

においてはヒト初代培養肝細胞で HMG-CoA 還元酵素阻害薬によるアポトーシスが認められており、コレステロール生合成の下流産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸の減少が肝細胞障害の一因であると示唆されている (Kubota et al., 2004)。

本章では 10 種の HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関して CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。フルバスタチンにおいて CYP3A4 の存在下で ATP 測定法、MTT 測定法ともに HepG2 細胞に対する細胞障害が増強したが (Fig. 10)、CYP2C9 の存在下では ATP 測定法で細胞障害が減少した (Fig. 11)。ヒトにおいてフルバスタチンは主に水酸化、脱イソプロピル化、 β -酸化され、水酸化および脱イソプロピル化は CYP2C9 が、5-水酸化は CYP3A4 が触媒すると報告されている (Dain et al., 1993; Fischer et al., 1999)。本章において、フルバスタチンの CYP2C9 を介する代謝は解毒的と考えられ、CYP2C9 存在下では細胞障害が減少したと示唆できる (Fig. 11)。しかし細胞障害の減少は ATP 測定法のみで認められたため、CYP2C9 によるフ

ルバスタチンの代謝によって ATP の枯渇は回避できるが、ミトコンドリアへの障害は回避できないと考えられる。一方 CYP3A4 によってフルバスタチンの細胞障害が増強されたため (Fig. 10)、CYP3A4 によるフルバスタチンの代謝的活性化が示唆された。

ロバスタチンおよびシンバスタチンの代謝は主に CYP3A4 が触媒する (Prueksaritanont et al., 1997; Wang et al., 1991)。ロバスタチンおよびシンバスタチンによる細胞障害が CYP3A4 の存在下で減少したため (Fig. 10)、CYP3A4 を介する代謝経路は解毒的と考えられる。シンバスタチンとその代謝物である 3''-ヒドロキシシンバスタチンでは、コントロールマイクロソーム処置群における細胞生存率の低下は 3''-ヒドロキシシンバスタチンの方が軽微であったため、シンバスタチンの 3''-水酸化は解毒的であると考えられる。ピタバスタチンは CYP によりほとんど代謝されないが、CYP2C9 によってわずかに 8-水酸化体が生じると報告されている (Fujino et al., 1999)。ATP 測定法においてピタバスタチンによる細胞障害が CYP2C9 の存在下

で顕著に減少したのは (Fig. 11)、過剰な CYP2C9 によってピタバスタチンの解毒的代謝が進行したためと考えられる。しかし、MTT 測定法ではピタバスタチンによる細胞障害は顕著に変動しなかったため、フルバスタチンと同様にミトコンドリアへの障害は回避できないと考えられる。またピタバスタチンとそのラクトン体を比較すると、コントロールマイクロソーム処置群ではラクトン体の方が高濃度で細胞生存率が顕著に低下した。他のラクトン体であるシンバスタチン、ロバスタチンもピタバスタチンラクトンと同様に高濃度で強力な細胞障害を示したため、HMG-CoA 還元酵素阻害薬はラクトン構造が開環体よりも肝細胞毒性が強いことが示唆された。

本章では CYP3A4 によりフルバスタチンが代謝的活性化を受けることを明らかにした。HMG-CoA 還元酵素阻害薬の中で、CYP3A4 による代謝的活性化はフルバスタチン特異的であり、フルバスタチンと類似した化学構造も持つセリバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンでは CYP3A4 による代謝的活性化が認められなかつ

たため、フルバスタチン特異的な代謝的活性化の経路が存在すると考えられる。CYP3A4 によるフルバスタチンの代謝的活性化が臨床で惹起される肝障害にどの程度寄与しているかは定かではないが、フルバスタチンの反応性代謝物やその細胞障害メカニズムをさらに解明することは副作用の発現防止に重要かもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表 論文作成中

2. 学会発表

水野 克彦、加藤美紀、中島美紀、横井 毅；ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化：第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26～28 日 (発表予定、抄録提出済)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

I. 引用文献

Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, and Gershlick AH for the CLASSICS Investigators (2000) Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a

- loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* **102**:624-629.
- Bellosta S, Paoletti R, and Corsini A (2004) Safety of Statins: Focus on Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Circulation* **109**:50-57.
- Boissonnat P, de Lorgeril M, Perroux V, Salen P, Batt AM, Barthelemy JC, Brouard R, Serres E, and Delaye J (1997) A drug interaction study between ticlopidine and cyclosporin in heart transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* **53**:39-45.
- Caplain H, Donat F, Gaud C, and Necciari J (1999) Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* **25**:25-8.
- Dain JG, Fu E, Gorski J, Nicoletti J, and Scallen TJ (1993) Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* **21**:567-572.
- Dalvie DK and O'Connell TN (2004) Characterization of novel dihydrothienopyridinium and thienopyridinium metabolites of ticlopidine in vitro: role of peroxidases, cytochromes p450, and monoamine oxidases. *Drug Metab Dispos* **32**:49-57.
- Donahue SR, Flockhart DA, Abernethy DR, and Ko JW (1997) Ticlopidine inhibition of phenytoin metabolism mediated by potent inhibition of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther* **62**:572-577.
- エリミンインタビューフォーム (2007) 大日本住友製薬株式会社 1-16.
- Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP, and Robinson WT (1999) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* **27**:410-416.
- Fujino H, Yamada I, Kojima J, Hirano M, Matsumoto H, and Yoneda M (1999) Studies on the metabolic fate of NK-104, a new inhibitor of HMG-CoA reductase (5): In vitro metabolism and plasma protein binding in animals and human. *薬物動態* **14**:415-424.
- Fukazawa H, Ichishita H, Honda M, and Shimazu H (1978) Pharmacokinetics studies of flunitrazepam in healthy male Japanese subjects. *臨床薬理* **9**:251-265
- Gidal BE, Sorkness CA, McGill KA, Larson R, and Levine RR (1995) Evaluation of a potential enantioselective interaction between ticlopidine and warfarin in chronically anticoagulated patients. *Ther Drug Monit* **17**:33-38.

Guengerich FP (1995) Human cytochrome P-450 enzymes, in *Cytochrome P-450* (PR Ortiz de Montellano ed) pp. 473-535, New York Plenum, New York.

