

る特異的な DNA 配列に結合することで遺伝子の発現を上昇させる (van Raalte et al., 2004; Martin et al., 1997; Kersten et al., 2000)。加えて

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 や UGT2B4 といった第 II 相薬物代謝酵素の発現も上昇させることが知られている (Barbier et al., 2003a and 2003b)。このように PPAR $\alpha$  は脂質代謝や異物代謝において中心的に働く遺伝子を制御する役割を担っている。

MicroRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない 22 塩基程度の内在性の低分子 RNA であり、線虫で初めて発見され (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。miRNA

の前駆体はタンパク質をコードする遺伝子と同様に 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) と呼ばれ、核内で Drosha と呼ばれる酵素により約 60~80 塩基程度の precursor miRNA (pre-miRNA) に切断される。その後、Exportin 5 により核内から細胞質へと輸送され、さらに Dicer により 22 塩基程度の mature miRNA に切り出される。Mature miRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、標的 mRNA の主に 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に部分相補的に結合して標的遺伝子の翻訳を抑制、もしくは mRNA を分解することにより発現を負に制御することが知られている。

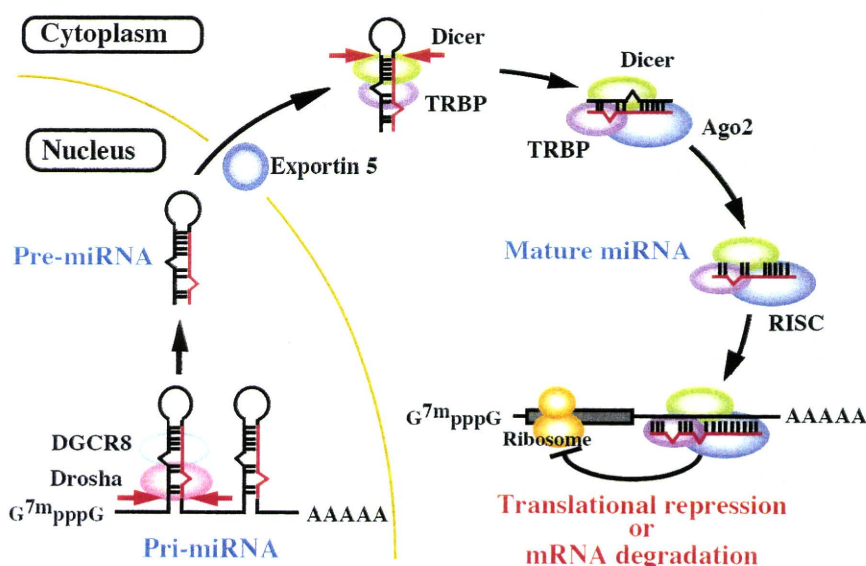


Fig. 1. Proposed mechanism of gene silencing by microRNAs. miRNA genes are transcribed by an RNA polymerase II to generate the primary miRNA (pri-miRNA) transcripts. The initiation step is mediated by the Drosha in the nucleus. The product of the nuclear processing is ~80-nt precursor miRNA (pre-miRNA). 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 degradation.

miRNA は発生や細胞の分化、増殖など重要な生命現象の制御に関わっており、この制御の異常が癌などの疾患に関与していると考えられている。現在ヒトにおいて 1000 種類以上の miRNA が報告されており、それぞれの miRNA における標的 mRNA の予測も可能となっている (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。ヒトにおいては mRNA の 60% 程度が miRNA によって制御されている可能性が示唆されている (Friedman et al, 2009) が、実験的に miRNA の標的となることが証明された遺伝子はまだ少ない。当研究室では、ベンゾ[a]ピレンの代謝的活性化やエストラジオールの 4 位水酸化反応を担う cytochrome P450 (CYP) 1B1 が miR-27b によって翻訳抑制を受けること (Tsuchiya et al., 2006)、CYP2E1 が miR-378 によって翻訳抑制を受けること (Mohri et al., 2010)、CYP3A4 などの薬物代謝酵素やトランスポーターの発現に関与する pregnane X receptor (PXR) が miR-148a により翻訳抑制されること (Takagi et al., 2008)、肝臓における様々な遺伝子の制御を担う hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) が miR-24 および miR-34a により制御されること (Takagi et al., 2009) を明らかにしている。さらに CYP24 およびその誘導的発現に関与する vitamin D receptor (VDR) が共に miR-125b によって発現抑制を受けること (Komagata et al., 2009; Mohri et al., 2009) も明らかにした。このよう

に miRNA は薬物代謝酵素およびその発現を制御する転写因子の発現調節にも関与しており、薬物動態においても重要な因子であると考えられる。これまでに miRNA とヒト PPAR $\alpha$  の関係に関して、骨関節軟骨細胞において PPAR $\alpha$  の発現制御に miR-22 が関与すること (Iliopoulos et al., 2008) が報告されている。しかし肝臓における常在的な PPAR $\alpha$  の発現と miRNA の関係については不明である。

本研究では、肝臓での PPAR $\alpha$  の発現調節メカニズムとして miRNA の関与の可能性を検討した。コンピューター解析により PPAR $\alpha$  の 3'-UTR に相補的な miRNA を探索したところ、Targetscan (<http://www.targetscan.org>) においては、miR-18a、miR-21、miR-22、miR-24、miR-27b など計 28 種の miRNAs が候補として挙げられた。Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/Pictar Vertebrate.cgi>) では 9 種の miRNAs が挙げられた。これらの中で肝臓において発現が比較的高い miR-21、miR-22、miR-24、miR-27b、miR-181a、let-7a (miRanda: <http://www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do>) について、ヒト肝臓での PPAR $\alpha$  の発現調節に関わる可能性を検討した。

