

for the characterisation of chemically reactive metabolites. *Proteomics* **8**: 301-315.

Jiang H, Meng F, Li W, Tong L, Qiao H, and Sun X (2007) Splenectomy ameliorates acute multiple organ damage induced by liver warm ischemia reperfusion in rats. *Surgery* **141**: 32-40.

Kang BY, Song YJ, Kim KM, Choe YK, Hwang SY, and Kim TS (1999) Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4⁺ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. *Br J Pharmacol* **128**: 380-384.

Kayano K, Sakaida I, Kubota M, Yasunaga M, and Okita K (1995) Functional differences between activated and normal rat liver macrophages: LPS uptake capacity by flow cytometric analysis in contrast with TNF α release. *Liver* **15**: 253-259.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, and Khan IA (2005) Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* **73**: 617-621.

Kenna JG, Martin JL, and Pohl LR (1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver microsomal fractions from halothane treated rats. *Biochem Pharmacol* **44**: 621-629.

Kharasch ED, Hankins D, Mautz D, and

Thummel KE (1996) Identification of the enzyme responsible for oxidative halothane metabolism: implications for prevention of halothane hepatitis. *Lancet* **347**: 1367-1371.

Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**: 223-246.

Kigerl KA, McGaughy VM, and Popovich PG (2006) Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. *J Comp Neurol* **494**: 578-594.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, and Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**: 566-73.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, and Suda T (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **103**: 1345-1352.

Kremer M, Hines IN, Milton RJ, and Wheeler MD (2006) Favored T Helper 1 Response in a Mouse Model of Hepatosteatosis Is Associated With Enhanced T Cell-Mediated Hepatitis. *Hepatology* **44**: 216-227.

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, and Lindén A (1999) Neutrophil recruitment by

human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* **162**: 2347-2352.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, and Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**: 233-240.

Lind RC and Gandolfi AJ (1997) Late dimethyl sulfoxide administration provides a protective action against chemically induced injury in both the liver and the kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**: 201-207.

Lindemann S, Gierer C, and Darius H (2003) Prostacyclin inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocytes to human vascular endothelial cells due to adhesion molecule independent regulatory mechanisms. *Basic Res Cardiol* **98**: 8-15.

Luyendyk JP, Maddox JF, Cosma GN, Ganey PE, Cockerell GL, and Roth RA (2003) Ranitidine treatment during a modest inflammatory response precipitates idiosyncrasy-like liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **307**: 9-16.

Madan A and Parkinson A (1996) CHARACTERIZATION OF THE NADPH-DEPENDENT COVALENT BINDING OF [¹⁴C]HALOTHANE TO HUMAN LIVER MICROSOMES: A Role for Cytochrome P4502E1 at Low Substrate Concentrations. *Drug Metab Dispos* **24**: 1307-1313.

Masubuchi Y, Sugiyama S, and Horie T (2008) Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact*, in press

Matalka KZ, Tutunji MF, Abu-Baker M, and Abu Baker Y (2005) Measurement of protein cytokines in tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assays: application to lipopolysaccharide-induced differential milieu of cytokines. *Neuro Endocrinol Lett* **26**: 231-236.

Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, Laan M, Lötvall J, and Lindén A (2003) Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* **170**: 4665-4672.

Mizuhara H, Kuno M, Seki N, Yu WG, Yamaoka M, Yamashita M, Ogawa T, Kaneda K, Fujii T, Senoh H, and Fujiwara H (1998) Strain Difference in the Induction of T-Cell Activation-Associated, Interferon Gamma-Dependent Hepatic Injury in Mice. *Hepatology* **27**: 513-519.

Mokuno Y, Takano M, Matsuguchi T, Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Nimura Y, and Yoshikai Y (1999) Prostaglandin E₁ Protects Against Liver Injury Induced by *Escherichia coli* Infection via a Dominant Th2-Like Response of Liver T Cells in Mice. *Hepatology* **30**: 1464-1472.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, and Reddi AH (2003) Interleukin-17 family and

IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**: 155-174.

Mosmann TR and Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**: 138-146.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**: 2348-2357.

Moult PJ and Sherlock S (1975) Halothane-related hepatitis. A clinical study of twenty-six cases. *Q J Med* **44**: 99-114.

Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, and Libermann TA (1999) Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther* **10**: 965-976.

Nakamura K, Okada M, Yoneda M, Takamoto S, Nakade Y, Tamori K, Aso K, and Makino I (2001) Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-alpha plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice. *J Hepatol* **35**: 217-224.

Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, and Hamid Q (1999) Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **103**: 215-222.

Nandakumar KS and Holmdahl R (2006) Arthritis induced with cartilage-specific antibodies is IL-4-dependent. *Eur J Immunol* **36**: 1608-1618.

Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, Aono H, Ishihara K, Huseby E, Betz UA, Murakami M, and Hirano T (2007) IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* **19**: 695-702.

Njoku DB, Talor MV, Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Odumade OA, and Rose NR (2005) A novel model of drug hapten-induced hepatitis with increased mast cells in the BALB/c mouse. *Exp Mol Pathol* **78**: 87-100.

Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, and Murphy KM (1998) Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* **9**: 745-755.

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

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, and Dong C (2005b) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**: 1133-1141.