Guengerich FP and MacDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem Res Toxicol* **20**:344-369.

Hesse LM, Venkatakrisnan K, von Moltke LL, Shader RI, and Greenblatt DJ (2001) CYP3A4 is the major CYP isoform mediating the in vitro hydroxylation and demethylation of flunitrazepam. *Drug Metab Dispos* **29**:133-140.

Kalgutkar AS, Henne KR, Lame ME, Vaz AD, Collin C, Soglia JR, Zhao SX, and Hop CE (2005) Metabolic activation of the nontricyclic antidepressant trazodone to electrophilic quinone-imine and epoxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P4503A4. *Chem Biol Interact* **155**:10-20.

Kangas L, Kanto J, and Syvälahti E (1977) Plasma nitrazepam concentrations after an acute intake and their correlation to sedation and serum growth hormone levels. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **41**:65-73.

Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, and Deese A (2007) Identification of a novel glutathione conjugate of flutamide in incubations with human liver microsomes.

Drug Metab Dispos **35**:1081-1088.

Kaplowits N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* **24**:483-490.

加藤隆一、鎌滝哲也 (2000) 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版. 東京化学同人, 東京 171-172.

Kilicarslan T, Haining RL, Rettie AE, Busto U, Tyndale RF, and Sellers EM (2001) Flunitrazepam metabolism by cytochrome P450s 2C19 and 3A4. *Drug Metab Dispos* **29**:460-465.

Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, and Oishi R (2004) Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **67**:2175-2186.

Masubuchi Y (2006) Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**:347-356.

Moussa I, Oetgen M, Roubin G, Colombo A, Wang X, Iyer S, Maida R, Collins M, Kreps E, and Moses JW (1999) Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* **99**:2364-2366.

ネルボンインタビューフォーム (2007)

第一三共株式会社 1-51.

パナルジンインタビューフォーム (2007)
第一三共株式会社 1-62.

Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL,
Pirmohamed M, and Williams DP (2005)
The role of metabolic activation in
drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev
Pharmacol Toxicol* **45**:177-202.

Peng FC, Chaing HH, Tang SH, Chen PC,
and Lu SC (2004) NADPH-cytochrome
P-450 reductase is involved in flunitrazepam
reductive metabolism in Hep G2 and Hep 3B
cells. *J Toxicol Environ Health A*
67:109-124.

プラビックスインタビューフォーム
(2006) サノフィ・アベンティス株式会社
1-61.

Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L,
Yu X, Zhao JJ, Slaughter DE, Arison BH,
and Vyas KP (1997) *In vitro* metabolism of
simvastatin in humans [SBT]identification of
metabolizing enzymes and effect of the drug
on hepatic P450s. *Drug Metab Dispos*
25:1191-1199.

Rieder J (1973) Plasma levels and derived
pharmacokinetic characteristics of unchanged
nitrazepam in man. *Arzneimittelforschung*
23:212-218.

Riley RJ, Maggs JL, Lambert C,

Kitteringham NR, and Park BK (1988) An *in vitro* study of the microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *Br J Clin Pharmacol* **26**:577-588.

Samuel K, Yin W, Stearns RA, Tang YS,
Chaudhary AG, Jewell JP, Lanza T Jr, Lin
LS, Hagmann WK, Evans DC, and Kumar S
(2003) Addressing the metabolic activation
potential of new leads in drug discovery: a
case study using ion trap mass spectrometry
and tritium labeling techniques. *J Mass
Spectrom* **38**:211-221.

Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC,
Maffrand JP, Berger Y, and Herbert JM
(1994) The antiaggregating activity of
clopidogrel is due to a metabolic activation
by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb
Haemost* **72**:313-317.

Schwartz MA, Koechlin BA, Postma E,
Palmer S, and Krol G (1965) Metabolism of
diazepam in rat, dog, and man. *J Pharmacol
Exp Ther.* **149**:423-435.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y,
and Guengerich FP (1994) Interindividual
variations in human liver cytochrome P-450
enzymes involved in the oxidation of drugs,
carcinogens and toxic chemicals: studies with
liver microsomes of 30 Japanese and 30
Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*
270:414-423.

サイレースインタビューフォーム (2005)
エーザイ株式会社 1-31.

Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R, and Monshouwer M (2005) An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**:154-167.

Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem Res Toxicol* **12**:387-395.

Wang RW, Kari PH, Lu AY, Thomas PE, Guengerich FP, and Vyas KP (1991) Biotransformation of lovastatin. IV. Identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for the oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes. *Arch Biochem*

Biophys **290**:355-361.

Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M, and Yokoi T (2002) Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **30**:155-160.

Yoneda K, Iwamura R, Kishi H, Mizukami Y, Mogami K, and Kobayashi S (2004) Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat *in vitro* metabolites. *Br J Pharmacol* **142**:551-557.

Zimmerman HJ (1999) Drug-induced liver disease. in *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs other chemicals on the liver*. 2nd ed. pp. 427-456, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

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

肝障害化合物投与によるマイクロRNAの発現変動とその役割の検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

miRNA マイクロアレイを用い、チオアセタミド処置後早期において変動する miRNA について探索した。毒性に関与する miRNA として、miR-21 が見出され、その変動は複数の肝毒性化合物において認められた。見出された miR-21 について、*in vitro* 実験系を用いて miR-21 抑制状態が及ぼす薬物誘導性細胞障害を検討した。検討に用いたシンバスタチン、ロバスタチンにおいて細胞障害性が miR-21 の AsO 導入によって増強され、miR-21 の働きは細胞の保護作用であることを薬物誘導性細胞障害の面から明らかにした。以上、miRNA という新しい分野において、薬物誘導性肝障害に及ぼす影響をいち早く検討した報告として、これから進んで行くであろう miRNA の毒性学的な機能解析に情報を提供するものである。

A. 研究目的

毒性学の研究目的の一つとして、医薬品開発段階における新規化合物のヒトにおける毒性の予測が挙げられる。そのためには、前臨床試験での実験動物における毒性の予測が不可欠である。優れた毒性予測の手法を開発することによって、薬物を投与される患者の安全が確保されるだけでなく、新たな薬物を作り出す側である製薬会社にとっても、上市できない可能性のある薬物に時間と資金をかけることなく早期に開発を中止することが

