)は近年発見された翻訳されない小分子RNAであり、標的mRNAの3'非翻訳領域(3'UTR)に結合することで翻訳抑制やmRNAの分解を引き起こす(9)。いくつかのmiRNAは腫瘍形成に関与することが報告されているが、その標的遺伝子が不明のものがほとんどである。CYP1B1は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNAレベルでは大きく変化しないことが報告されている(10, 11)ことから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒトCYP1B1遺伝子の発現がmiRNAによって制御されているか検討した。

B. 研究方法

ISOGEN(日本ジーン)を用いてHeLa、MCF-7、Jurkat、HEK293細胞よりtotal RNAを抽出し、mature miRNAの発現量をmirVana miRNA Probe Construction kit(Ambion)およびmirVana miRNA Detection kit(Ambion)を用いてRNase protection assayにより求めた。またprecursor miRNAは、ReverTra-Ace(東洋紡)を用いてtotal

RNAよりcDNAを合成し、Smart Cycler System(Cepheid)を用いてreal-time reverse transcription(RT)-PCRにより求めた。miR-27bによる影響を評価するため、pGL3-promoterのルシフェラーゼ遺伝子下流にmiR-27bと完全に相補的な配列を組み込んだプラスミドを構築した(pGL3/miR-27b)。またCYP1B1 3'UTRのmiR-27bと相同性の高い配列MRE27b(miR-27b recognition element)を3つおよび6つ直列に連結した配列を(pGL3/1B1MREx3, pGL3/1B1MREx6)、さらにMRE27bを含む4311-4439の領域を順方向および逆方向に(pGL3/1B1UTR1, pGL3/1B1UTR1rev)、MRE27b配列を含まない3899-4019の領域を組み込んだ(pGL3/1B1UTR2)プラスミドを構築した。これらのプラスミドをphRL-TKとともに、Tfx-20を用いてMCF-7細胞に、lipofectamine 2000を用いてJurkat細胞に導入した。48時間培養した後、dual-luciferase reporter assay system(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。miR-27bを阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド(AsO)のMCF-7細胞への導入は、Gene Pulser II(Bio-Rad)を用いてelectroporation(6×10^5 cells/pulse、220 V、950 μ F)により行った。マイクロソーム画分を用いてSDS-PAGEを行い、ウサギ抗ヒトCYP1B1抗体およびビオチ

ン化抗ウサギ IgG と反応させた後、Vectastain avidin-biotin complex methods (ABC) kit (Vector Laboratories) を用いて DAB 染色により CYP1B1 タンパク質の発現量を解析した。また CYP1B1 の酵素活性を P450-Glo™ CYP1B1 assay (Promega) を用いて測定した。日本人の乳癌患者 24 名より手術で摘出された乳癌組織および周辺の正常組織を用いて miR-27b の定量および CYP1B1 の免疫組織染色を行った。染色の程度 (スコア: 1 - 3)、範囲 (1 - 4) および細胞質への局在 (1 - 3) でスコアを算出し、CYP1B1 タンパク質の発現量を weak (スコア: 3 - 5)、moderate

(6 - 7)、strong (8 - 10) に分類して評価した。

C. 研究結果

C-1. CYP1B1 mRNAs の構造と miR-27b 認識配列

全長 5.2 kb のヒト CYP1B1 mRNA は約 3 kb の長い 3'非翻訳領域を有している。ヒト、マウス、ラット CYP1B1 coding region は 80%以上の高い相同性で保存されているが、3'非翻訳領域末端 40 b 程度の領域にも高い相同性が認められ、この領域が miR-27b と相補的であることを見出した (Fig. 1)。

