

【資料4】 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出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  $\mu\text{g}$  に QIAzol Lysis Reagent 700  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  を別のチューブに採取し、600  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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2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  $\mu\text{g}$  に 2.5 x labeling buffer 8  $\mu\text{L}$ , fluorescent label 2  $\mu\text{L}$ , positive control 1  $\mu\text{L}$ , labeling enzyme 2  $\mu\text{L}$  を加え、DEPC 処理水で20  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  まで濃縮し、15  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 MgCl<sub>2</sub> 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%CO<sub>2</sub> 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<sub>L</sub>CA T<sub>L</sub>CA G<sub>L</sub>TC T<sub>L</sub>GA T<sub>L</sub>AA A<sub>L</sub>-3'、SCR は 5'-AGA<sub>L</sub> CTA<sub>L</sub> GCG<sub>L</sub> GTA<sub>L</sub> TCT<sub>L</sub> TAA<sub>L</sub> ACC<sub>L</sub>-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、 $4.0 \times 10^4$  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  $\mu$ 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  $\mu$ M から 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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)。

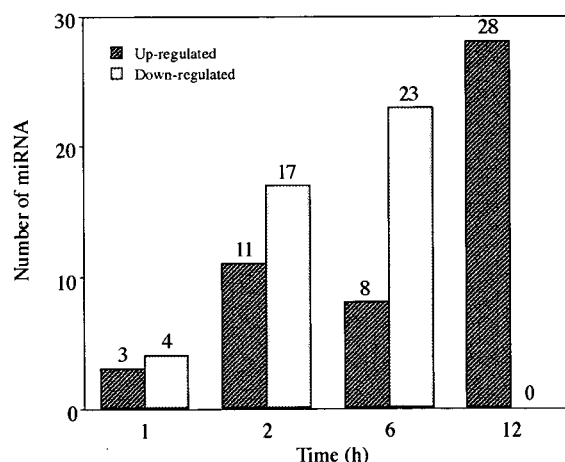


Fig. 1. Number of miRNAs whose expression were significantly changed in each TA-administered group.

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合わせて 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中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 . miRNAs 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。