できる。そのため、数百億、十年単位ともいわれる新規医薬品開発への大きな貢献が期待される。

医薬品によってもたらされる予期しない様々な有害事象のうち、最も問題となるのが薬物誘導性肝障害である。肝臓は糖新生や胆汁の分泌など、様々な働きを持つ臓器である。異物代謝も重要な働きの一つであり、多くの薬物が主に肝臓で代謝を受ける。薬物誘導性肝障害には、成因として薬物自身または代謝産物の肝毒性、あるいは薬物の代謝異常により産生された肝

毒性代謝物によって発症する中毒性肝障害と、薬物あるいはその代謝産物と生体物質とが結合して形成された抗原物質に対する薬物アレルギー反応により発症するアレルギー性肝障害に分類される。様々な肝障害の発症機序は断片的に解明されてはいるものの、最終事象を肝細胞死と考えた場合、そこに至るまでに何らかの共通な経路が存在している可能性がある。そういった共通の経路を見つけだすことができた場合、新規化合物の肝毒性の予測において非常に有効な検査手段として用いることができる。

網羅的な遺伝子発現変動解析によって絞り込まれた遺伝子が、肝毒性に対してどのような影響を及ぼすかを検討する方法として、RNA 干渉 (RNAi) による標的遺伝子のノックダウンが簡便なものとして利用されている。RNAi は二本鎖 RNA が生体内に取り込まれた後、RNase III ファミリーに属する Dicer という酵素によって 2 塩基のオーバーハングを持つ 20 塩基程度の siRNA に分割され (Elbashir et al., 2001b)、その siRNA が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、相補的な配列を持つ RNA を分解するという現象である (Hammond et al., 2000)。初期の頃は線虫 (Fire et al., 1998) やショウジョウバエ (Pal-Bhadra et al., 1997) におい

て報告されたが、哺乳類細胞には起こらないとされてきた。哺乳類細胞への 150 塩基以上の二本鎖 RNA を導入すると、長い二本鎖 RNA に応答して活性化される RNase L によって非特異的に RNA の分解が誘発されるため、この経路はウイルスの感染に対するインターフェロン応答の一部と考えられている (Stark et al., 1998)。しかし、Tuschl らの研究グループがあらかじめ 21 塩基の短い二本鎖 RNA として導入することで哺乳類細胞での RNAi を成功させた (Elbashir et al., 2001a)。それ以来哺乳類細胞に対する RNAi が盛んに行われるようになり、毒性学を含めた様々な分野に応用されている。

さらに、近年 RNAi 技術と並ぶ機能性 small RNA として、microRNA (miRNA) が注目されている。この miRNA は近年発見された 18-22 塩基の RNA であり、多くの生物種において保存され、その数は 500 種類以上が知られている (Berezikov et al., 2006)。そのコード領域は様々で、複数の miRNA でクラスターを形成するものから、別の遺伝子の intron 部分に組み込まれているものも多く存在する (Kim YK and Kim VN, 2007)。普通の RNA と同じく転写された数百から数万塩基の RNA は Primary miRNA と呼ばれ (Cai et al., 2004)、RNase III ファミリーの Drosha を含む microprocessor

によって Precursor miRNA に切り出される(Denli et al., 2004, Gregory et al., 2004, Lee et al., 2003)。Exportin-5 によって核外に輸送された Precursor miRNA は、siRNA と同様に Dicer によってループ部分が切り出され、短い二本鎖 RNA となる (Lund et al., 2004)。ここからは siRNA と同様にタンパクの複合体である RISC に取り込まれ (Gregory et al., 2005)、標的となる遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合し、翻訳を阻害する (Zeng et al., 2002)。しかしながら、siRNA とは異なり、配列選択の特異性が低く、アンチセンス鎖の 5' 末端より 8 塩基、いわゆる seed sequence が標的配列への結合に大きく寄与しており、一つの miRNA において数十種類もの標的遺伝子を有する可能性が示唆されている (Miranda et al., 2006)。

本研究では、チオアセタミド(TA)を処置したラットにおける miRNA の発現変動を検討した。この際、miRNA の作用システムである転写抑制を考慮し、毒性を発現する前の投与後の早い段階における変動を検討した。また、マイクロアレイの結果から見出された miRNA について、他の 4 つの肝毒性化合物においても同様の時間帯において発現変動を検討した。次に、*in vitro* の系を用いて、マイクロアレイの結果見出された miRNA の発現量を

アンチセンスオリゴ (AsO)の導入によってコントロールした際の細胞生存率への影響を検討した。

B. 実験材料及び実験方法

B-1. 実験材料及び試薬

MiRNeasy Mini kit はキアゲンより購入した。miRCURY™ LNA array は EXIQON (Vedbaek, Denmark)より購入した。NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit はインビトロジェンより購入した。ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD)より、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞およびヒト卵巣顆粒膜細胞癌由来 KGN 細胞は Riken Gene Bank (Tsukuba, Japan)より購入した。ヒト肝癌由来 HLE 細胞および HuH-7 細胞は武田薬品工業 (Osaka, Japan)より御供与いただいた。プラバスタチンナトリウム、フルバスタチンナトリウム、ロバスタチンは和光純薬工業より、シンバスタチンは Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada)より購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8)は同仁化学 (Kumamoto, Japan)より、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)は日水製薬より、Lipofectamine™ RNAiMax はインビトロジェンより購入した。Locked Nucleic Acid (LNA)を含む AsO miR-21

および対照用ネガティブコントロール (SCR)はグライナージャパンに委託して合成した。その他の試薬類は市販品の特級、生化学用または高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。

B-2. ラットへの投与

投与時間は各肝毒性化合物において1時間、2時間、6時間および12時間、各対照群において1時間とした。

B-3. Total RNA の調製

Total RNA を回収後、マイクロアレイまたは real-time RT-PCR に供する前に MiRNeasy Mini kit のプロトコールに従い、total RNA の精製を行った。Total RNA 100 μg に QIAzol Lysis Reagent 700 μL を加え、攪拌した後、室温にて5分間放置した。クロロホルムを 140 μL 加え 15 秒間激しく 15 秒間攪拌し、室温で 3 分間放置した後、12,000 g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清 400 μL を別のチューブに採取し、600 μL のエタノールを加えて攪拌した後、付属のスピンカラムにアプライし、10,000 g、室温にて 15 秒間遠心分離した。ろ液を廃棄し、700 μL の Buffer RWT をスピンカラムに加え、10,000 g、室温にて 15 秒間遠心分離し、ろ液を廃棄した。さらにスピンカラムに Buffer RPE を 500 μL 加え、10,000 g、