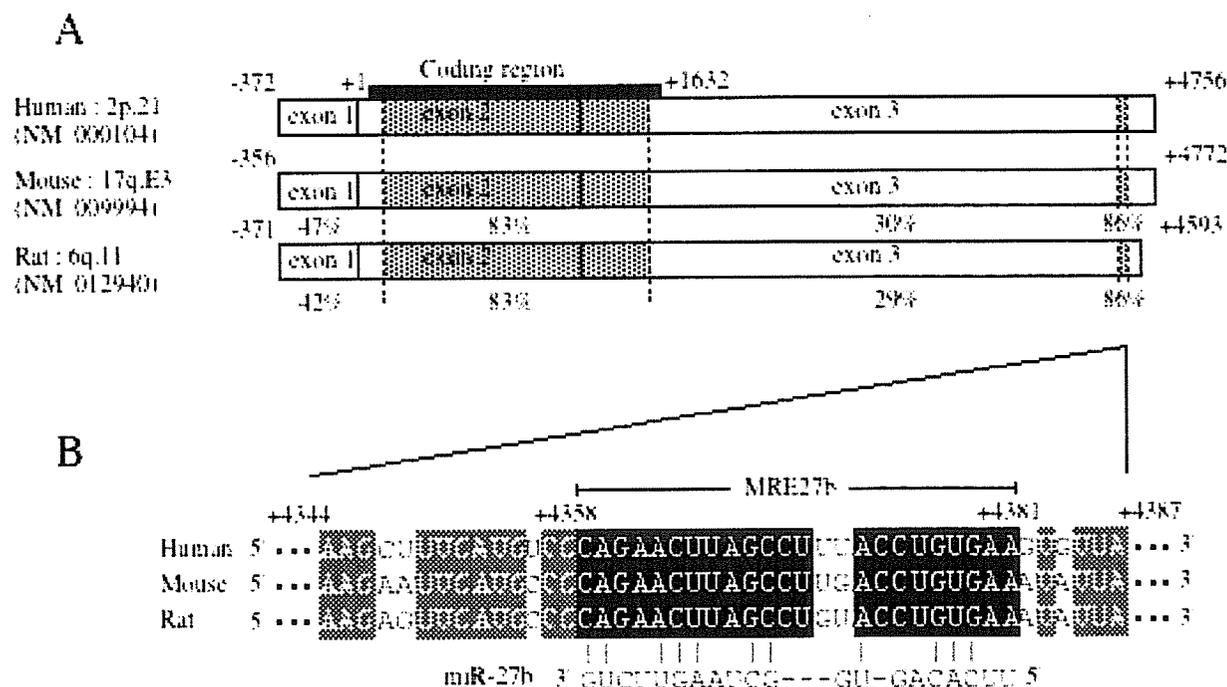


Figure 1. Homology between CYP1B1 mRNAs and the predicted target sequence of miR-27b. **A**, Schematic diagram shows the CYP1B1 mRNA. Highly conserved regions are shown in gray. **B**, Sequence of miR-27b recognition element is located on +4358 to +4381 in the 3'-UTR of human CYP1B1 mRNA.

C-2. miR-27b の発現量とルシフェラーゼアッセイによる MRE27b の機能評価

様々な細胞株における mature miR-27b (Fig. 2A) および precursor miR-27b (Fig. 2B) の発現量を評価したところ、Jurkat 細胞で低く、MCF-7 細胞で最も高い発現が認められた。そこでこれらの細胞株を用いてルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 2C)。miR-27b の発現が高い MCF-7 細胞では MRE27b を含むプラスミドにおいて顕著な活性の低下が認められた。また MCF-7 細胞に発現している miR-27b の機能を阻害するため miR-27b に対するアンチセンスオリゴリボヌクレオチド (AsO) を導入したところ、内因性の miR-27b により抑制されていた活性の回復が認められた。一方、miR-27b の発現が低い Jurkat 細胞では内因性の miR-27b による影響が認められず、precursor miR-27b の導入により MRE27b を組み込んだプラスミドにおいて顕著な活性の低下が認められた。

C-3. miR-27b の阻害による内因性 CYP1B1 タンパク発現への影響

MCF-7 細胞に内因性に発現する CYP1B1 が miR-27b により制御されているか検討した (Fig. 3)。miR-27b に対する AsO を導入したところ miR-27b

の発現の低下を認め (Fig. 3A)、一方で CYP1B1 タンパク発現量の増大が認められた (Fig. 3B)。また、酵素活性も AsO の濃度および時間依存的に上昇することを明らかにした (Fig. 3C, D)。このとき CYP1B1 mRNA 発現量の増加が認められなかった (data not shown) ことから miR-27b が CYP1B1 の翻訳に対して抑制的に働くことが示された。

C-4. 乳腺組織における miR-27b の発現量と CYP1B1 タンパクの発現量の関連

In vitro で検討した miR-27b による CYP1B1 タンパクの発現制御が、*in vivo* においても認められるか検討するため、乳癌患者 24 人より提供戴いた乳癌組織および近接する正常組織を用いて CYP1B1 および miR-27b の発現量の関連について評価した (Fig. 4)。その結果、24 検体すべての乳癌組織において CYP1B1 抗体により癌の部位で細胞質が染色され、CYP1B1 タンパクの発現が認められた (Fig. 4A-C)。次に正常組織および腫瘍組織における miR-27b の発現量の評価を行った (Fig. 4E)。Real-time RT-PCR により評価した precursor miR-27b の発現量は、正常組織に比べて腫瘍組織で有意に低いことを明らかにした。