- Park HJ, Lee CM, Jung ID, Lee JS, Jeong YI, Chang JH, Chun SH, Kim MJ, Choi IW, Ahn SC, Shin YK, Yeom SR, and Park YM (2008) Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*, in press
- Prause O, Laan M, Lötvall J, and Lindén A (2003) Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO α and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol* **462**: 193-198.
- Ramaiah SK and Jaeschke H (2007) Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* **35**: 757-766.
- Rengarajan J, Szabo SJ, and Glimcher LH (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* **21**: 479-483.
- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, and Hanchar AJ (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* **77**: 433-443.
- Romagnani S (2008) Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther* **10**: 206.
- Rosengren S, Firestein GS, and Boyle DL (2003) Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**: 1002-1010.
- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, and Gaffen SL (2004) Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* **76**: 135-144.
- Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, and Schnyder B (2006) Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* **203**: 2715-2725.
- Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, and Gaffen SL (2005) Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF α -induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol* **77**: 388-399.
- Shi Z, Wakil AE, and Rockey DC (1997) Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10663-10668.
- Shier P, Hofstra CL, Ma XJ, Wu Y, Ngo K, and Fung-Leung WP (2000) *Tbt-1*, a new T-box transcription factor induced in activated Th1 and CD8⁺ T cells. *Immunogenetics* **51**: 771-778.
- Siebler J, Wirtz S, Klein S, Protschka M, Blessing M, Galle PR, and Neurath MF (2003) A Key Pathogenic Role for the STAT1/T-bet Signaling Pathway in T-Cell-Mediated Liver Inflammation. *Hepatology* **38**: 1573-1580.

- Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, and Kakumu S (2001) Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* **36**: 544-551.
- Splinter W (2002) Halothane: the end of an era? *Anesth Analg* **95**: 1471.
- Spracklin DK, Hankins DC, Fisher JM, Thummel KE, and Kharasch ED (1997) Cytochrome P450 2E1 is the principal catalyst of human oxidative halothane metabolism *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 400-411.
- Spracklin DK, Thummel KE, and Kharasch ED (1996) HUMAN REDUCTIVE HALOTHANE METABOLISM *IN VITRO* IS CATALYZED BY CYTOCHROME P450 2A6 AND 3A4. *Drug Metab Dispos* **24**: 976-983.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, and Glimcher LH (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**: 655-669.
- Tagawa Y, Sekikawa K, and Iwakura Y (1997) Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN γ (-/-) mice, but not in TNF α (-/-) mice: role for IFN γ in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* **159**: 1418-1428.
- Talpain E, Armstrong RA, Coleman RA, and Vardey CJ (1995) Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **114**: 1459-1465.
- Tanaka Y, Takahashi A, Watanabe K, Takayama K, Yahata T, Habu S, and Nishimura T (1996) A pivotal role of IL-12 in Th1-dependent mouse liver injury. *Int Immunol* **8**: 569-576.
- Tirmenstein MA and Nelson SD (1989) Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Bio Chem* **264**: 9814-9819.
- Utrecht J (2007) Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 513-539.
- Usui T (2007) Transcription factors that regulate helper T cell differentiation. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **30**: 419-427.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, and Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**: 821-852.
- Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, Polubinska A, Friess H, Gahl GM, Frei U, and Jörres A (2000) IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO α chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* **165**: 5814-5821.
- Xu L, Zhao Y, Qin Y, and Xu Q (2006) A novel model of acute liver injury in mice induced by T cell-mediated immune response to lactosylated

bovine serum albumin. *Clin Exp Immunol* **144**: 125-133.

Yang M and Cook ME (2003) Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor α production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 51-58.

Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, and Suzuki K (2007) Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury. *Hepatol Res* **37**: 248-254.

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, and Kolls JK (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor

expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**: 519-527

Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I, LeBon T, Kandeel F, Forman S, and Zeng D (2008) Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* **112**: 2101-2110.

You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, and Ju C (2006) Role of Neutrophils in a Mouse Model of Halothane-Induced Liver Injury. *Hepatology* **44**: 1421-1431.

Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, and Ray A (1997) Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* **272**: 21597-21603.

ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割

分担研究者 中島美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系

研究要旨

CYP24 の発現調節に microRNA が関与することを明らかにした。コンピューター解析によって CYP24 mRNA の 3'-UTR に miR-125b が結合する領域 (MRE125b) が見いだされ、乳癌において CYP24 が過剰発現することおよび miR-125b の発現が低下することが報告されており CYP24 の発現調節における miR-125b の関与が考えられた。最初に、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞および MDA-MB-435 細胞、ヒト卵巣顆粒膜細胞癌由来 KGN 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト胚腎由来 HEK293 細胞における CYP24 mRNA およびタンパク発現量、さらに miR-125b の発現量を調べた。その結果、CYP24 タンパク発現量と miR-125b の発現量との間に有意な逆相関関係が認められ、CYP24 は miR-125b によって転写後調節を受ける可能性が示された。次に、CYP24 の MRE125b に対して miR-125b が機能的に作用するかどうかルシフェラーゼアッセイにより検討した。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に MRE125b を含むさまざまな領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、miR-125b 陰性の MCF-7 細胞と miR-125b 陽性の KGN 細胞に導入した。KGN 細胞では内因性の miR-125b によるルシフェラーゼ活性の低下が認められ、MCF-7 細胞では pre-miR-125b を導入することにより同様に活性の低下が認められた。さらに、内因性の miR-125b を阻害するため KGN 細胞に miR-125b に対する AsO を導入したところ、ルシフェラーゼ活性の回復が認められた。これらのことから、CYP24 の MRE125b に miR-125b が機能的に作用することが明らかになった。さらに、miR-125b が内因性の CYP24 に対しても機能することを明らかにした。MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入することで CYP24 タンパクが減少し、KGN 細胞に AsO を導入することで CYP24 タンパクが増加した。このとき CYP24 mRNA の変動はタンパクとは異なる挙動を示したことから、CYP24 は転写後調

節を受けたことが示され、miR-125b は内因性の CYP24 の発現調節に関与することが明らかになった。以上、本研究では CYP24 の転写後調節に miR-125b が関与することを明らかにし、miRNA の薬物動態および毒性学的意義の解明の一端となる有用な情報を提供できたと考えられる。