## B. 研究方法

Lipofectamine RNAiMAX を用いた

reverse transfection により、HuH7 および HepG2 細胞に pre-miRNA または AsO を導入した。125 pmol の pre-miRNA または AsO を加えた FBS 非含有 DMEM 500  $\mu$ L に 5  $\mu$ L の Lipofectamine RNAiMAX を加え、室温で 20 分間インキュベートした。転倒攪拌した後、6 well 細胞培養用プレートに 1 well あたり 500  $\mu$ L ずつ添加し、HuH7 および HepG2 細胞を  $2 \times 10^5$  および  $5 \times 10^5$  cells/well となるように播種して 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 72 時間培養した。acyl CoA synthetase (ACS) mRNA を測定する場合には、pre-miRNA および AsO を導入した 48 時間後に、メディウムを 100  $\mu$ M ベザフィプレートを含むメディウムに交換し、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C でさらに 24 時間培養した。

### C. 研究結果

#### C-1 各細胞株における内因性の PPAR $\alpha$ タンパク質および mRNA 発現量の比較

各細胞株 (HEK293、HuH7、HeLa、HepG2) において PPAR $\alpha$  タンパク質および mRNA が十分に検出可能であるか調べるため、PPAR $\alpha$  タンパク質および mRNA 発現量について測定した (Fig. 2)。PPAR $\alpha$  タンパク質発現量は HuH7 細胞で最も高く、HeLa 細胞で最も低かった。また PPAR $\alpha$  mRNA 発現量は HepG2 細胞で最も高く、HuH7 細胞で最も低かった。従って、PPAR $\alpha$  タンパク質および mRNA が共に十分に検出可能であり、かつ肝癌由来細胞であることから HuH7 細胞と HepG2 細胞を以下の検討で用いることにした。

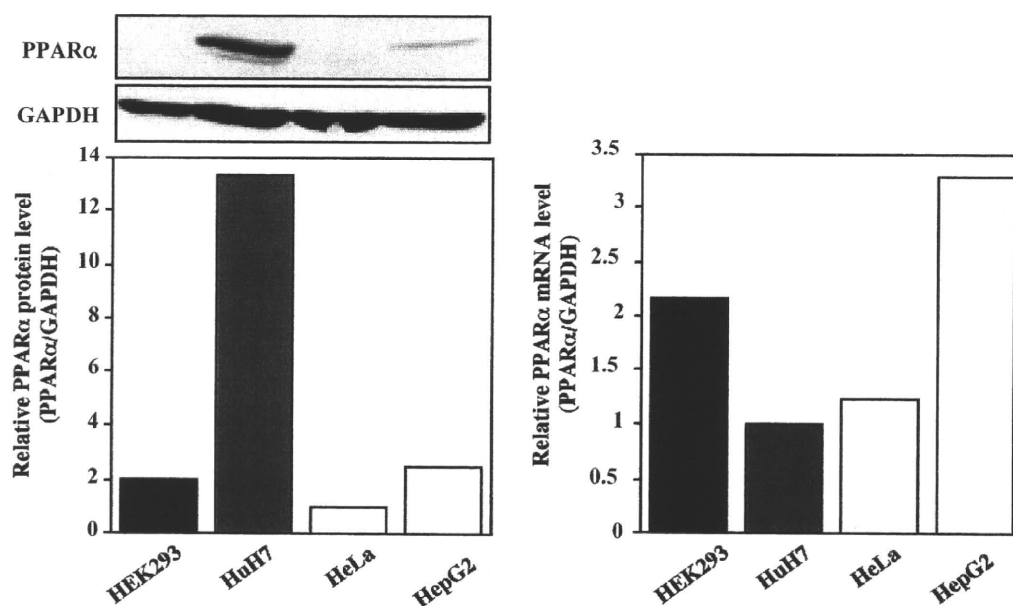


Fig. 2. Expression levels of PPAR $\alpha$  protein and mRNA in cell lines. The PPAR $\alpha$  protein and mRNA levels were determined by Western blot analysis and real time RT-PCR, respectively. The PPAR $\alpha$  protein and mRNA levels were normalized with GAPDH protein and mRNA levels, respectively. Data are the mean of two independent experiments.

C-2. HuH7細胞におけるPPAR $\alpha$ タンパク質発現量に及ぼすmiRNA過剰発現の影響

コンピューター解析によりPPAR $\alpha$ の3'-UTRに相補的なmiRNAを探索したところ、Targetscan (<http://www.targetscan.org>) においては、miR-18a、miR-21、miR-22、miR-24、miR-27bなど計28種のmiRNAsが候補として挙げられた。Pictar ([http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/Pictar\\_vertebrate.cgi](http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/Pictar_vertebrate.cgi)) では9種のmiRNAs

が挙げられた。これらの中で肝臓において発現が比較的高いmiR-21、miR-22、miR-24、miR-27b、miR-181a、let-7aをHuH7細胞に導入し、PPAR $\alpha$ のタンパク質発現量に及ぼすmiRNA過剰発現の影響を検討した (Fig. 3)。その結果PPAR $\alpha$ タンパク質発現量は、pre-miR-21およびpre-miR-27bの導入により有意に低下した (コントロールの47%および43%)。その他のmiRNAではPPAR $\alpha$ タンパク質に変化が認められなかった。従ってmiR-21およびmiR-27bがPPAR $\alpha$ の発現制御に関わることが示唆された。