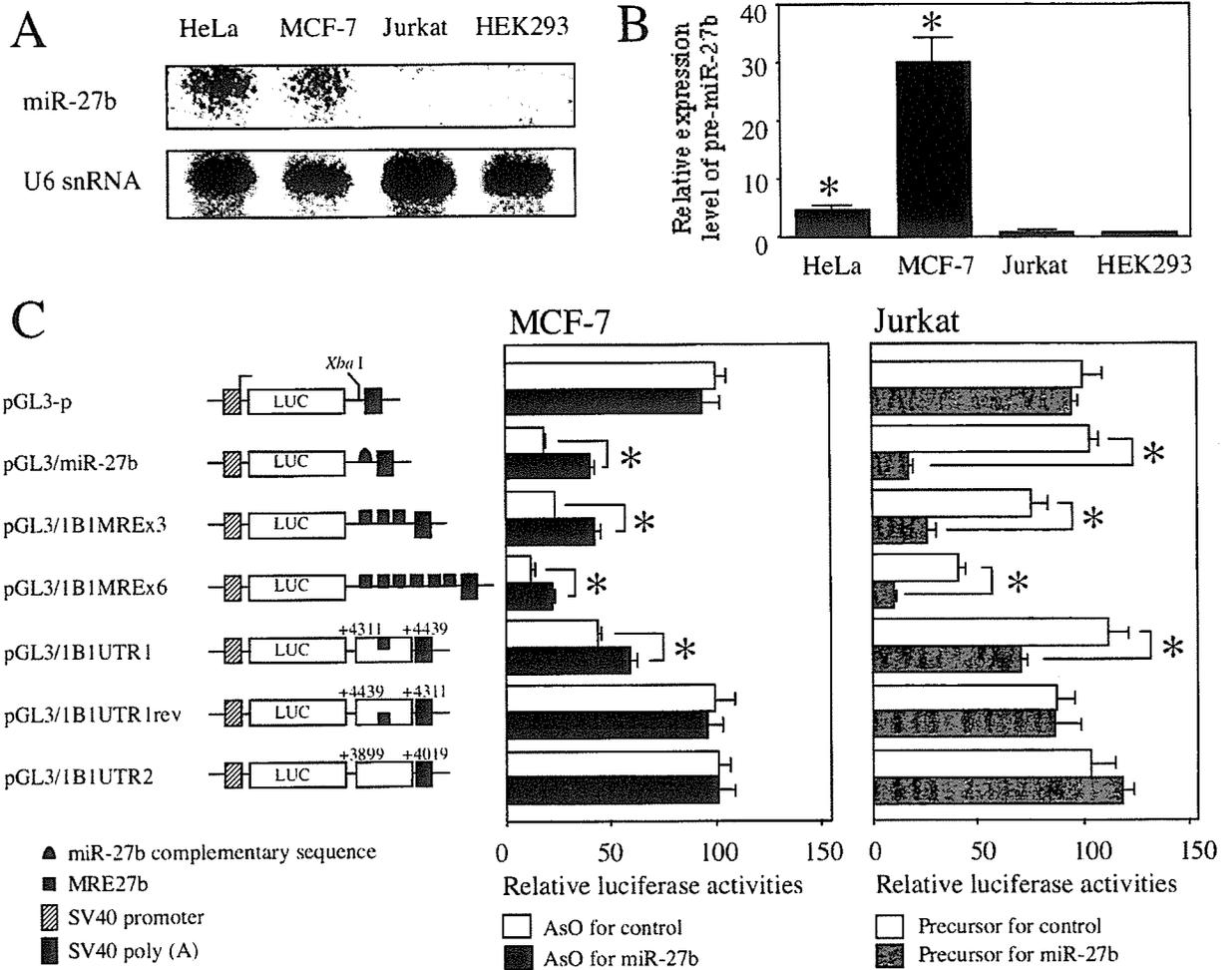


Figure 2. Expression level of miR-27b in various cell lines and luciferase assays with reporter constructs containing MRE27b. **A**, The expression levels of mature miR-27b were determined by RNase protection assay. **B**, The expression of pre-miR-27b was determined by real-time RT-PCR. The values are normalized with the U6 snRNA level. Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments (* $P < 0.01$, compared with Jurkat cells). **C**, The luciferase activities were normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3-p plasmid. Each column represents the mean \pm SD for three independent experiments (* $P < 0.01$, compared with the precursor for control or the AsO for control).