室温にて 15 秒間遠心分離を 2 回繰り返し、さらに 10,000 g、室温にて 2 分間遠心分離し、スピンカラムを乾燥させた。スピンカラムをサンプルチューブに移し替え、50 μL の DEPC 処理水を加えて 10,000 g、室温にて 1 分間遠心分離する操作を二回繰り返し、RNA を溶出して定量し、以下の実験に供した。

B-4. miRNA マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現変動解析

EXIQON のマニュアルに従ってすべての操作を行った。IV-2-3 にて精製した total RNA 5 μg に 2.5 x labeling buffer 8 μL , fulorescent label 2 μL , positive control 1 μL , labeling enzyme 2 μL を加え、DEPC 処理水で 20 μL にした後、0°C で 1 時間、65°C で 15 分間、サーマルサイクラーにてインキュベートした。反応後の溶液を真空乾燥機により 15 μL まで濃縮し、15 μL の hybridization buffer を加え、95°C で 5 分間インキュベートした。これ以降の操作は全て遮光して行った。微量遠心器にて 2 分間遠心分離を行い、添付の 4 x salt buffer を 60 μL をハイブリチャンバー (Takara hybridization chamber 5, Takara) に加え、Ambion Bioarray LifterSlips (Ambion, Austin, TX) をのせたマイクロアレイスライドに反応液を全量加え、60°C の水浴で 18 時間イ

ンキュベートした。反応後に添付の buffer A, B, C にて洗浄し、乾燥させた。アレイスライドのスキャンには Molecular Devices (Toronto, Canada) の Genepix 4100A を用いた。得られたデータは、アレイに搭載されている U6 RNA のスポット強度で補正し、解析に供した。

B-5. Poly A 伸長反応と RT 反応

B-3 で得られた total RNA を用い、NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit のプロトコールに準じて行った。Total RNA を 0.5 µg, 5 x miRNA Reaction Buffer 1 µL, 25 mM MgCl₂ 0.5 µL, 5 mM ATP 0.2 µL, Poly A Polymerase 0.5 µL に DEPC 処理水を加え全量を 5 µL とし、37°C で 15 分間インキュベートした。反応液を 4 µL とり、Annealing Buffer 1 µL と 25 µM Universal RT Primer 3 µL と混合し、65°C で 5 分間インキュベートした。反応終了後に氷冷し、氷上で 2 x First-Strand Reaction Mix 10 µL と Superscript™ III RT/RNaseOUT™ Enzyme Mix 2 µL を加え、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間インキュベートし、real-time RT-PCR に供した。

B-6. Real-time RT-PCR による miR-21 発現変動の検討

MiR-21 および補正用 GAPDH につ

いて、real-time RT-PCR により発現を検討した。MiR-21 の測定に使用したプライマーについて、RP は NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit に付属のものを用いたため、FP のみを以下に示す。MiR-21, FP: 5'-TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A-3'.

B-7. 細胞培養

HepG2, HLE, HuH-7 細胞および HeLa 細胞は、10% FBS を含む DMEM で培養した。MCF-7 細胞は NEAA を含む 10% FBS DMEM で培養した。KGN 細胞は 10% FBS を含む Ham's F-12/DMEM にて培養した。全ての細胞は 5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

B-8. トランスフェクションおよび薬物処置

HeLa 細胞に対する AsO のトランスフェクションは、Lipofectamine™ RNAiMax のプロトコールに従って行った。導入した AsO および対照群のスクランブルオリゴ (SCR) の配列は、5'-TCA A_LCA T_LCA G_LTCT_LGAT_LAA A_L-3'、SCR は 5'-AGA_LCTA_LGCG_LGTA_LTCT_LTAA_LACC_L-3' である。ここで、下付きの L は LNA であることを示す。FBS を含まない DMEM に 75 pmol の AsO と Lipofectamine™ RNAiMax 5 µL を加え、全量を 500 µL として 20 分間室温で反応させた。反

応後、 4.0×10^4 cells/mL の細胞懸濁液 2.5 mL と混合し、RNA 発現の検討には 6 well plate に対し各 well あたり 3 mL、生存率の検討には 96 well plate に対して各 well あたり $100 \mu\text{L}$ の混合液を蒔き、72 時間培養後、RNA 発現の検討および薬物処置を行った。薬物処置では培地を除き、3% FBS を含む DMEM に対し、それぞれの薬物が最終濃度で $100 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ になるように加えて 24 時間培養した。

B-9. Real-time RT-PCR による miR-21 発現変動の検討

Mature miR-21 および GAPDH の発現量の検討を real-time RT-PCR にて行った。Human GAPDH のプライマーの配列について以下に示す。GAPDH, FP: '5-CCA GGG CTG CTT TTA ACT C-3' RP: '5-GCT CCC CCC TGC AAA TGA-3'。Mature miR-21 の配列はラット、ヒトともに同様であるため、共通

の条件を用いた。以降の反応条件は IV-2-6 に準じた。

B-10. 細胞生存率の検討

細胞内 ATP 残量の測定および CCK8 によるミトコンドリア酵素活性の測定の 2 種類の方法で細胞生存率を検討した。CCK8 試薬を各 well に $10 \mu\text{L}$ 加え、1 時間培養後にプレートリーダー (Biotrak II, GE Healthcare バイオサイエンス) にて 450 nm の吸光を、 620 nm の吸光を対照として測定した。

C. 実験結果

C-1. TA 投与によって変動した miRNA の検出

TA 処置後 1, 2, 6, 12 時間における miRNA の変化について、対照群と比較して 200% 以上 (up-regulated) もしくは 50% 以下 (down-regulated) の変動を示した miRNA について以下に示した (Fig. 1)。

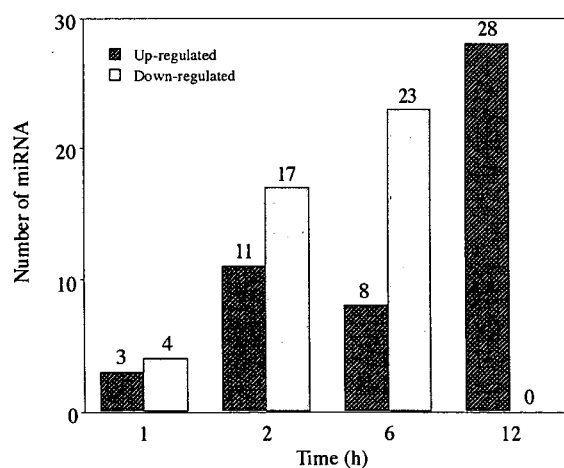


Fig. 1. Number of miRNAs whose expression were significantly changed in each TA-administered group.