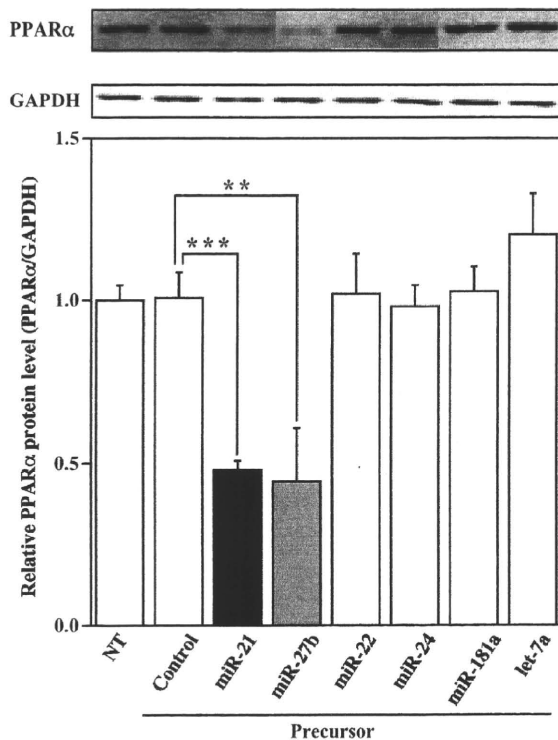


Fig. 3. Effects of overexpression of various miRNAs on expression level of endogenous PPAR $\alpha$  protein in HuH7 cells. The precursor for various miRNAs and control (50 nM) were transfected into the cells. After 72 hr, the cells were harvested and total cell homogenates (10  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis. The PPAR $\alpha$  protein levels were normalized with GAPDH protein levels. Values are expressed as percentages relative to NT. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 by student's t-test. NT: No transfection.

C-3 HuH7細胞におけるPPAR $\alpha$  mRNA発現量に及ぼすmiR-21およびmiR-27b過剰発現の影響

PPAR $\alpha$ タンパク質の減少がPPAR $\alpha$  mRNAの減少によるものか調べるため、miR-21およびmiR-27b過剰発

現時のPPAR $\alpha$  mRNA発現量を調べた (Fig. 4)。pre-miR-21およびpre-miR-27bを導入した際、PPAR $\alpha$  mRNA発現量に変化は認められなかった。従って、miR-21およびmiR-27bはmRNAの分解ではなく、翻訳抑制によりPPAR $\alpha$ の発現を制御していることが示唆された。

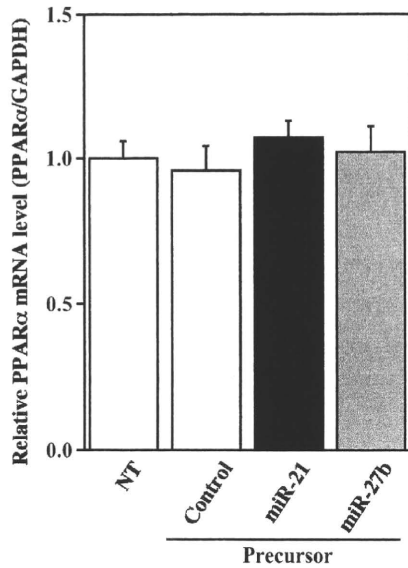


Fig. 4. Effects of overexpression of miR-21 and miR-27b on expression level of endogenous PPAR $\alpha$  mRNA in HuH7 cells. The precursor for miR-21, miR-27b, and control (50 nM) were transfected into the cells. After 72 hr, the cells were harvested and total RNA was isolated. The PPAR $\alpha$  mRNA levels were determined by real time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA levels. Values are expressed as percentages relative to NT. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). NT: No transfection.

C-4. HuH7 細胞における内因性の PPAR $\alpha$ タンパク質および mRNA 発現量に及ぼす miR-21 および miR-27b 阻害の影響

HuH7 細胞に AsO-miR-21 および AsO-miR-27b を導入し、miR-21 および miR-27b をノックダウンした際の PPAR $\alpha$ タンパク質および mRNA 発現量

の変化を検討した (Fig. 5)。AsO-miR-21 および AsO-miR-27b の導入により、PPAR $\alpha$ タンパク質発現量は有意に上昇した (コントロールの 1.21 倍および 1.23 倍)。しかし、PPAR $\alpha$  mRNA 発現量には変化は認められなかった。このことから、miR-21 および miR-27b は翻訳抑制により PPAR $\alpha$ の発現を制御していることが示された。