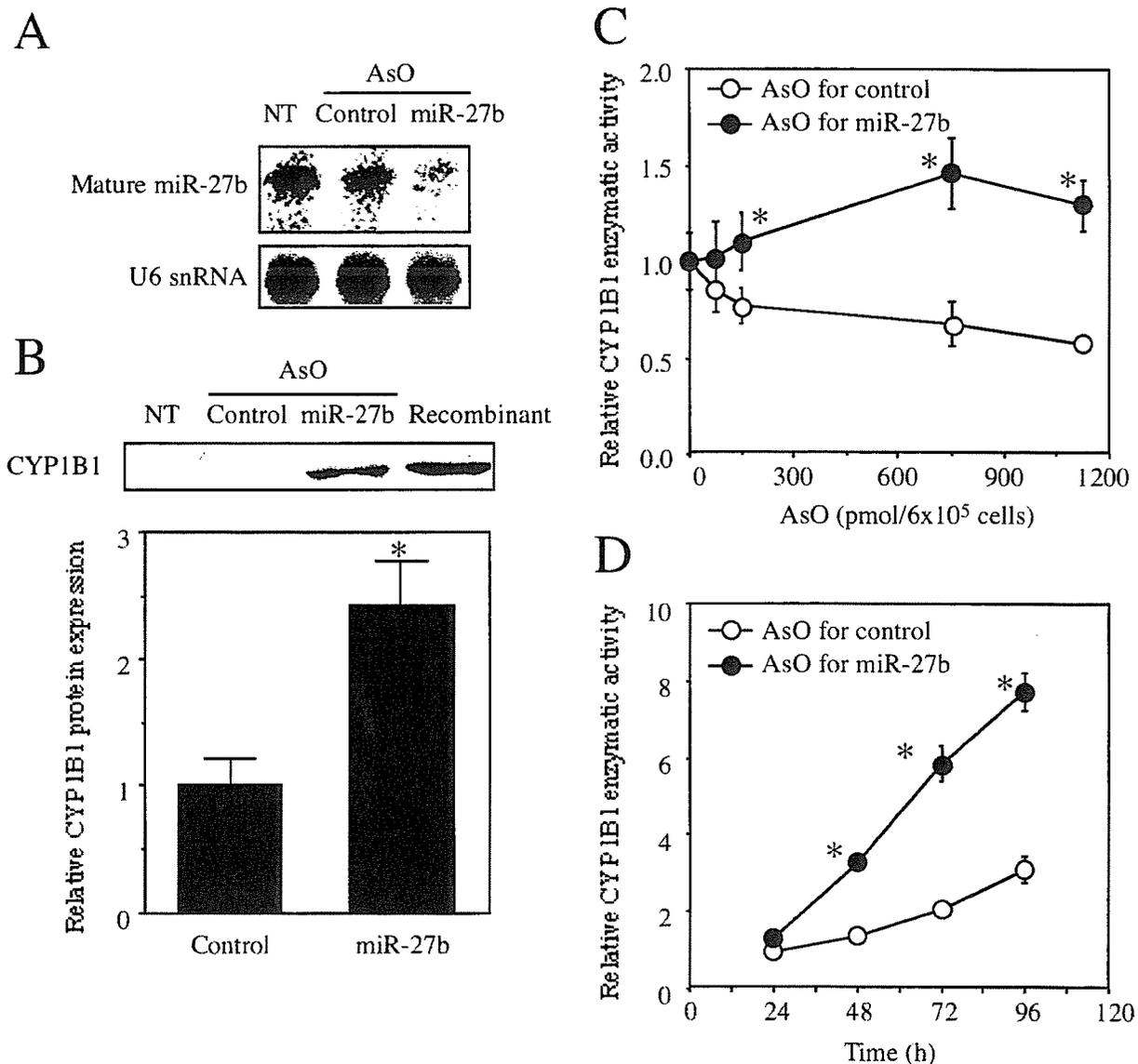


Figure 3. Effects of AsO for miR-27b on the protein level and enzymatic activity of CYP1B1 in MCF-7 cells. **A, B,** The AsOs for miR-27b or control (750 pmol) were electroporated into MCF-7 cells. After 72 h, the cells were harvested. **A,** The expression levels of mature miR-27b and U6 snRNA were determined by RNase protection assays. **B,** The expression levels of CYP1B1 protein were determined by Western blot analyses. Each column represents the mean \pm SD for three independent experiments (* $P < 0.01$, compared with the AsO for control). **C,** Various concentrations of the AsOs for miR-27b or control were electroporated into MCF-7. After 72 h, the CYP1B1 enzymatic activities were determined by P450-Glo assay. Values are expressed relative to the activity without AsO. Data represent the mean \pm SD for three independent experiments (* $P < 0.01$, compared with the AsO for control). **D,** After the