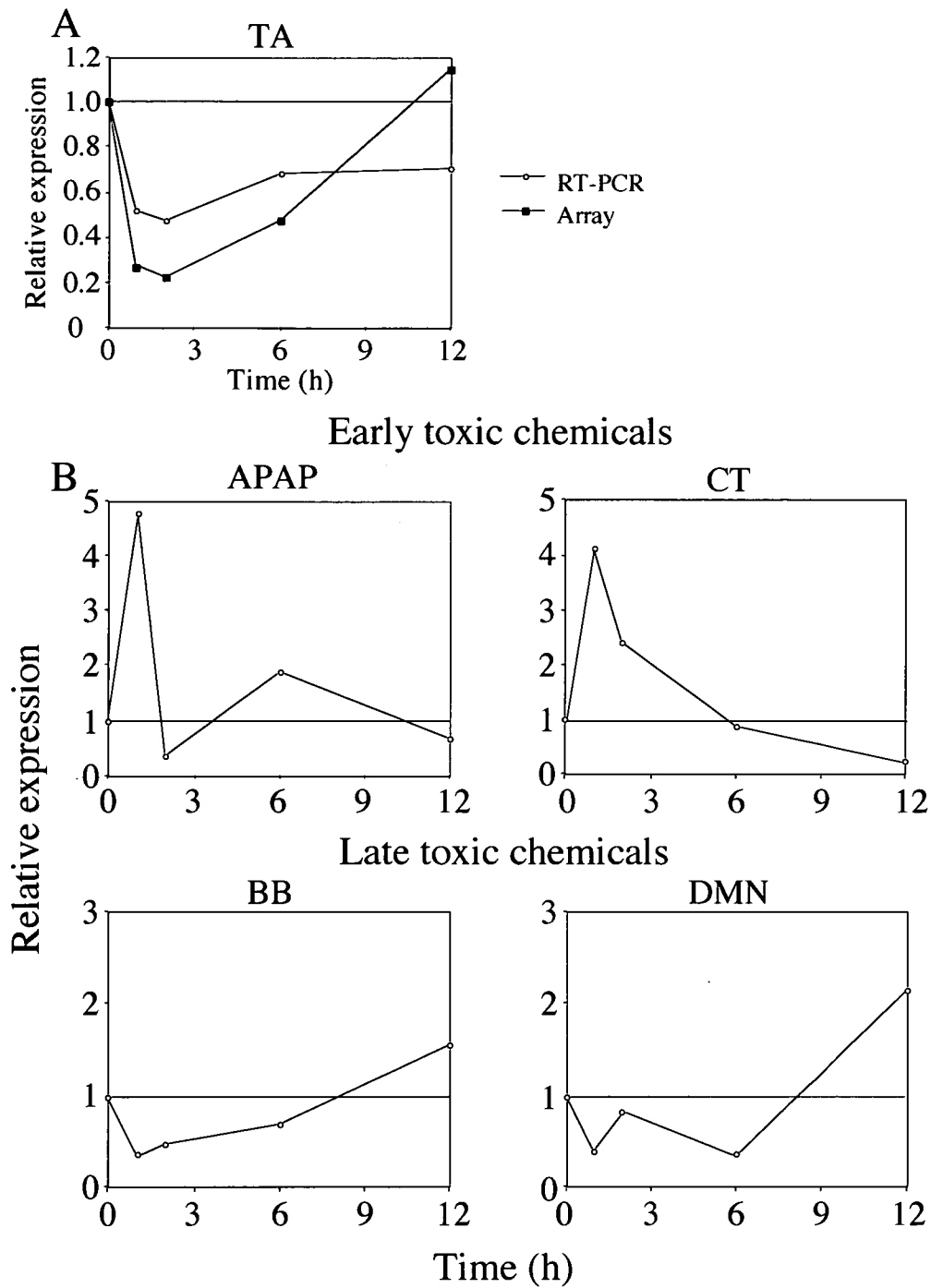


Fig. 2. Real-time RT-PCR analysis of the expression of mature miR-21. Total RNA samples from 4 rats were pooled and used for real-time RT-PCR analysis. (A) Data from TA administration. The blue line indicates the data from microarray experiment. (B) Data from APAP, BB, CT, DMN administration.

### 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)。

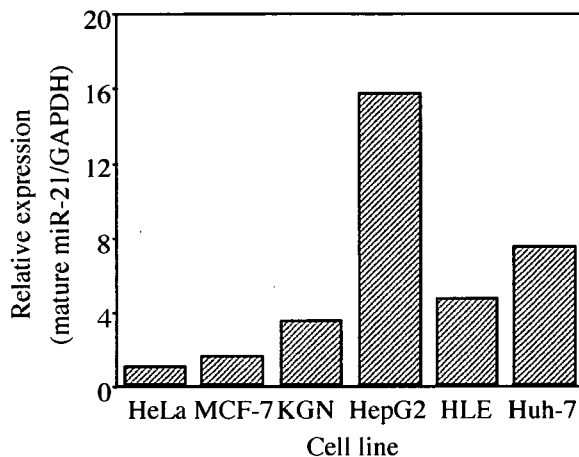


Fig. 3. Real-time RT-PCR analysis of mature miR-21 expression. Data are expressed as mean of two independent experiments. The mRNAs from two wells were pooled in each experiment.

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)。

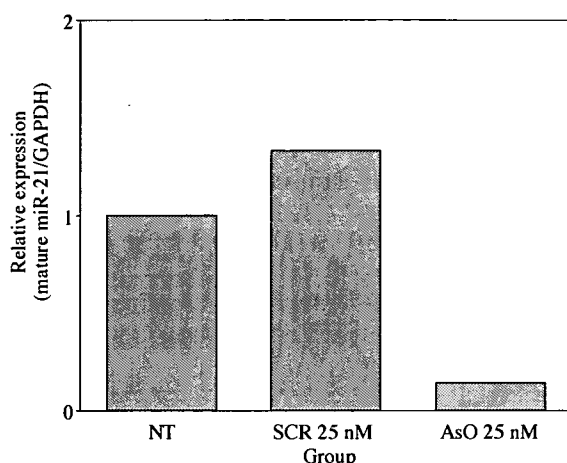


Fig. 4. Suppression of mature miR-21 expression by using antisense oligonucleotide. Data are expressed as mean of two independent experiments. The mRNA from two wells was pooled in each experiment. NT: non-transfected, SCR: scramble oligonucleotide, AsO: antisense miR-21.