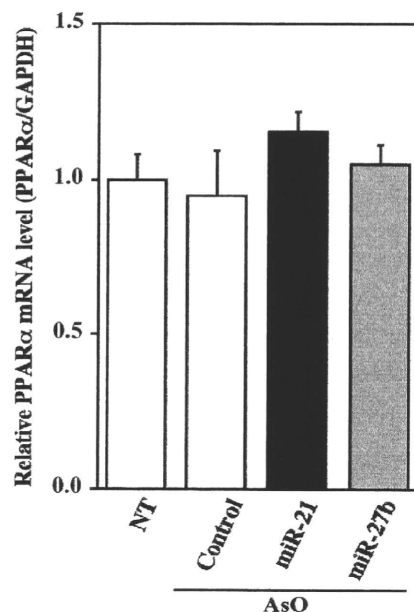
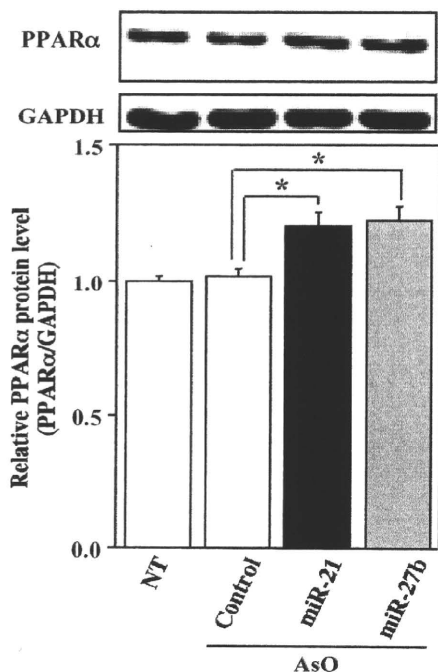


Fig. 5. Effects of inhibition of miR-21 and miR-27b on expression level of endogenous PPAR $\alpha$  protein and mRNA in HuH7 cells. The AsO for miR-21, miR-27b, and control (50 nM) were transfected into the cells. After 72 hr, the cells were harvested and total cell homogenates (10  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis and total RNA was also isolated. The PPAR $\alpha$  protein and mRNA levels were normalized with GAPDH protein and mRNA levels, respectively. Values are expressed as percentages relative to NT. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P$  < 0.05 by student's t-test. NT: No transfection.

C-5 Pre-miRNA もしくは AsO 導入時の miR-21 および miR-27b 発現量

HuH7 細胞に pre-miR-21、pre-miR-27b または AsO-miR-21、AsO-miR-27b を導入した際の miR-21 および miR-27b 発現量の変動について調べた。pre-miR-21 および pre-miR-27b を導

入した時、miR-21 および miR-27b はそれぞれ 73 倍および 25 倍に増加していることが確認された (Fig. 6)。また AsO-miR-21 および AsO-miR-27b を導入した時、miR-21 および miR-27b はコントロールの 43% および 49% まで低下していることを確認した (Fig. 6)。

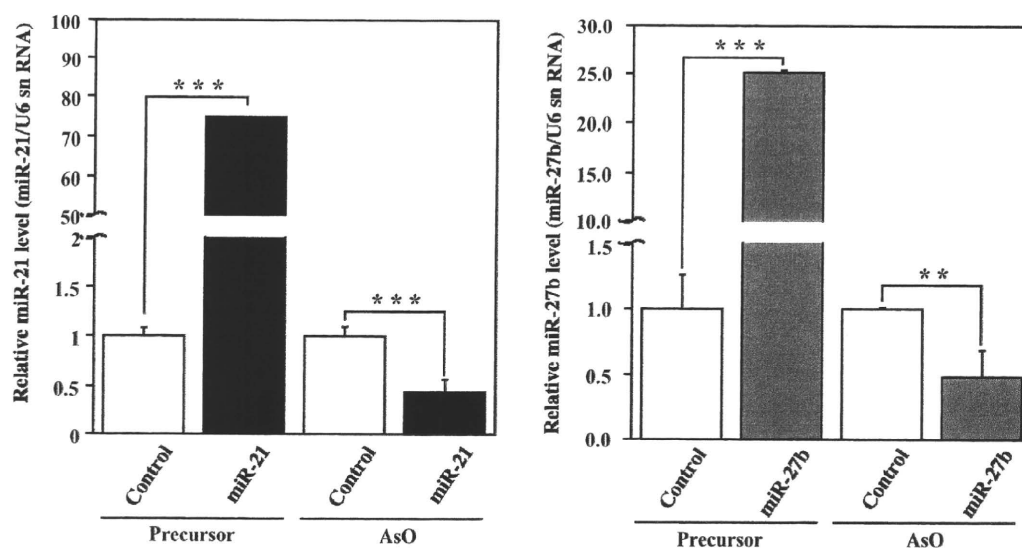


Fig. 6. Effects of overexpression or inhibition of miR-21 and miR-27b on expression level of miR-21 and miR-27b in HuH7 cells. The precursor or AsO for miR-21, miR-27b and control (50 nM) were transfected into the cells. After 72 hr, the cells were harvested and total RNA was isolated. The miR-21 and miR-27b levels were normalized with U6 snRNA levels. Values are expressed as percentages relative to control. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, compared with the precursor or AsO for control.

C-6. HepG2 細胞における内因性の PPAR $\alpha$ タンパク質および mRNA 発現量

に及ぼす miR-21 および miR-27b 過剰発現の影響

HuH7細胞で認められた miR-21 および miR-27b の過剰発現による PPAR $\alpha$  の発現低下が異なる細胞株においても認められるか、HepG2 細胞を用いて検討した (Fig. 7)。HepG2 細胞に pre-miR-21 および pre-miR-27b を導入した時、PPAR $\alpha$  タ

ンパク質発現量は有意に低下した (コントロールの 47% および 65%)。一方、PPAR $\alpha$  mRNA 発現量には変化は認められなかった。以上より、miR-21 および miR-27b による PPAR $\alpha$  発現量の低下は HuH7 細胞に限られた現象でないことが示された。