A. 研究目的

microRNA (miRNA) は 21~25 塩基程度の小さな non-coding RNA であり、線虫ではじめて発見され (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993)、動植物に広く保存されている。Fig. 1 には miRNA の成熟過程を示した。ほとんどの miRNA 前駆体は通常の遺伝子と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写される (Kim, 2005)。この転写産物は primary miRNA (pri-miRNA) とよばれ、核内で Drosha によって、約 70~80 塩基長のヘアピン構造を持つ precursor miRNA (pre-miRNA) に切り出される (Lee et al., 2003)。pre-miRNA は exportin 5 によって細胞質へと輸送され (Lund et al., 2004)、Dicer によって約 21~25 塩基の成熟型 miRNA (mature miRNA) に切り出される。成熟型 miRNA は RISC へと取り込まれ、標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (3'-UTR) に部分相補的に結合し、標的遺伝子の翻訳を抑制する。現在ヒトにおいても 400 以上の miRNA が報告されており (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>)、個々の miRNA における標的 mRNA の

予測も可能となっている。その結果、ヒトのタンパク質をコードする mRNA の 30%程度が miRNA による制御を受ける可能性が示唆されている (Lewis et al., 2005; Xie et al., 2005)。これらの miRNA は組織特異的、発生段階特異的に発現していることが示されており、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに重要な役割を果たしていると考えられている (He and Hannon, 2004; Meltzer, 2005)。

ビタミン D₃ はヒトの生体内において血中カルシウム濃度の恒常性維持を担うほか、細胞増殖抑制作用や分化誘導作用、アポトーシス誘導作用を有することが知られている (Abe et al., 1981; Nagpal et al., 2005)。このため、抗腫瘍薬としての作用も注目されており、ビタミン D 誘導体からの新薬開発も進められている。ビタミン D₃ がこれらの作用を示すためには 2 段階の水酸化による活性化を必要とする (Fig. 2)。ビタミン D₃ の前駆体である 7-デヒドロコレステロールは皮膚で UV によりビタミン D₃ に変換され、肝で 25-hydroxylase により 25 位水酸化ビタミン D₃

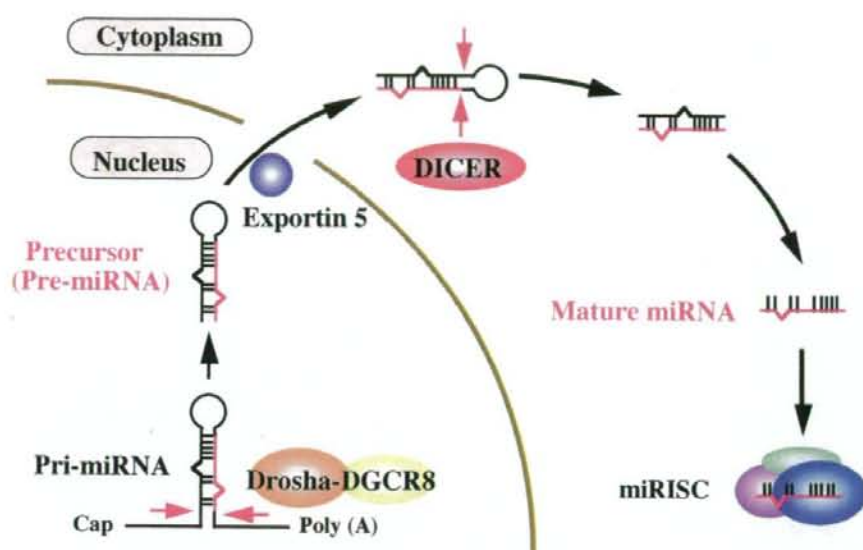


Fig. 1. Model for miRNA biogenesis. miRNA genes are transcribed by an RNA polymerase II to generate the primary miRNA (pri-miRNA) transcripts. The initiation step is mediated by the Drosha-DGCR8 complex in the nucleus. The product of the nuclear processing is ~70-nt precursor miRNA (pre-miRNA), which possesses a short stem plus ~2-nt 3' overhang. This structure can serve as a signature motif that is recognized by the nuclear export factor, Exportin 5. Upon export, the cytoplasmic RNase III Dicer participates in the second processing step to produce miRNA duplexes. The duplex is separated and usually one strand is selected as the mature miRNA, whereas the other strand is degraded. Mature miRNAs are incorporated into the effector complexes, miRISC. miRISC recognizes target mRNA and causes translational repression or mRNA cleavage.

($25(\text{OH})\text{D}_3$) となる。その後
 1α -hydroxylase (CYP27B1) によって水酸化を受け、活性型である $1\alpha,25$ 位水酸化ビタミン D_3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; カルシトリオール) に変換される。
 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は 24-hydroxylase (CYP24) によって不活性型である $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ に代謝される。
 また、ヒト CYP24 は $25(\text{OH})\text{D}_3$ の 24 位水酸化をも触媒し、不活性な $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に代謝する。ヒト CYP27B1 は主に腎近位尿管細胞のミトコンドリアに存在するが、リンパ節や大腸、胎盤などにおいても発現が認

められている (Zehnder et al., 2001)。
 CYP24 は前立腺癌や乳癌、大腸癌などに発現または過剰発現しており、癌遺伝子としても報告されている (Miller et al., 1995; Albertson et al., 2000; Anderson et al., 2006)。しかし、癌における CYP24 の過剰発現および活性上昇の機構については不明な点が多い。最近、癌において多くの種類の miRNA の発現が増加または減少することが報告されており (Calin et al., 2004; Lu et al., 2005)、癌研究に新しい領域を拓きつつある。本研究では CYP24 の過剰発現に miRNA による発現調節が関与しているか明ら