今回使用したマイクロアレイには、ヒト、マウス、ラットの miRNA プローブが搭載されており、特にラットにおいては、動物種間で共通するものを含めて 238 種の miRNA を検出することができる。

TA 処置後 1 時間において増加したものは 3 種、減少したものは 4 種であり検討したもののうちでは最も少なかった。TA 処置後 2 時間においては、増加したものが 11 種、減少したものは 17 種であった。TA 処置後 6 時間においては、増加したものが 8 種、減少したものが 23 種であった。TA 処置後 12 時間においては増加していたのは 28 種で、規定の 50% 以下に減少していたものはなかった。また、更なる検討のため、Fig. 14 に含まれる miRNA のうち、ラット、マウス、ヒトにおいて保存されており、当該時間において良好なスポット強度を得られたものについて表にまとめた (Table)。

これらの miRNA において、機能的な共通点などは特に見出せなかった。増加している miRNA のうち、miR-542-3p は全ての時間において 2 倍以上の誘導が見られた。また、miR-137 と miR-153 においては、12 時間において大きな誘導が見られた。減少してい

る miRNA では、TA 処置後 6 時間までの早い時間からの減少が多く見られた。また、いくつかの miRNA においては、毒性の発症する前、ごく早期の段階から減少が始まり、毒性発症時間の直前である 12 時間において、もとの水準またはそれ以上にまで増加するという特徴的なパターンが認められた。その中でも miR-21 は、どの時間におけるスポット強度においても非常に安定していた。

C-2. 肝毒性化合物投与時における miR-21 の発現変動

スポットの安定性に加えて、他の miRNA と比較しても比較的報告が多い miR-21 について複数の肝毒性化合物における変化を検討した。Mature miRNA の検出においては、Northern blotting が主流であるが、定性的な方法であるため、より簡便で定量性の高い real-time RT-PCR を用いて検出を行った。18-22 塩基と短い miRNA を定法の PCR にて検出するのは困難であるため、逆転写前に total RNA に Poly A tail を伸長し、特異的な FP および共通の RP にて検出する。各肝毒性化合物処置後 1, 2, 6 および 12 時間における miR-21 の変化を以下に示す (Fig. 2)。

Table . . miRN As changed of their expression in each time point after TA-administration.

miRNA	1hr	2hr	6hr	12hr
Up-regulated				
rno-miR-124a	1.93 ± 0.15	2.06 ± 0.54	1.74 ± 0.23	1.57 ± 0.13
rno-miR-125b	1.61 ± 0.69	1.41 ± 0.63	2.27 ± 0.51	1.34 ± 0.30
rno-miR-126	0.69 ± 0.34	1.77 ± 0.87	0.74 ± 0.17	2.29 ± 0.44
rno-miR-127	1.61 ± 0.10	0.80 ± 0.33	0.44 ± 0.21	2.79 ± 0.50
rno-miR-132	4.78 ± 3.61	1.75 ± 0.24	1.20 ± 0.96	4.24 ± 0.38
rno-miR-137	1.47 ± 1.18	1.67 ± 0.29	0.53 ± 0.20	16.33 ± 3.15
rno-miR-153	3.04 ± 1.06	2.43 ± 0.79	0.52 ± 0.29	13.22 ± 4.22
rno-miR-186	0.22 ± 0.17	0.09 ± 0.06	0.04 ± 0.04	2.28 ± 0.44
rno-miR-335	0.99 ± 0.33	1.68 ± 0.29	2.28 ± 0.23	1.55 ± 0.43
rno-miR-378	2.02 ± 1.21	1.98 ± 0.66	0.34 ± 0.13	4.72 ± 0.62
rno-miR-542-3p	3.70 ± 0.80	3.77 ± 0.19	2.57 ± 0.44	2.71 ± 0.56
Down-regulated				
rno-miR-10a	0.90 ± 0.18	0.49 ± 0.10	0.53 ± 0.34	1.29 ± 0.22
rno-miR-15b	0.86 ± 0.37	0.26 ± 0.19	0.43 ± 0.12	1.47 ± 0.31
rno-miR-17	0.64 ± 0.37	0.39 ± 0.07	0.30 ± 0.01	1.30 ± 0.19
rno-miR-21	0.27 ± 0.09	0.22 ± 0.05	0.47 ± 0.06	1.14 ± 0.20
rno-miR-29a	0.81 ± 0.28	0.36 ± 0.14	0.43 ± 0.10	1.18 ± 0.39
rno-miR-30a-5p	0.35 ± 0.30	0.42 ± 0.08	0.29 ± 0.08	1.64 ± 0.27
rno-miR-96	0.55 ± 0.31	0.13 ± 0.08	0.20 ± 0.06	2.95 ± 1.40
rno-miR-101a	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.06	0.35 ± 0.05	5.55 ± 5.14
rno-miR-143	0.10 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.25 ± 0.03	1.90 ± 0.38
rno-miR-148b	0.41 ± 0.04	0.50 ± 0.31	0.31 ± 0.12	3.31 ± 1.57
rno-miR-192	0.63 ± 0.23	0.25 ± 0.07	0.18 ± 0.08	1.34 ± 0.82
rno-miR-221	0.26 ± 0.20	0.23 ± 0.04	0.25 ± 0.04	1.88 ± 0.65
rno-miR-505	0.75 ± 0.74	0.33 ± 0.09	0.18 ± 0.01	2.31 ± 1.64

miRNAs whose expressions were altered more than 2.0-fold at each administration.