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- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ )を標的蛋白質として検討することとした。そこで、PPAR- $\alpha$  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- $\alpha$ 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)。

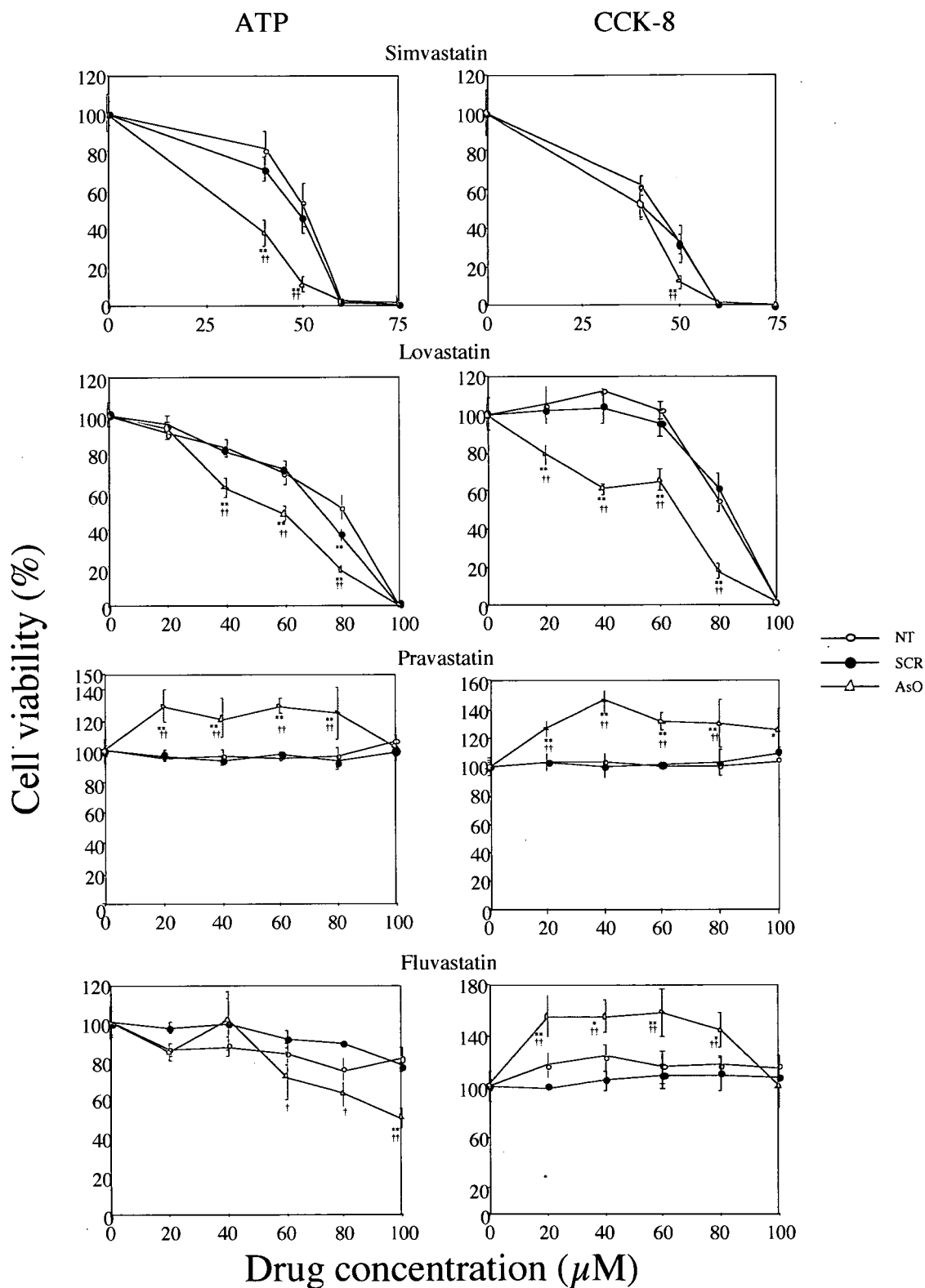


Fig. 5. Effect of miR-21 antisense oligonucleotide (AsO) on cytotoxicity of statins in HeLa cells. Cell viabilities were assessed by CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay kit (ATP) or Cell Counting Kit-8 (CCK-8). HeLa cells were incubated with each drug for 24 hours after oligonucleotide transfection. 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  $\mu\text{M}$  から 50  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  から 80  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  から 80  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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 とは似て異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 CYP1B1 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 (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- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ )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<sup>Kip1</sup> tumor suppressor を標的遺伝子を持つ、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