かにすることを目的とした。種々の細胞株における CYP24 発現量および miR-125b の発現量を検討し、以降の実験で用いる細胞株を決定した。次に、ルシフェラーゼ発現ベクターに CYP24 mRNA の 3'-UTR に存在する miR-125b 結合サイトを組み込んだプラスミドを

作成し、ルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。さらに、内因性の CYP24 発現量への影響を検討するため、細胞の total cell lysate を用いたウエスタンブロットングによりタンパク発現量を、培養細胞中での酵素活性を HPLC で測定した。

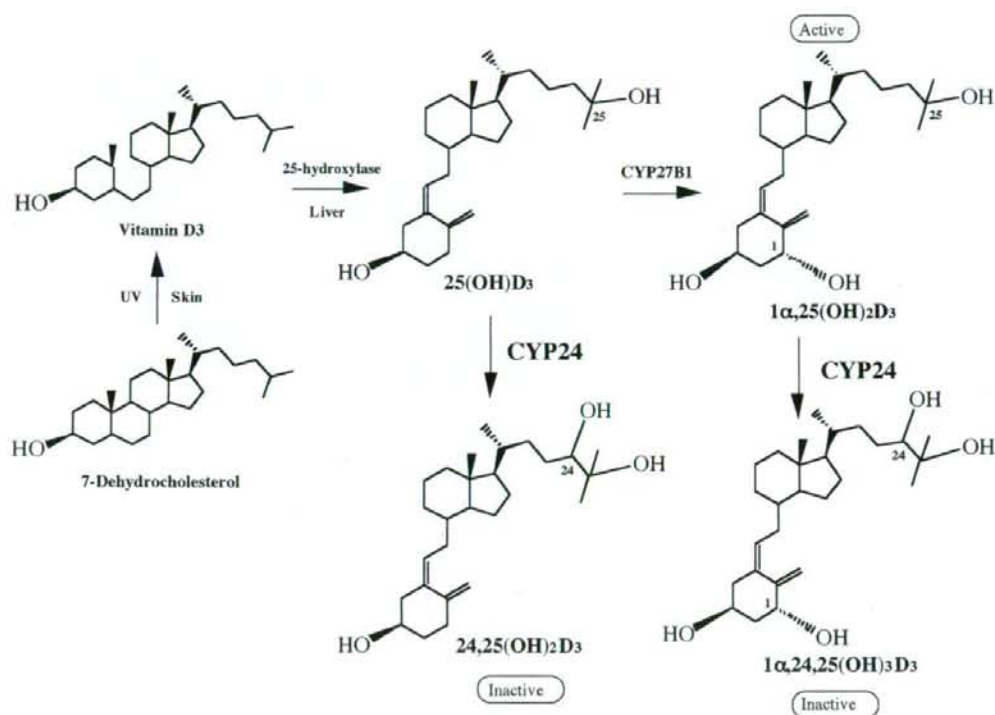


Fig. 2. Bioactivation of vitamin D3. Vitamin D3 is synthesized from 7-dehydrocholesterol in the skin by solar UVB radiation and is then 25-hydroxylated in the liver, yielding the major circulating metabolite 25(OH)D3. The 25(OH)D3 is mainly converted to 1α,25(OH)2D3 by 1α-hydroxylase (CYP27B1) in the kidney. Both 25(OH)D3 and 1α,25(OH)2D3 are further hydroxylated to inactive metabolites by 24-hydroxylase (CYP24).

I 章 種々の細胞株における CYP24 および miR-125b の発現

A. 緒言

これまでにヒトにおいて 400 以上の miRNA が同定されているが、それぞれの miRNA が標的とする遺伝子についてはほとんど解明されていない。最近の研究で、多くの miRNA は正常組織に比べ癌組織で発現が低下することや miRNA の発現様式が癌の種類や進行度によって変化すること (Calin et al., 2004; Lu et al., 2005) が明らかになり、miRNA と発癌との密接な関連が示唆された。例えば、let-7 miRNA は肺癌において発現が低下しており (Takamizawa et al., 2004)、癌遺伝子である Ras の発現抑制に関与していることから、let-7 が癌抑制遺伝子として機能していると考え

られている (Johnson et al., 2005)。本研究において、ベンゾ[a]ピレンやエストラジオールの代謝活性化を担う CYP1B1 が miR-27b によって翻訳抑制を受けることが示され (Tsuchiya et al., 2006)、薬物代謝酵素の発現調節にも miRNA が関与していることが明らかになった。本研究ではヒト CYP24 mRNA の 3'-UTR の塩基配列をコンピューター解析 (<http://cbio.mskcc.org/mirnaviewer/>) したところ、miR-125b が結合し得る領域 (score: 156, energy: -17.6 kcal/mol) を見だし、CYP24 が miR-125b による転写後調節を受ける可能性が示唆された (Fig. 3)。この CYP24 mRNA の 3'-UTR に存在する領域を miR-125b recognition element (MRE125b) と命名し、解析を行った。

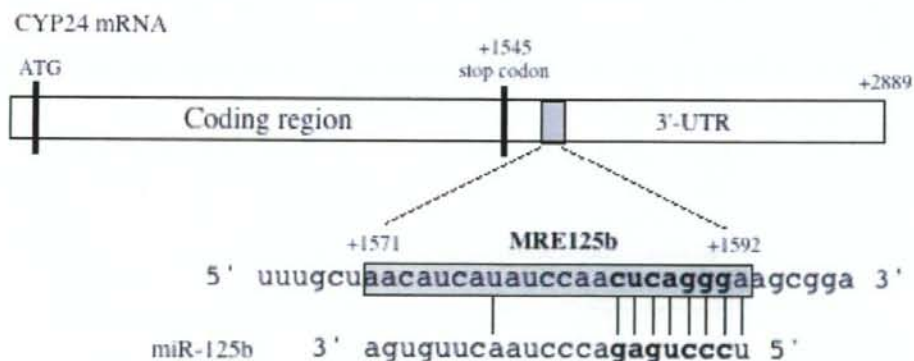


Fig. 3. Schematic representation of human CYP24 mRNA. The numbering refers to the ATG in translation starting with A as 1, and the coding region is up to +1,545. Sequence of MRE125b is located on +1,571 to +1,592 in the 3'-UTR of human CYP24 mRNA. Gray boxes: MRE125b; bold letters, seed sequence.