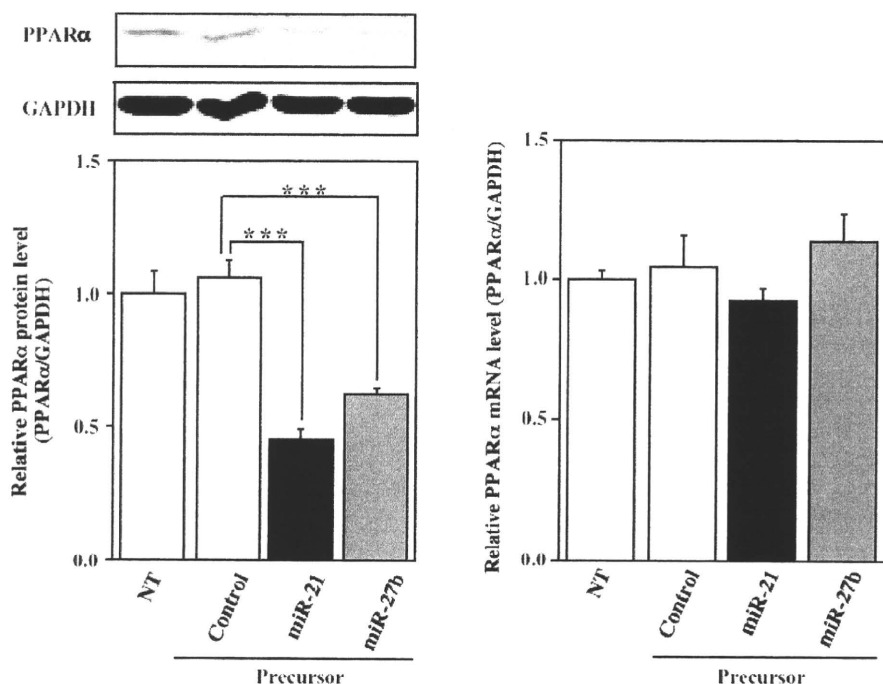


Fig. 7. Effects of overexpression of miR-21 and miR-27b on expression level of endogenous PPAR $\alpha$  protein and mRNA in HepG2 cells. The precursor for miR-21, miR-27b, and control (50 nM) were transfected into HepG2 cells. After 72 hr, the cells were harvested and total cell homogenates (30  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis and total RNA was also isolated. The PPAR $\alpha$  protein and mRNA levels were normalized with GAPDH protein and mRNA levels, respectively. Values are expressed as percentages relative to NT. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P$  < 0.05 by student's t-test. NT: No transfection.

#### C-7. PPAR $\alpha$ の下流遺伝子の発現に及ぼす miR-21 または miR-27b の影響

miR-21 および miR-27b による PPAR $\alpha$  の発現制御が PPAR $\alpha$  の下流遺伝子にも影響するか調べるため、HuH7 細胞を用いて miR-21 および miR-27b の過剰発現もしくはノックダウンによる ACS

mRNA 発現量の変化について調べた。またこの際に、リガンド処置の有無による違いについても検討した。PPAR $\alpha$  のリガンドであるベザフィブラートを処置することにより、PPAR $\alpha$  の下流遺伝子である ACS mRNA は有意に ( $P$  < 0.001) 誘導された (1.3 倍) (Fig. 8)。Pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、常在的

な ACS mRNA 発現量が有意に (いずれも  $P < 0.001$ ) 低下し (コントロールの 52% および 46%)、またリガンドによる ACS mRNA の誘導能が消失した。一方、AsO-miR-21 および AsO-miR-27b を導入した際、常在的な ACS mRNA に変化は

認められなかったが、誘導能は増大した (1.9 倍および 1.4 倍)。従って、miR-21 および miR-27b による PPAR $\alpha$  の発現制御は下流遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが示された。

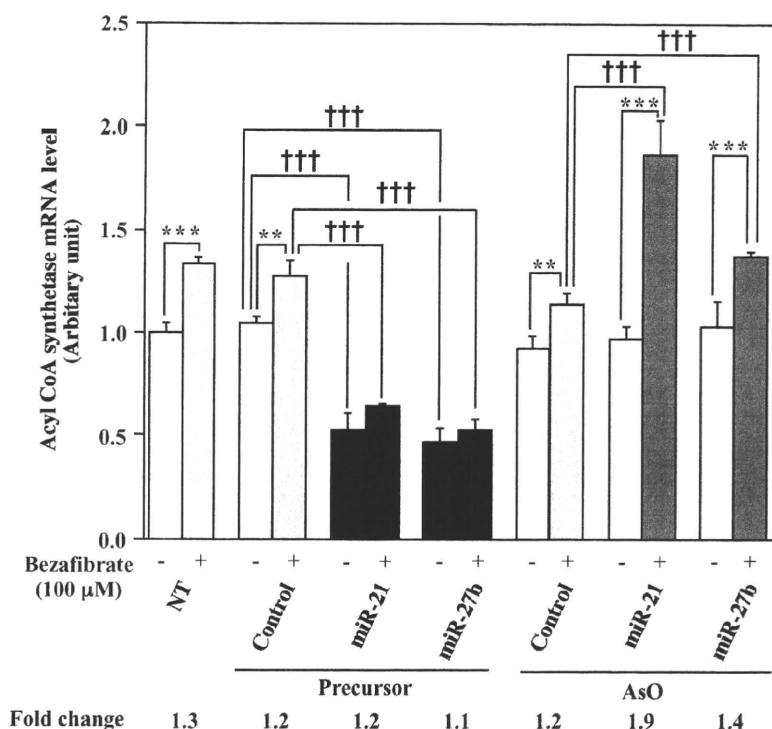


Fig. 8. Effects of overexpression or inhibition of miR-21 and miR-27b on expression level of ACS mRNA in HuH7 cells. Precursor or AsO for miR-21, miR-27b, and control were transfected into the cells. After 48 hr, the cells were exposed to 100  $\mu$ M bezafibrate and incubated for 24 hr. The ACS mRNA level were determined by real time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA levels. Values are expressed as percentages relative to NT (-). Each column represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with no treatment of bezafibrate and ††† $P < 0.001$ , compared with precursor or AsO for control by Tukey method test. NT: No transfection.