結果、肝障害の発症時間に相関し、毒性発症が早い APAP および四塩化炭素において投与後 1 時間において発現の増加が認められ、逆にそれ以外の比較的毒性発現が遅い化合物の BB, DMN, TA においては早い段階での抑制が認められた。これまでの報告では、miR-21 の発現調節機構として、炎症性サイトカイン IL-6 による、転写因子 Stat3 を介した転写調節 (Loffler et al., 2007) が報告されている。急性炎症性肝障害における IL-6 の応答は早く、mRNA level においてはマウスにおいて投与後 4 時間の段階ですでに誘導が認められている (Masubuchi et al., 2003)。それ以前の時間で検討はなされていないが、投与後 15 分ですでに影響を受けている遺伝子も存在していることから (Ruepp et al., 2002)、ごく早期における IL-6 の遊離が起こっている可能性も考えられる。

次に、miR-21 の抑制状態における細胞障害性の影響について検討を行った。これまでの報告より、miR-21 は広範な臓器に発現が認められ、

#### miRNAMap

(<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>) のウェブサイトによると、ヒト正常組織では膀胱、腎、肺に多く、それ以外のほとんどの臓器にも発現している。特に、乳腺や膵臓、肝では正常組織と癌部を比較した結果、癌部において発現量が

大きく増加することが知られており、膵臓癌においては過剰発現による肝への転移促進なども同時に報告されている (Iorio et al., 2005; Kutay et al., 2006; Roldo et al., 2006)。また、癌由来細胞株 (肝、乳腺、結腸、肺、膵臓、胃) でも増加が認められている (Meng et al., 2007; Volinia et al., 2006)。これまで報告は、発現の変化という事象を取り扱うものであり、その変化が具体的にどのような影響を及ぼしているのかについての言及はなかった。しかし前章で述べたとおり、現在多くの報告がなされている。その中において、二次元電気泳動による標的タンパク Tropomyosin 1 の発見 (Zhu et al., 2007)、ターゲット検索サイトを用いた標的タンパク PTEN の同定 (Meng et al., 2007) および標的タンパク Programmed cell death (PDCD4) の同定 (Asangani et al., 2007; Frankel et al., 2007) が報告された。特に最後の 2 つのグループは同一のタンパクを PDCD4 の 3' 非翻訳領域の解析と MCF-7 細胞に対する DNA マイクロアレイという全く異なった手法で同一の標的タンパクを同定している点は興味深い。また、間接的な作用による抗アポトーシス因子 Bcl-2 の発現抑制 (Ji et al., 2007; Si et al., 2007) などが報告されている。これらの報告から、癌由来細胞株には正常組織と比較して、かなりの miR-21 が発

現していることが示唆されており、本章ではできる限り発現量が低い HeLa 細胞を用いた。Mature miRNA は 18-22 塩基と非常に短いものである。そのため、標的とするには短すぎることで、クラスターなどの転写直後の未成熟な miRNA を標的にすると他の miRNA を同時に抑制してしまう可能性があることから、RNAi 技術を適用することができない。そこで miRNA を抑制するために用いられる技術がアンチセンス法である。AsO の導入によって細胞内の miRNA は捕獲されて機能を停止する。当研究室の経験上、作用機序は定かではないが、AsO の導入によって標的 miRNA の分解を起こしている兆候が認められている (data not shown)。そのために、AsO 導入細胞において miR-21 総量の減少を確認することで AsO 導入の可否を確認した。

本研究における検討に用いた HeLa 細胞において、TA 処置による細胞毒性を引き起こすことができなかった。肝由来ではない上に、薬物代謝能が低下している培養系において毒性を引き起こすために必要な TA の濃度が非常に高くなってしまい、生存率の測定系にも影響が出たためである (data not shown)。それに加えて、miR-21 の標的蛋白質を複数の予測サイトによる検討の結果、PPAR- $\alpha$  を本検討における標的蛋白質として設定した。そこ

で、PPAR- $\alpha$  のアゴニストとして知られるフィブラート系薬剤との併用で、横紋筋融解症を引き起こすことが知られるスタチン系薬剤について検討した。脂溶性のシンバスタチン、ロバスタチンと、対照薬として水溶性のプラバスタチン、フルバスタチンについて検討を行ったところ、脂溶性スタチンにおいてのみ濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。過去の報告においても脂溶性スタチンによる骨肉腫細胞株、メサンギウム細胞を用いた *in vitro* における検討で細胞死が認められている (Fromigué et al., 2006; Heusinger-Ribeiro et al., 2004)。対照薬のプラバスタチン、フルバスタチンでは細胞生存率の若干の増加が見られたが、その原因は不明である。また、脂溶性スタチンの細胞毒性は AsO の導入によって有意に増強されたことから、miR-21 は脂溶性スタチンによる細胞毒性に対して保護的に働く因子を調節していることが示唆された。しかしながら、標的蛋白質の発現を検出することができず、AsO による蛋白質への影響を検討することはできなかった (data not shown)。前述の通り、miR-21 は現在急速に研究が進められている miRNA であるが、薬物誘導性細胞障害との関係を明らかにした報告は初めてである。一方、予備検討においてシンバスタチン処置前に