ヒト CYP24 は染色体 20q13.2 に存在し、主に腎に発現しているが、肺や乳腺、前立腺などにおいても mRNA レベルで発現していることが報告されている (Lou et al., 2004; Anderson et al., 2006; de Lyra et al., 2006)。また、ヒト大腸癌由来 COGA-13 細胞やヒト前立腺癌由来 DU-145 細胞、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞などの細胞株においても mRNA レベルで発現していることが知られている (Lechner et al., 2006)。一方、miR-125b には染色体 11 からコードされる miR-125b-1 と染色体 21 からコードされる miR-125b-2 の 2 つの前駆体が存在し (Calin et al., 2004)、脳や心臓をはじめ多くの組織に発現していることが報告されている (Sempere et al., 2004)。最初に、各種細胞株における

CYP24 mRNA およびタンパク発現量、ならびに mature miR-125b の発現量を明らかにし、miR-125b 陰性または陽性として今後の検討に用いる細胞を選択することを目的とした。

I-B. 研究方法

I-B-1 細胞株および細胞培養

ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞、ヒト乳癌由来 MDA-MB-435 細胞およびヒト胚腎由来 HEK293 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD) より購入した。ヒト卵巣顆粒膜細胞癌由来 KGN 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は Riken Gene Bank (Tsukuba, Japan) より購入した。これらの細胞は Table 1 に示した培地で 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

Table 1. Cell lines used in the present study.

Cell line	Origin	Medium
MCF-7	Breast carcinoma	DMEM with 10% FBS and 0.1 mM Neaa
MDA-MB-435	Breast carcinoma	DMEM with 10% FBS
KGN	Ovarian granulosa-like tumor	DMEM/Ham's F12 with 10% FBS
HepG2	Hepatoma	DMEM with 10% FBS and 0.1 mM Neaa
HEK293	Embryonic kidney (immortalized by Adenovirus 5 DNA)	DMEM with 10% FBS, 4.5 g/L glucose, and 10 mM HEPES

I-B-2 細胞からの total RNA の調製
各細胞から ISOGEN を用いて total RNA を調製した。100 mm ディッシュで培養した細胞を PBS で 1 回洗浄した。

ISOGEN を 1 mL 加えてピペッティングにより懸濁し、5 分間室温に放置した後、1.5 mL チューブに移した。200 μ L のクロホルムを加え激しく攪拌し、3 分間

室温に置いた後 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。水層を別の 1.5 mL チューブに回収し、500 μ L のイソプロパノールを加え、転倒攪拌した後室温に 5 分間放置した。15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、沈殿を 500 μ L の 75%エタノールで洗浄した。この沈殿を風乾し、DEPC 処理精製水に溶解させた後、260 nm における吸光度を NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) により測定した。

I-B-3 cDNA の調製

I-B-2 より得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成した。total RNA 4 μ g、ランダムヘキサマー (150 ng/ μ L) 1 μ L に DEPC 処理精製水を加えて 23 μ L とし、70°C の水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。5 \times Reaction buffer for ReverTra Ace 8 μ L、2.5 mM dNTPs 8 μ L、ReverTra Ace (100 units/ μ L) 1 μ L を加えて全量を 40 μ L とした。30°C で 10 分間、42°C で 1 時間、98°C で 10 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させた。

I-B-4 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR には Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, CA) を使用した。I-B-3 で得られた cDNA サンプル 2 μ L、10 pmol/ μ L のセンスプライマー 1 μ L (Table 2)、10 pmol/ μ L のアンチセンスプライマー 1 μ L、5 \times SGI Buffer 5 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 25 μ L とした。専用のサンプルチューブに入れ、以下のプロトコールで反応を行った。CYP24 はホールド反応を 95°C で 30 秒行った後、解離反応を 95°C で 4 秒、アニーリングと伸長反応を 62°C で 20 秒とし、45 サイクル行った。GAPDH はホールド反応を 95°C で 30 秒行った後、解離反応を 94°C で 4 秒、アニーリングと伸長反応を 64°C で 20 秒とし、45 サイクル行った。45 サイクルの反応終了後、60°C から 95°C まで 1 秒あたり 0.2°C 温度を上昇させ融解曲線の測定を行った。PCR 産物の蛍光強度は Smart Cycler software (ver.1.2b) を用いて解析した。Real-time RT-PCR 反応終了後、2%アガロースゲルで電気泳動をして特異的に増幅されるバンドの確認を行った。

Table 2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR.

Primer	Sequence
hCYP24A1-RT-S	5'-CAGCAAACAGTCTAATGTGG-3'
hCYP24A1-RT-AS	5'-AGCATATTCACCCAGAACTG-3'
hGAPDH-S ^a	5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTC-3'
hGAPDH-AS ^a	5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3'

^aFrom Tsuchiya et al (2004).