#### C-8. 各細胞株における miR-21 と miR-27b 発現量の比較

ルシフェラーゼアッセイに用いる細胞株を決定するために、miR-21 と miR-27b の発現量を測定した。両者の発現は共に HepG2 細胞で最も高く、

HEK293 細胞で最も低かった (Fig. 10)。この結果から、ルシフェラーゼアッセイにおいて miRNA の過剰発現実験には HEK293 細胞、miRNA のノックダウン実験には HeLa 細胞をそれぞれ用いることとした。



**Human PPAR $\alpha$  mRNA (NM\_001001928)**

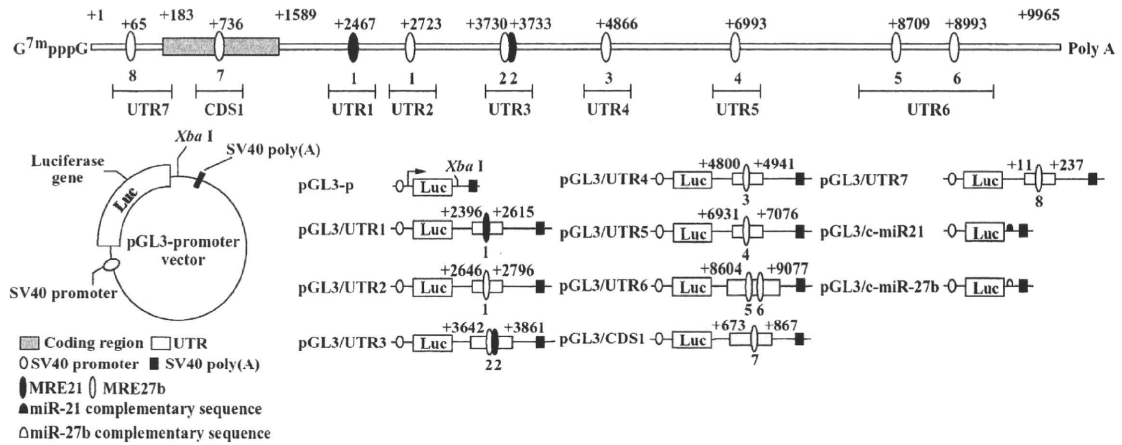


Fig. 9. Schematic representation of the luciferase reporter gene constructs. Various target fragments were inserted into the *Xba* I site, downstream of the luciferase gene in the pGL3p vector.

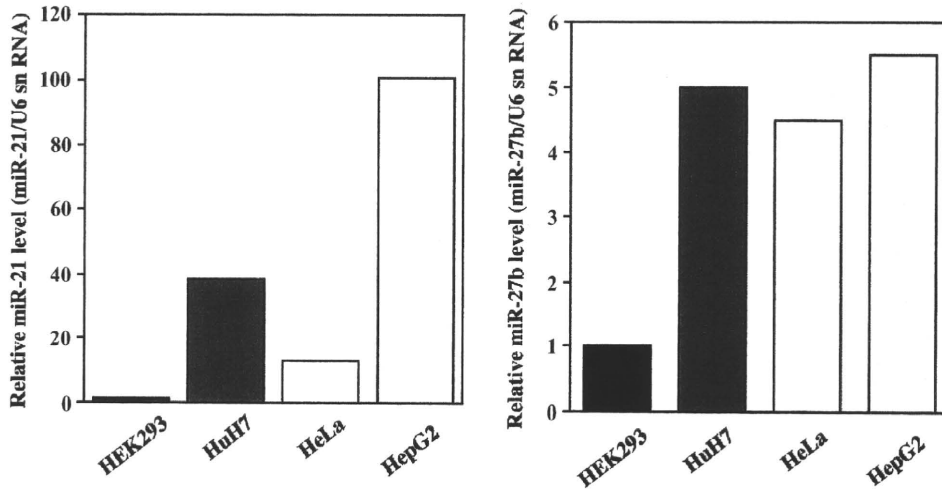


Fig. 10. Expression levels of miR-21 and miR-27b in cell lines. The miR-21 and miR-27b levels were determined by real time RT-PCR and normalized with U6 snRNA levels. Data are the mean of two independent experiments.