TA においてマイクロアレイの結果と比較して、12 時間においてやや PCR の方が低い値となったが、概ね同様の変動パターンを示した。APAP と四塩化炭素は、比較的肝障害の発症が早い化合物である。APAP、四塩化炭素ともに投与後 1 時間という早い段階において 5 倍近い発現の増加が認められた

が、毒性発症時にはもとの水準に回復していた。BB, DMN は、毒性の発症は 24 時間以降であり、比較的遅い化合物である。BB, DMN ともに投与後 6 時間までは発現が減少しており、この傾向は TA とも一致していた。また、投与後 12 時間においては BB, DMN ともに 2 倍程度の発現の増加が見られた。

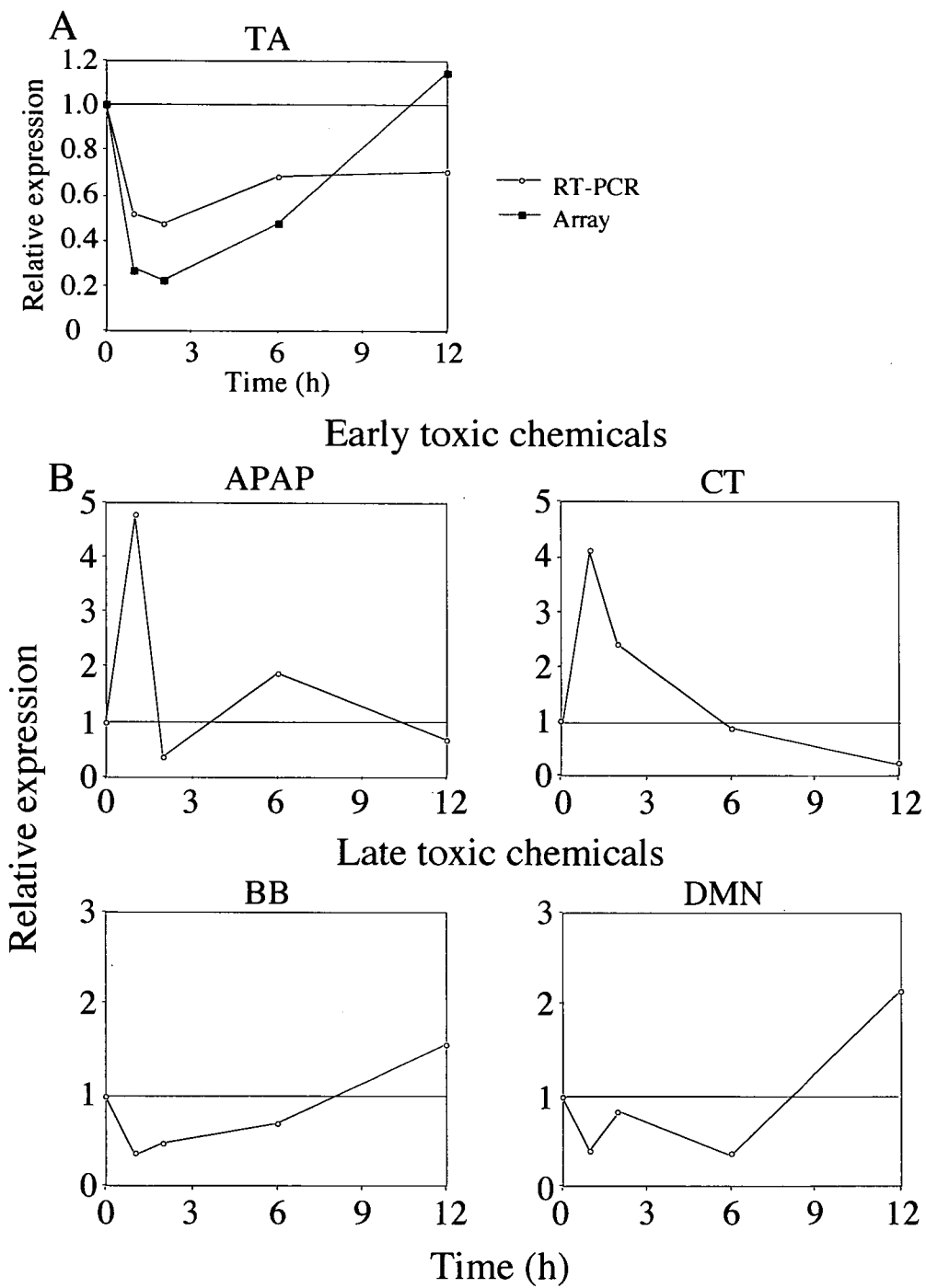


Fig. 2. Real-time RT-PCR analysis of the expression of mature miR-21. Total RNA samples from 4 rats were pooled and used for real-time RT-PCR analysis. (A) Data from TA administration. The blue line indicates the data from microarray experiment. (B) Data from APAP, BB, CT, DMN administration.

C-3. 細胞株における miR-21 発現量の比較

miR-21 の細胞株における常在的な発現量について検討した。HepG2,

HLE, HuH-7, HeLa, KGN および MCF-7 細胞における mature miR-21 の発現を real-time RT-PCR によって検討した (Fig. 3)。

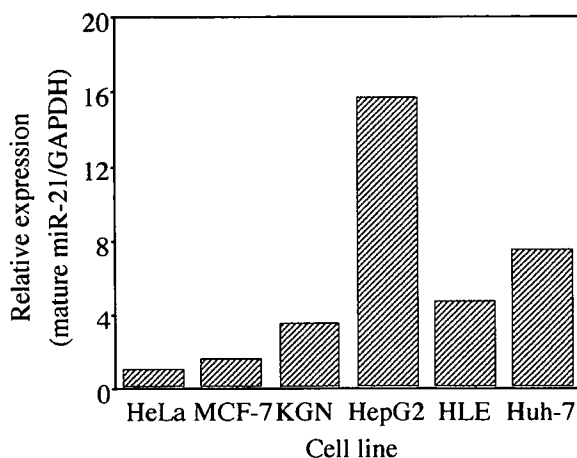


Fig. 3. Real-time RT-PCR analysis of mature miR-21 expression. Data are expressed as mean of two independent experiments. The mRNAs from two wells were pooled in each experiment.