electroporation with 750 pmol of the AsOs, the MCF-7 cells were incubated for 24 to 96 h. Values are expressed relative to the activity with AsO for 24 h. Each point represents the mean \pm SD for three independent experiments (* $P < 0.01$, compared with the AsO for control).

また mature miR-27b と precursor の発現量が相関することも確認した (data not shown)。さらに CYP1B1 タンパクの発現が低い組織では miR-27b の高い発現が認められたが、CYP1B1 タンパクの発現が高い組織では miR-27b の発現量が有意に低く、逆相関が認められた (Fig. 4F)。このとき CYP1B1 mRNA と miR-27b の発現量には相関関係は認められなかった。これより乳腺において CYP1B1 の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された。

D. 考察

CYP1B1 は様々な転写因子により転写が制御されており、これまでに当研究室 (12-14) および他の研究者 (15-17) によって AhR、Sp1、estrogen receptor (ER)、steroidogenic factor -1 が *CYP1B1* の転写調節に関与することがわかっている。本研究により CYP1B1 の発現には転写調節に加えて、miR-27b による転写後調節も関与することが明らかとなった。

miR-27b は乳腺において高く発現している (18)。miR-27b の発現を制御す

る因子は明らかにされていないが、いくつかの miRNA の発現は腫瘍の発達とともに変化することが知られている。miR-27b をコードする遺伝子領域が尿路上皮癌および膀胱癌において欠失する可能性があることが報告されている (19)。CYP1B1 はこれらの腫瘍組織において高い発現が認められている (20) ことから、miR-27b の発現の低下が関与していることが示唆される。検討に用いた乳癌組織はすべて ER 陽性かつ progesterone receptor 陽性であった。また miR-27b および CYP1B1 の発現量と病理学的特徴、病期およびリンパ節転位との関連は認められなかった。乳癌において過剰発現した CYP1B1 は 17 β -エストラジオールの代謝を上昇させることが考えられる。17 β -エストラジオールはエストロゲン依存的な腫瘍の発達を促進する一方で、CYP1B1 により生成する代謝物である 4-水酸化エストラジオールは DNA 損傷を引き起こすことから、CYP1B1 の異常な発現がエストロゲン依存的な腫瘍の発達に関与することが考えられる。