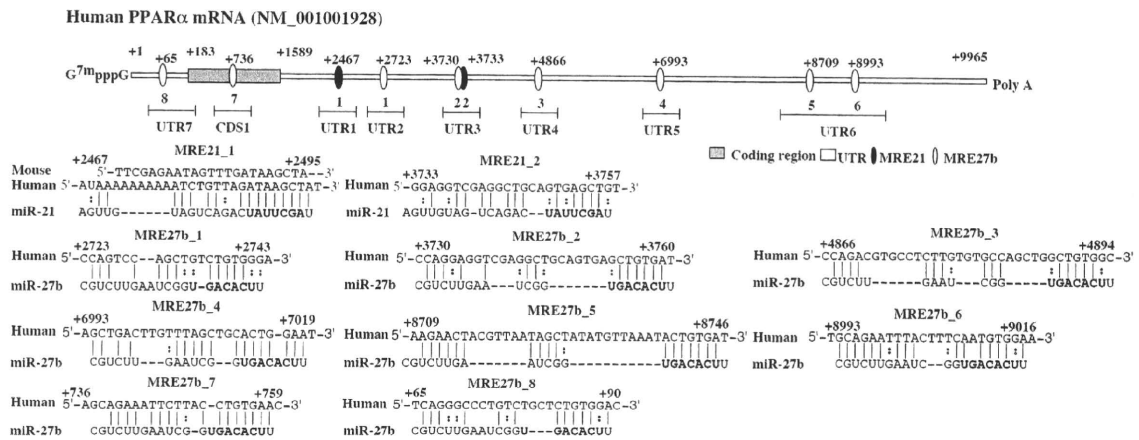


Fig. 11. Schematic representation of human PPAR $\alpha$  mRNA and the predicted target sequence of miR-21 and miR-27b in PPAR $\alpha$  mRNA. The numbering refers to the 5' end of mRNA as 1, and the coding region is from +183 to +1589. *bold letters*, seed sequence.

### C-9. ルシフェラーゼアッセイによる MRE の同定

コンピューター解析により PPAR $\alpha$  の3'-UTRに見出された MRE21 および MRE27b の位置および配列を Fig. 11 に示した。まず 2 つの MRE21 が機能的であるかを調べるために、HEK293 細胞に各 MRE を含むレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイにより miR-21 過剰発現の影響を検討した (Fig. 12)。pre-miR-21 の導入により pGL3/c-miR-21 では活性がコントロールの 12%まで低下したことから、導入した pre-miR-21 が細胞内で機能的に働いていることが示された。MRE21\_1 を含む pGL3/UTR1 においてコントロールの 60%まで活性の低下が認められた。一方、MRE21\_2 を含む pGL3/UTR3 では活性の低下は認められなかった。従って、MRE21\_1 が機能的であることが示された。また HeLa 細胞に AsO-miR-21 を導入した時、pGL3/c-miR-21 ではコントロ

ールの 7 倍まで活性が上昇し、導入した AsO-miR-21 が細胞内で機能的に働いていることが示された (Fig. 13)。また、MRE21\_1 を含む pGL3/UTR1 においてコントロールの 1.7 倍まで活性の上昇が認められた。しかし、MRE21\_2 を含む pGL3/UTR3 では活性の上昇は認められなかった。従って、この結果からも MRE21\_1 が機能的であることが示された。次に 3'-UTR に見出された 6 つ MRE27b が機能的であるかを調べるために、HEK293 細胞に作製したレポータープラスミドを導入し、miR-27b 過剰発現の影響を検討したところ、pGL3/c-miR-27b ではコントロールの 8%まで活性が低下し、導入した pre-miR-27b が細胞内で機能的に働いていることが示された (Fig. 14) が、MRE27b を含む断片を組み込んだ pGL3/UTR2 ~ pGL3/UTR6 においては、いずれも活性の低下は認められなかった。そこで、PPAR $\alpha$  の翻訳領域および 5'-UTR において miR-27b が結合する可能性のあ

る配列を RNA hybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html>) で探索した。seed sequence との相同性の高さを基準にして翻訳領域と 5'-UTR から 1 つずつ選択した MRE27b\_7 および MRE27b\_8

を含む pGL3/UTR7 および pGL3/CDS1 について検討を行ったが、ルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。以上の結果より、機能的な MRE27b を同定することはできなかった。

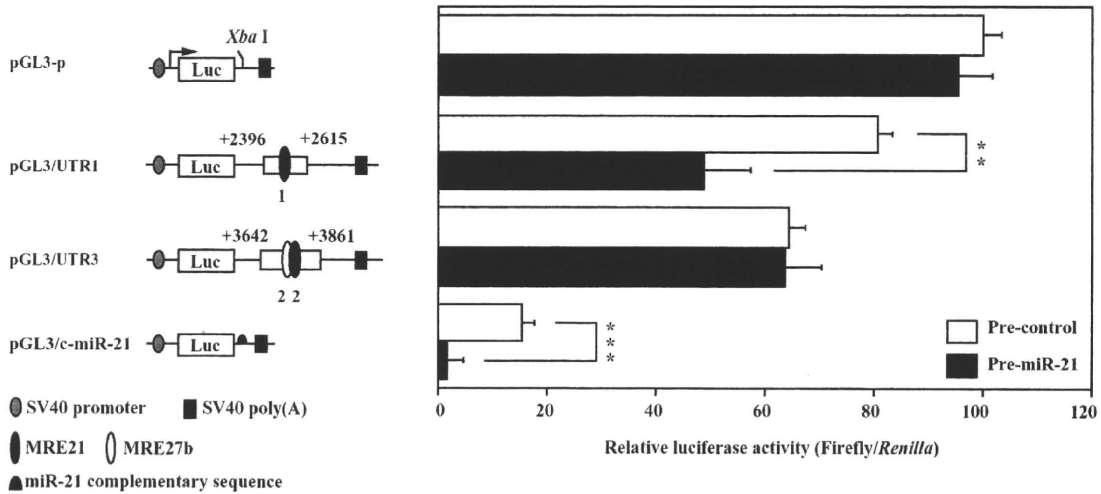


Fig. 12. Effects of overexpression of miR-21 on luciferase activity in HEK293 cells. The reporter plasmids (170 ng) were transiently transfected with pRL-TK vector (30 ng) and 50 nM precursors for miR-21 or control into HEK293 cells. The firefly luciferase activity for each construct was normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3p. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001, compared with precursor for control by student's *t*-test.