これらの結果は、独立した実験を 2 回行い、各回とも $n=2$ で RNA 抽出までを行い、RT 以降の操作で等量の RNA をプールして検討した結果である。今回検討に用いた全ての細胞株において、mature miR-21 を検出することができた。HepG2 における発現量が最も高く、他の肝細胞株でも比較的高発現であった。さらに、当研究室において検討されている他の miRNA の発現と比較しても、かなりの高値であった (data not shown)。この結果を受け、

mature miR-21 の発現が低く、AsO による抑制の影響が見えやすいことが想像される HeLa 細胞において検討を行うこととした。

C-4. AsO 導入による miRNA 減少効果の確認

HeLa 細胞に対して、AsO を導入して 72 時間後における mature miR-21 の変動を real-time RT-PCR によって検討した結果を、導入試薬のみの群を 100% として以下に示した (Fig. 4)。

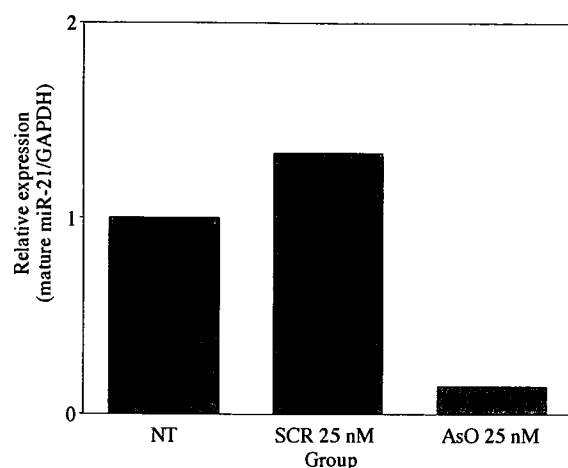


Fig. 4. Suppression of mature miR-21 expression by using antisense oligonucleotide. Data are expressed as mean of two independent experiments. The mRNA from two wells was pooled in each experiment.

NT: non-transfected, SCR: scramble oligonucleotide, AsO: antisense miR-21.

他の細胞 (HLE, HuH-7)を用いた予備検討においては導入後 48 時間において mature miR-21 の減少が確認できた (data not shown)。導入試薬のみの群と比較して、SCR ではほとんど変化が見られない (1.3 倍)が、AsO 群においては 14%にまで抑制されていた。この結果より、今回の条件における AsO の導入を確認することができた。

C-5. 薬物誘導性細胞障害に及ぼす AsO の影響

この検討に先がけて、miR-21 の標的となる蛋白質について、予測用のウェブサイトを用いて検討を行った。その

結果、複数の予測サイトにおいて良好な結果が得られた peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)を標的蛋白質として検討することとした。そこで、PPAR- α のアゴニストであるフィブラート系薬剤と併用することで、横紋筋融解症を発症することが知られているスタチン系薬剤を、PPAR- α の相互作用を想定して検討を行った。

AsO もしくは SCR を導入して 72 時間後にスタチン系薬物を 24 時間曝露した場合の細胞生存率を 2 種類の方法で測定した結果を、対照群を 100%として以下に示した(Fig. 5)。