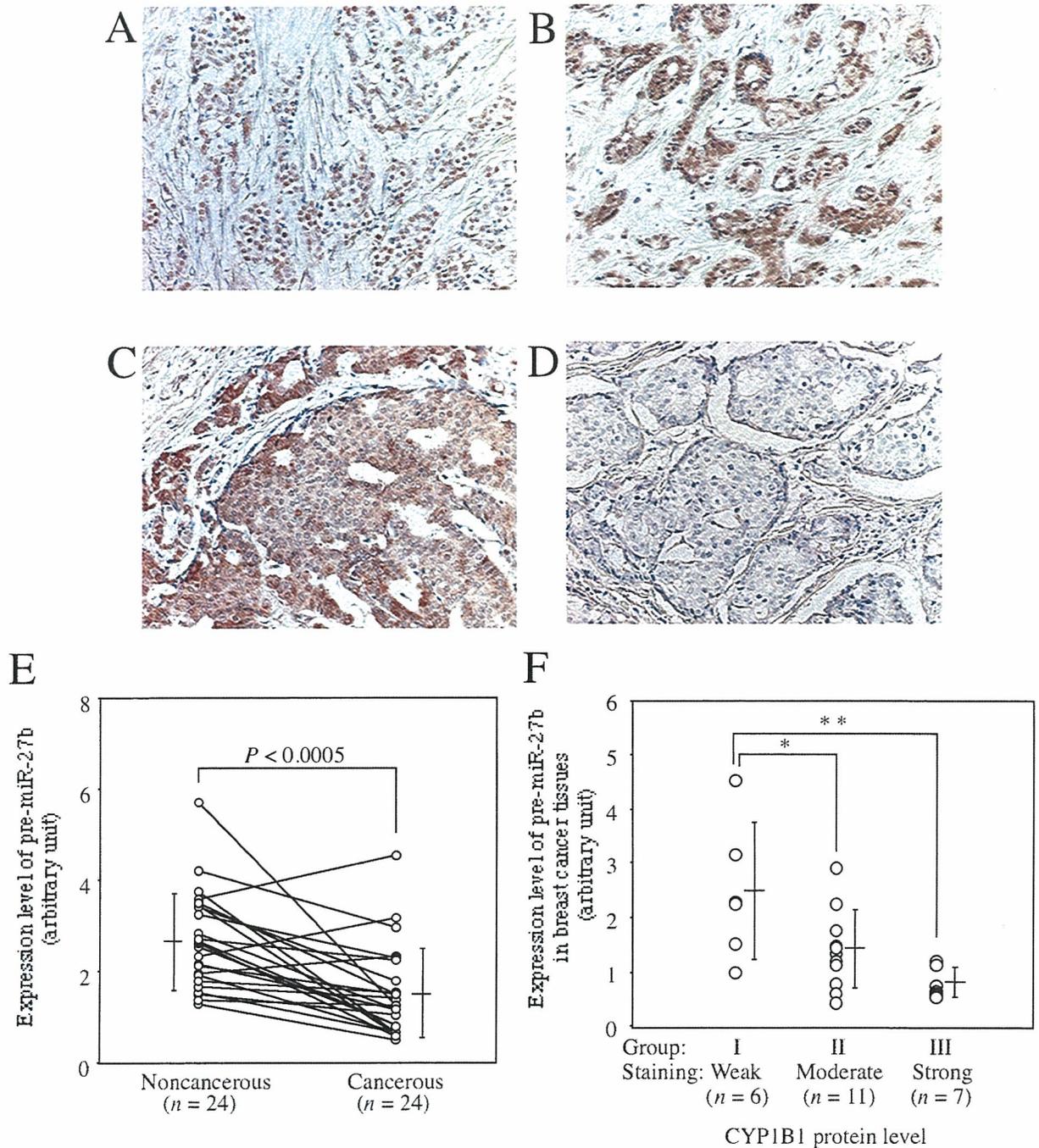


Figure 4. Immunohistochemical staining of CYP1B1 protein in breast cancerous tissues (A-D). A, Grade 1-2 invasive ductal carcinoma (score 3). B, Grade 1-2 invasive ductal carcinoma (score 6). C, Grade 2 invasive ductal carcinoma (score 8). D, There was no staining with normal rabbit IgG. Original magnification, x 200. E, The expression level of pre-miR-27b was determined by real-time RT-PCR and normalized with U6 snRNA level. Each point represents an individual, and horizontal bars with error bar represent the mean \pm SD (** $P < 0.0005$, paired student's *t* test). F, Inverse association between

the expression levels of miR-27b and CYP1B1 protein. The ordinate represents pre-miR-27b level normalized with U6 snRNA. Each point represents an individual, and horizontal bars with error bar represent the mean \pm SD (* P < 0.05; ** P < 0.01).

CYP1B1 は眼にも発現しており、ヒトでは CYP1B1 の変異と原発性先天緑内障との関連が知られている (21-22)。Cyp1b1 ノックアウトマウスでは眼の構造に異常が認められることが報告されている (23)。眼における miRNA の発現量は明らかではないが、miR-27b による CYP1B1 の発現制御が眼の発達に影響を与える可能性が考えられ、さらなる研究が必要である。

本研究は miR-27b の発現低下が腫瘍組織における CYP1B1 の発現上昇のひとつの要因であることを示したものであり、miRNA が薬物代謝酵素をも制御していることを初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takao Taniya and Tsuyoshi Yokoi; MicroRNA regulates the expression of human cytochrome

P450 1B1. *Cancer Res* 2006;66: 9090-9098.

2. 学会発表

高木信伍、中島美紀、土屋佑樹、加藤美紀、横井 毅：ヒト CYP1B1 遺伝子の転写調節における SF-1 および PKA の関与、日本薬学会第 124 年会 2006. 3. 28-30 仙台

Yuki Tsuchiya, Shingo Takagi, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human cytochrome P450 CYP1B1 is a target of microRNA, miR-27b. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6-18-23, Kyoto, Japan

Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006. 11. 29-12. 1 シンポジウム 東京