I-B-5 オリゴプローブの調製

Mature miR-125b に相補的な配列 (5'-TCA CAA GTT AGG GTC TCA GGG A-3') を有するプローブを用いた。10 pmol/ μ L のオリゴヌクレオチド 2 μ L に 10 \times Protruding end kinase buffer 2 μ L、滅菌精製水 13.4 μ L を加え 5 分間煮沸した後、氷冷した溶液に [γ -³²P] ATP 1.6 μ L、T4 polynucleotide kinase 1 μ L を加えて全量を 20 μ L とし、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、STE buffer を 30 μ L 加え、Probe Quant™ G-50 Micro Column を用いて 3,000 rpm、2 分間遠心分離を行い、遊離の [γ -³²P] ATP を除去した。液体シンチレーションカウンターにより溶出画分のカウントを測定し、プローブの比活性を求めた。

I-B-6 ノーザンブロッティング

Total RNA 20 μ g にホルムアミドを加え全量を 18 μ L とし、RNA 用色素液 2 μ L を加え 80°C で 5 分間インキュベートした後、氷冷した。この溶液全量を 15% アクリルアミド/8 M 尿素ゲルに添着し、1 \times TBE を泳動用緩衝液として 250 V の定電圧で 150 分間電気泳動した。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、ローディングコントロールとした。この後、Transfer cell (Bio-Rad, Hercules, CA) を用い RNA をアクリルアミドゲルから Zeta-Probe GT Genomic Tested Blotting Membranes (Bio-Rad) に

電氣的 (400 mA, 60 分間) に転写した。この際、ろ紙、アクリルアミドゲル、Zeta-Probe Membrane は 0.5 \times TBE に浸して行った。転写後、2 \times SSC に 10 分間浸し、80°C で 2 時間乾熱した。3 時間放冷した後、Zeta-Probe Membrane を pre-hybridization buffer に浸し、42°C 水浴で 3 時間インキュベートした。これを新しい pre-hybridization buffer 20 mL に I-2-6 で調製したオリゴプローブ 1 \times 10⁶ cpm を加えた溶液に浸し、42°C で 24 時間反応させた。37°C の 0.5% SDS/2 \times SSC 溶液で洗浄した後、イメージフィルムに暴露しイメージアナライザーを用いて解析した。

I-B-7 Total cell lysate の調製

各細胞から NP-40 lysis buffer を用いて total cell lysate を調製した。100 mm ディッシュに播種した細胞をトリプシンで回収し、PBS で 3 回洗浄した。1.5 mL チューブに移した後、PBS を除去し、最終濃度が 500 μ g/mL APMSF、50 μ g/mL Leupeptin、100 μ g/mL Aprotinin になるように添加した NP-40 lysis buffer に懸濁した。細胞懸濁液を氷上で 1 時間インキュベートし、13,000 rpm、15 分間、4°C で遠心分離した。この溶液を再びピペッティングにより懸濁し、13,000 rpm、15 分間、4°C で遠心分離後、上清を回収し total cell lysate とした。タンパク濃度測定は Bradford 法 (Bradford,

1976) に従い、 γ -グロブリンを標準蛋白とし Bio-Rad の Protein Assay kit を用いて行った。精製水で 5 倍希釈した Dye Reagent 1 mL に cell lysate 20 μ L を加えてボルテックスし、595 nm での吸光度を測定した。

I-B-8 SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

I-B-7 で調製した total cell lysate を用い、Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、SDS-PAGE を行った。厚さ 1 mm、10% ポリアクリルアミドゲルに 50 μ g のタンパクをアプライした。SDS-PAGE 後、Transfer cell を用いタンパクをアクリルアミドゲルから Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA) に電氣的 (10 V, 30 分間) に転写した。この際、ろ紙、アクリルアミドゲル、PVDF 膜は転写用緩衝液に浸して行った。転写後、PVDF 膜を PBS で 2 回洗浄した後、Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences) に浸して 1 時間ブロッキングを行った。CYP24 の検出には 1 次抗体としてヤギ抗ヒト CYP24 抗体 (Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で 200 倍希釈)、2 次抗体として蛍光標識された抗ヤギ IgG 抗体 (Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で 5,000 倍希釈) を用いた。1 次および 2 次抗体はそれぞれ室温

で 1 時間反応させた。1 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 4 回、2 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 3 回、さらに 0.1% PBST/0.01% SDS で 5 分間洗浄し、最後に PBS で 5 分間洗浄した。バンドの検出には Odyssey インフラレッドイメージングシステムを、定量は Odyssey software (ver. 1.2) を用いて行った。

I-C. 研究結果

I-C-1 CYP24 mRNA およびタンパクの発現

各細胞株における CYP24 mRNA およびタンパク発現量を Fig. 4 に示した。CYP24 mRNA は KGN 細胞で最も高く、続いて HepG2、HEK293 細胞で発現が認められた。MCF-7 および MDA-MB-435 細胞においてもわずかながら発現が認められた。一方、CYP24 タンパクは HEK293 細胞で最も高く発現し、HepG2 および MCF-7 細胞でも高く発現していた。KGN 細胞では mRNA レベルで高い発現が認められるものの、タンパクレベルでは発現が低く、一方、HEK293 細胞では mRNA レベルでは発現が低いものの、タンパクレベルでは高い発現が認められた。このように CYP24 の mRNA とタンパク発現量には相関がないことが明らかになった。