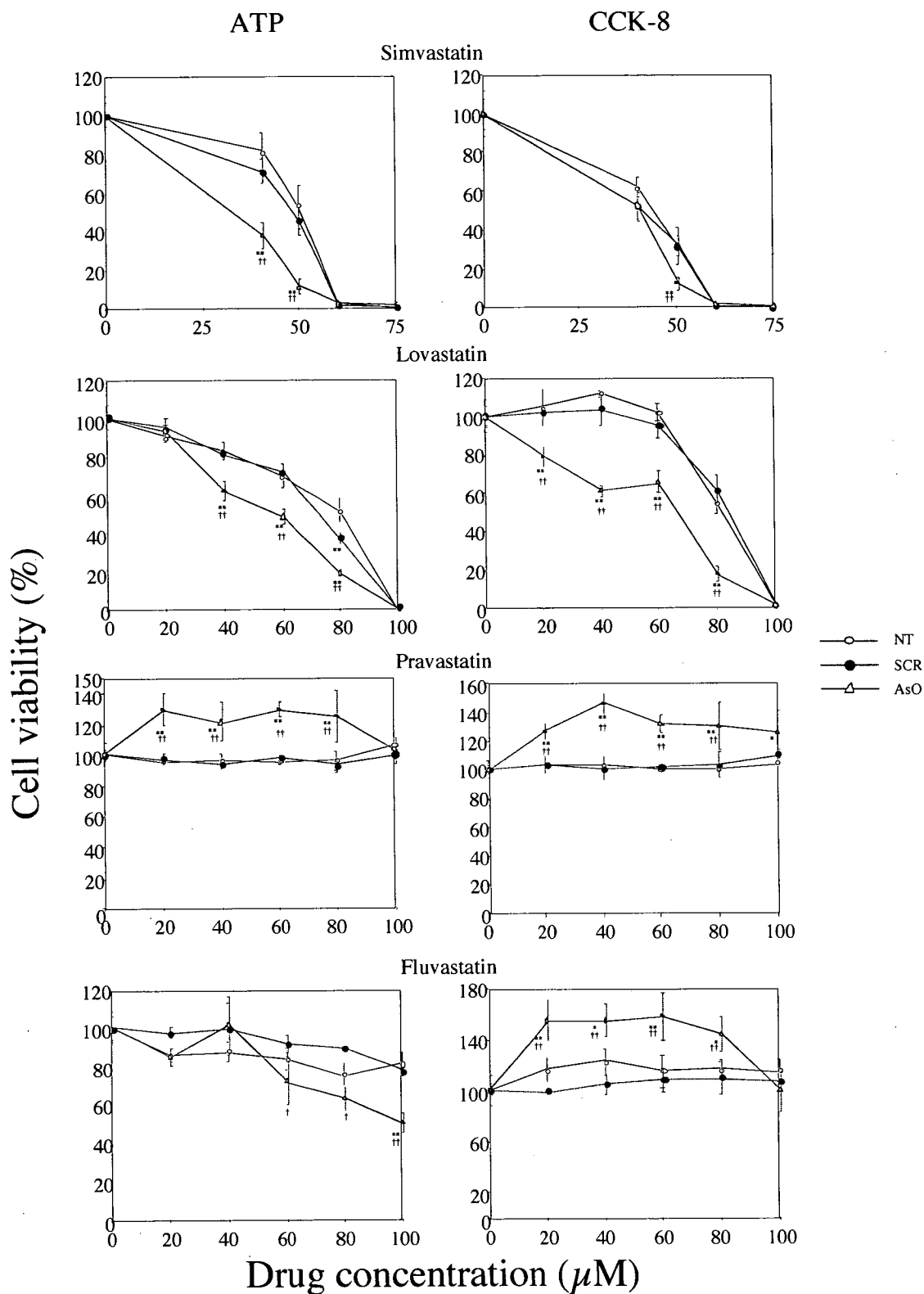


Fig. 5. Effect of miR-21 antisense oligonucleotide (AsO) on cytotoxicity of statins in HeLa cells. Cell viabilities were assessed by CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay kit (ATP) or Cell Counting Kit-8 (CCK-8). HeLa cells were incubated with each drug for 24 hours after oligonucleotide transfection. Data are expressed as mean \pm SD. Significantly different from NT or SCR group, respectively (* p <0.05, ** p <0.01, † p <0.05, †† p <0.01). NT: non-transfected, SCR: scramble oligonucleotide, AsO: antisense miR-21.

シンバスタチンによる細胞障害性は ATP 活性では 40 μM から 50 μM にかけて AsO 導入群において有意な生存率の減少が認められた。また、CCK-8 では 50 μM 処置でのみ有意な生存率の減少が認められた。対照群における細胞毒性が若干 CCK-8 の方が高く見られた。

ロバスタチンによる細胞障害性は ATP 活性では 40 μM から 80 μM にかけて AsO 導入群において有意な生存率の減少が認められた。また、CCK-8 では 20 μM から 80 μM にかけて有意な生存率の減少が認められた。シンバスタチンとは異なり、対照群での細胞毒性は ATP 活性において高く見られ、CCK-8 においては 80 μM まで顕著な毒性が見られなかった。

ナトリウム塩であるプラバスタチン、ロバスタチンにおいては細胞生存率の減少は認められず、プラバスタチンでは ATP 活性、CCK-8 とともに生存率の増加が見られた。フルバスタチンでは CCK-8 でのみ生存率の増加が見られた。また、フルバスタチン処置では、ATP 活性においてのみ若干の細胞生存率の減少が見られた。

D. 考察

miRNA による転写調節は、RNAi とは似て非なる作用機序である。標的 RNA を分解して発現を抑制する RNAi

に対し、miRNA は不定数の標的遺伝子の翻訳を抑制する。解析ツールの一つとしての側面が強い RNAi とは性質が異なるため、生体内での事象を説明する手段として盛んに検討が行われている分野である。特に発癌と miRNA の関与についての検討が注目され、多くの miRNA がガン化によって発現が変化する (Gramantieri et al., 2007; Iorio et al., 2005; Kutay et al., 2006; Roldo et al., 2006; Si et al., 2007) という報告がなされている。また、癌遺伝子 Ras の let-7 による調節についても報告されている (Johnson et al., 2005)。当研究室においても、miR-27b によりステロイド代謝を担う CYP11B1 が転写後調節を受けており、乳腺の腫瘍における miR-27b の発現増加を報告している (Tsuchiya et al., 2006)。

肝における miRNA として、miR-122a が最も多く存在しており、様々な検討がなされているものの (Chang et al., 2004; Gramantieri et al., 2007; Jopling et al., 2005; Lagos-Quintana et al., 2002)、薬物誘導性肝障害との関与はこれまでに報告されておらず、miRNA による肝毒性への関与についての研究は進んでいないのが現状である。本研究では、miRNA においても応用されているマイクロアレイ技術を用いて、TA 処置後の網羅的な miRNA 発現変動の解析

を行った。過去に TA 処置後の miRNA の変化を検討した報告はなく、miRNA マイクロアレイを用いた毒性化合物処置による miRNA の変化を検討した報告として、

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)における検討がなされているのみである (Moffat et al., 2007)。しかしながら、肝もしくはその他臓器における miRNA の発現分布に関する報告は存在する (Shingara et al., 2005; Stark et al., 2005)。今回用いたラットにおける報告はないために完全な比較を行うことは難しいが、確認できた一部の miRNA については発現パターンが似通っているものも、そうでないものも存在していた (data not shown)。本章における実験条件として、TA 投与直後よりかなり早い段階における変動について検討を行った。miRNA による転写調節は、転写された primary miRNA から mature miRNA になるとすぐにその作用を発揮すると考えられるためである。今回変動が認められた miRNA は増加が 10 種、減少が 14 種であったが、ラットにおいて同一クラスターに属するものは存在しなかった。また、これら 24 種の miRNA のうち、すでに論文として報告されているものは一部であった。増加していた miRNA において miR-124a は脳での発現が非常に高いと言われている

miRNA であったが、今回ほんのわずかだが変動が検出された。miR-125b はエンドトキシンなどに応答すること (Tili et al., 2007)など、免疫系における検討が行われている。大きな変化が見られた miR-137 と miR-153 に関しては、ほとんど検討がなされていなかった。減少していた miRNA について、miR-17 はヒトにおいて Chromosome 13q31-q32 に存在する miR-17-92 クラスターに含まれる miRNA として知られ、Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)によって調節を受けることなど (Shah et al., 2007)、今回の検討において最も研究されている miRNA であった。MiR-221 は p27^{Kip1} tumor suppressor を標的遺伝子に持つ、癌細胞において高く発現している miRNA と言われている (Garaldi et al., 2007; le Sage et al., 2007)。

本研究では miR-21 に興味を持ち、詳細な検討を行った。PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>)のウェブサイトによると、2007 年 12 月 21 日現在、miR-21 で検索を行うと 37 報の報告が表示されるが、そのうちの 27 報までが 2007 年出版の雑誌に掲載されている。このことから miR-21 の検討が現在盛んに行われていることがわかる。この miR-21 について、5 種類の化合物においてその発現変動パターンを検討した。その