miR-21 precursor 導入について検討したが、細胞障害性への影響は認められなかった (data not shown)。影響しなかった理由として、HeLa 細胞には他の細胞株と比較して miR-21 が少ないとしても、正常組織より過剰な miR-21 が発現していたため影響を見ることができなかったと考えられる。

AsO を導入した群において SCR と比較して 50%程度の細胞生存率の減少が見られた (data not shown)。このこと癌由来細胞株に対して miR-21 のアンチセンスオリゴを導入した際の細胞生存率低下の報告 (Si et al., 2007, Meng et al., 2007)と一致していた。また、この検討に関連し、AsO の導入によって HeLa 細胞内で変化する蛋白質を二次元電気泳動によって検出する実験を試みたが、変化するスポットの数が非常に少なく、解析可能なスポットを得ることができなかった (data not shown)。

以上の結果から、見出された miR-21 の誘導は、薬物誘導性細胞障害に対して保護的な作用を示すことが示唆された。しかしながら、細胞障害に対する保護作用を示したと考えられる、HeLa 細胞における miR-21 の具体的な標的となる遺伝子を見出すには至らなかった。今後の検討課題として、*in vivo* における AsO の導入もしくは安定発現系を用い、生体内における

miR-21 の抑制による薬物誘導性肝障害への影響の検討が考えられる。

#### E. 研究発表

1. 論文発表 論文作成中
2. 学会発表 該当無し

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

#### G. 参考文献

- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S and Allgayer H (2007) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* in press
- Berezikov E, Cuppen E and Plasterk RH (2006) Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet* **38**: S2-S7.
- Cai X, Hagedorn CH and Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**: 1957-1966.
- Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS and Taylor JM (2004) miR-122, a mammalian

liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **1**: 106-113.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF and Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231-235.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fromigué O, Haÿ E, Modrowski D, Bouvet S, Jacquet A, Auberger P and Marie PJ (2006) RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. *Cell Death Differ* **13**:1845-1856.

Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA and Farace MG

(2007) miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27<sup>Kip1</sup>. *J Biol Chem* **282**: 23716-23724.

Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L and Negrini M (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **67**: 6092-6099.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N and Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**: 631-640.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N and Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**: 235-240.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.

Heusinger-Ribeiro J, Fischer B and Goppelt-Struebe M (2004) Differential

effects of simvastatin on mesangial cells.

*Kidney Int* **66**:187-195.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M and Croce CM (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* **65**: 7065-7070.

Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB and Zhang C (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* **100**: 1579-1588.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM and Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**: 1577-1581.

Kim YK and Kim VN (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* **26**: 775-783.

Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST and Ghoshal K (2006) Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*

**99**: 671-678.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W and Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**: 735-739.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S and Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-419.

Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K, Cvijic H, Ullmann AK, Stadler Pf and Horn F (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* **110**: 1330-1333.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, and Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.

Masubuchi Y, Bourdi M, Reilly TP, Graf ML, George JW and Pohl LR (2003) Role of interleukin-6 in hepatic heat shock protein expression and protection against acetaminophen-induced liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:

207-212.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST and Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**: 647-658.

Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B and Rigoutsos I (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* **126**: 1203-1217.

Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is polycomb dependent. *Cell* **90**: 479-490.

Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, and Croce CM (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* **24**: 4677-4684.

Ruepp SU, Tonge RP, Shaw J, Wallis N and Pognan F (2002) Genomics and proteomics

analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci* **65**: 135-150.

le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafrè SA, Farace MG and Agami R (2007) Regulation of the p27<sup>Kip1</sup> tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* **26**: 3699-3708.

Shah YM, Morimura K, Yang Q, Tanabe T, Takagi M and Gonzalez FJ (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation. *Mol Cell Biol* **27**: 4238-4247.

Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F and Mo YY (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* **26**: 2799-2803.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM (2005) Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **123**: 1133-1146.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman R and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264.