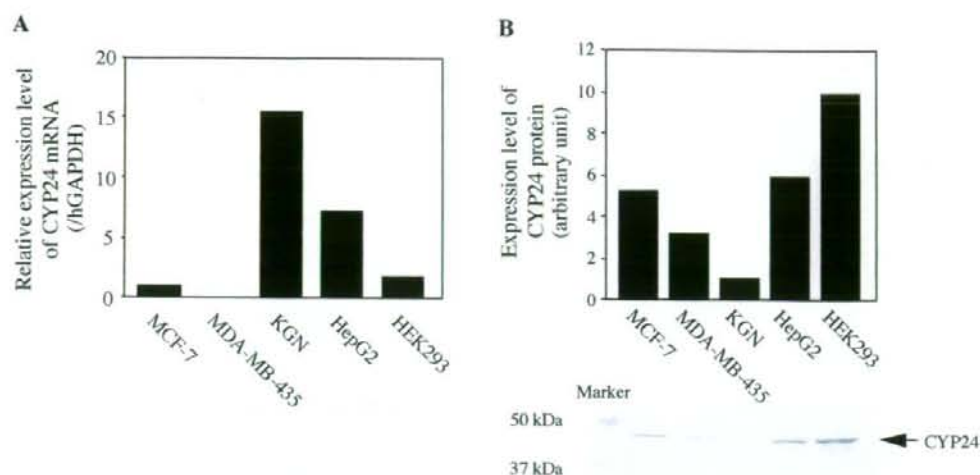


Fig. 4. Expression levels of CYP24 mRNA and protein in various human cell lines. *A*, expression levels of CYP24 mRNA in MCF-7, MDA-MB-435, KGN, HepG2, and HEK293 cells were determined by real-time RT-PCR. It was normalized with the expression level of GAPDH as a control. *B*, expression levels of CYP24 protein in these cells were determined by Western blot analysis.

I-C-2 mature miR-125b の発現

各種細胞株における mature miR-125b の発現量を Fig. 5 に示した。mature miR-125b は KGN 細胞で高く、

MDA-MB-435 細胞においても発現が認められた。MCF-7 細胞でもわずかながら検出されたが、HepG2 および HEK293 細胞では検出できなかった (Fig. 5)。

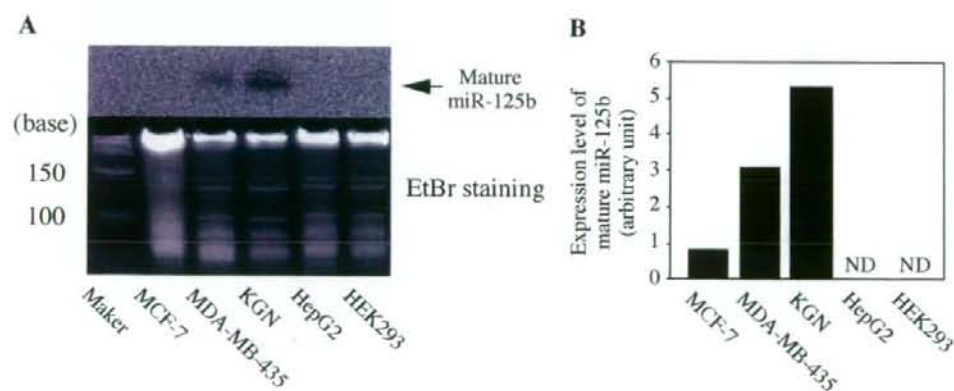


Fig. 5. Expression level of miR-125b in various human cell lines. *A*, Northern blot analysis was performed. The ethidium bromide-staining of RNA was used as loading control. *B*, the quantitation was performed by densitometry. ND: not detected.

I-C-3 CYP24 タンパクと mature miR-125b の発現量の関係

各細胞における CYP24 と miR-125b の発現量の相関を検討したところ、mature miR125b-1 と CYP24 タンパク発

現量との間に有意な逆相関関係 ($r = -0.899$, $P < 0.05$) が認められた (Fig. 6)。しかし、CYP24 mRNA 発現量との間には有意な関連が認められなかった (data not shown)。

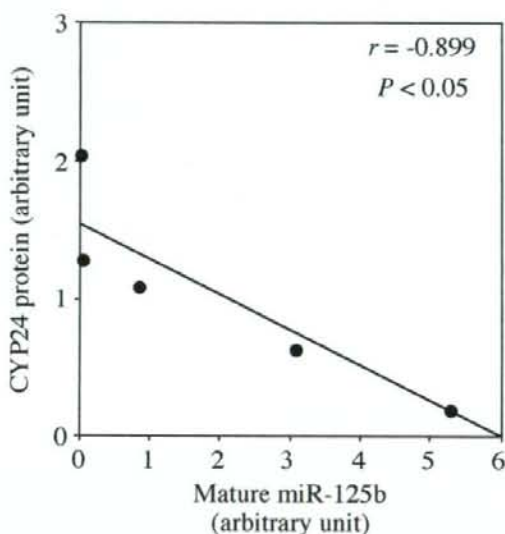


Fig. 6. Relationship between the CYP24 protein and mature miR-125b levels in MCF-7, MDA-MB-435, KGN, HepG2 and HEK293 cells.

I-D. 考察

CYP24 mRNA の 3'-UTR の塩基配列を検索したところ、miR-125b の結合領域が見いだされ (Fig. 3)、CYP24 は miR-125b の標的となる可能性が示唆された。特に miRNA の 5'末端から 2~8 塩基までは seed sequence と呼ばれ、この部分が標的の認識に重要であることが知られている。CYP24 の MRE125b はこの seed sequence が完全に一致しており、miR-125b が CYP24 の発現調節に

おいて機能的に働く可能性が考えられた。

CYP24 は vitamin D receptor (VDR) の代表的な標的遺伝子として知られており、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による誘導に関して多くの研究がなされている。

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は不活性化酵素である CYP24 を誘導する一方で、合成酵素である CYP27B1 を抑制し、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の恒常性を維持していると考えられている。CYP27B1 や CYP24 は主に腎

に発現しているが、CYP27B1は皮膚やリンパ節、大腸、胎盤などに、CYP24は肺や乳腺、胎盤などに発現していることが報告されており (Zehnder et al., 2001; Ren et al., 2005; Anderson et al., 2006)、腎外組織においてもビタミンD₃の活性化と不活性化が行われていると考えられている。このような腎外組織においてビタミンD₃は細胞の増殖抑制作用や分化誘導作用、アポトーシス誘導作用を示すと考えられている。また、CYP24の発現は正常組織に比べ、癌組織において増加することが報告されており (Segersten et al., 2005; Anderson et al., 2006)、癌組織ではCYP24によるビタミンD₃の不活性化が亢進していることが考えられる。Albertsonら (2000)はCYP24をコードしている染色体20q13.2の領域が乳癌において多重化することを報告している。しかし、乳癌患者におけるCYP24 mRNA発現量の増加は2倍程度であり (Segersten et al., 2005)、乳癌患者と健常人で変わらない (de Lyra et al., 2006) または健常人の10分の1程度まで減少する (Anderson et al., 2006) という報告もある。Townsendら (2005a)は乳腺組織における1 α ,25(OH)₂D₃の24位水酸化酵素活性が癌組織では正常組織の約2.5倍に増加することを報告している。これらのことから、CYP24の過剰発現はmRNAレベルでは説明がつかず、遺伝子の多重

化以外の機構が存在することが考えられた。CYP24はこれまで腎をはじめとする種々の組織や細胞株にmRNAレベルで発現していることが報告されているが、タンパクレベルでの発現量を比較した論文は少ない。本章では各種細胞株におけるCYP24の発現量を比較し、mRNAレベルとタンパクレベルで相関しないことを明らかにした (Fig. 4)。この結果よりCYP24の発現には転写後調節が関わっている可能性が考えられた。

miRNAは転写後調節に関わる因子として近年急速に研究が進んでおり、miRNAマイクロアレイによりその発現部位や発現変動が網羅的に調べられている。その中のひとつであるmiR-125bは脳で高く発現しているほか、心臓や乳腺などの組織にも発現している (Sempere et al., 2004; Iorio et al., 2005)。このmiRNAは乳癌において発現が低下することが報告されており (Calin et al., 2004; Iorio et al., 2005)、発癌との関連も考えられている。本章においてもヒト乳癌由来MCF-7細胞ではmiR-125b発現量がわずかであり、これまでの報告と一致した。また、同じ乳癌由来MDA-MB-435細胞ではMCF-7細胞よりも高い発現が認められ、Iorioら (2005)の報告と一致した。このほかの各種細胞株においても発現量に大きな差が認められ (Fig. 5)、細胞の由来や種類による違いが確認できた。miR-125bの発現

量は CYP24 mRNA 発現量とは相関が認められず、CYP24 タンパク発現量とのみ有意な逆相関関係を示した (Fig. 6) ため、CYP24 が miR-125b によって転写後調節を受けると考えられることが支

持された。以降の実験では、miR-125b 陰性細胞として MCF-7 細胞を、miR-125b 陽性細胞として KGN 細胞を用いた。

II 章 miR-125b による CYP24 の発現制御 ルシフェラーゼアッセイ による検討

II-A. 緒言

miRNA は標的遺伝子の 3'-UTR に結合し、その翻訳を抑制することが知られている。ルシフェラーゼ発現プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の下流に miRNA の標的となる配列を組み込み、ルシフェラーゼ活性を測定することでその配列が機能的かどうかを判断することができる。本章では CYP24 mRNA の MRE125b を含むさまざまなルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、miR-125b 陰性の MCF7 細胞に pre-miR-125b を導入することで、または miR-125b 陽性の KGN 細胞にアンチセンス DNA/LNA オリゴヌクレオチド (AsO) を導入し miR-125b の機能を阻害することで、活性への影響を比較した。

II-B. 研究方法

II-B-1 試薬

CS-FBS の作製は、デキストラン 0.05 g、活性炭 0.5 g を 100 mL の三角フラスコに別々に入れ、精製水 50 mL を加えて懸濁し、両者を混和した。50 mL のファルコンチューブ 4 本に 25 mL ずつ分注し、4°C に 24 時間静置した後、4°C、3,000 rpm、10 分間遠心分離し、上清を捨てた。沈殿に FBS を 25 mL ずつ加え、

20 秒間ボルテックスした後、氷中 20 分間インキュベートした。これを 4°C、3,000 rpm、10 分間遠心分離した後、上清をろ過滅菌し、CS-FBS として用いた。

II-B-2 レポータープラスミドの構築

Fig. 7 には作成したレポータープラスミドの概略を示した。pGL3/R1 は MRE125b を 1 つ逆方向に有し、pGL3/F1 および pGL3/F2 は MRE125b をそれぞれ 1 つまたは 2 つ順方向に有している。pGL3/MRE3 は MRE125b をタンデムに 3 つ有している。pGL3/UTR1 は MRE125b のほかに miR-125b の seed sequence と相同性の高い配列を 1 つ有し、pGL3/UTR2 は MRE125b のほかに miR-125b の seed sequence と相同性の高い配列を 2 つ有している (Fig. 7B)。また、pGL3/c-miR-125b は miR-125b に完全に相補的な配列を有しており、miR-125b に対する陽性対照として用いた。

II-B-2-1 pGL3/R1、pGL3/F1 および pGL3/F2 プラスミドの構築

ヒト CYP24 mRNA の 3'-UTR に存在する miR-125b 結合部位 (+1571 から +1592) を有するルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3/R1、pGL3/F1 および pGL3/F2 を以下の方法により構築した。ヒト胸腺 total RNA (Stratagene, La Jolla, CA) から oligo dT を primer と