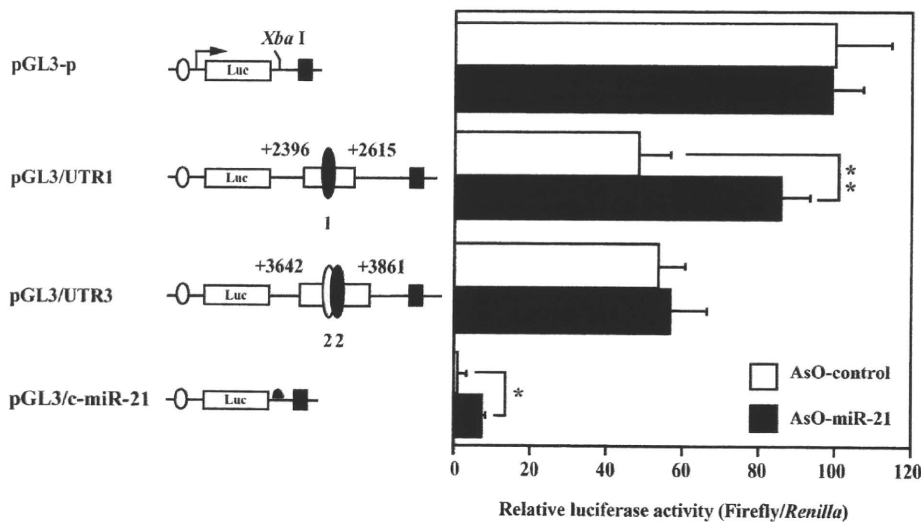


Fig. 13. Effects of inhibition of miR-21 on luciferase activity in HeLa cells. The reporter

plasmids (170 ng) were transiently transfected with phRL-TK plasmid (30 ng) and 50 nM AsO for miR-21 or control into HeLa cells. The firefly luciferase activity for each construct was normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3p. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01, compared with AsO for control by student's t-test.

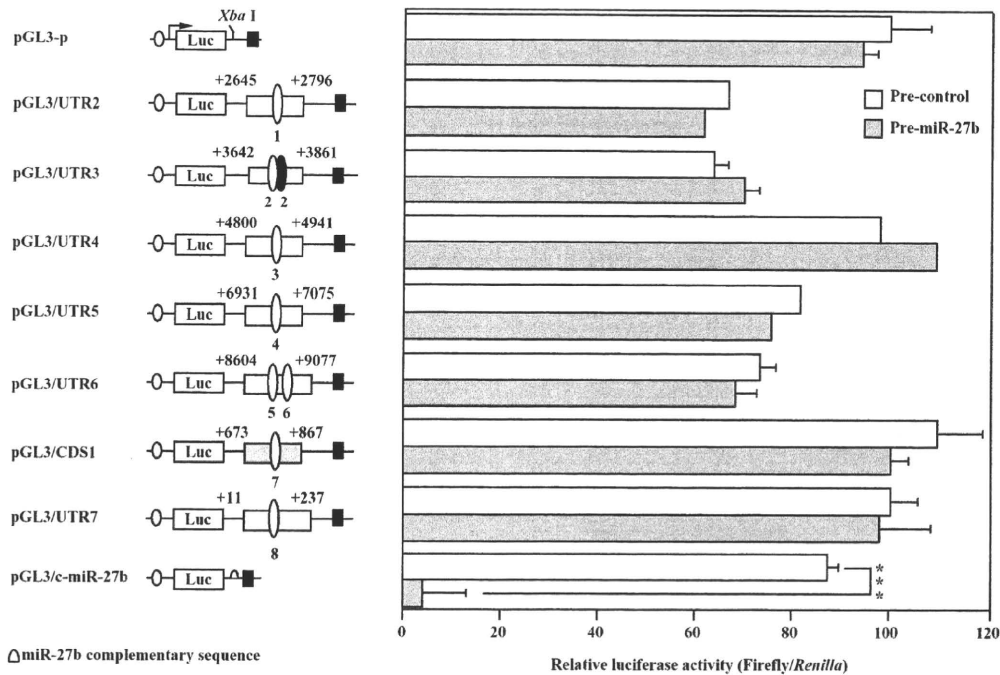


Fig. 14. Effects of overexpression of miR-27b on luciferase activity in HEK293 cells. The reporter plasmids (170 ng) were transiently transfected with phRL-TK plasmid (30 ng) and 50 nM precursor for miR-27b or control into HEK293 cells. The firefly luciferase activity for each construct was normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3p. Each column represents the mean (n = 2) or the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\* $P$  < 0.001, compared with precursor for control by student's t-test.

Table 3. Characteristics of 24 donors in the present study.

No	Sex	Age (yr)	Ethnic	Cause of death	No	Sex	Age (yr)	Ethnic	Cause of death
1	M	33	Caucasian	Head trauma	13	M	68	Caucasian	Cerebrovascular accident
2	F	47	Caucasian	Cerebrovascular accident	14	M	57	Asian	Intracerebral hematoma
3	M	49	Hispanic	Head trauma	15	F	33	Caucasian	Primary brain tumor
4	F	32	Hispanic	Subarachnoid hemorrhage	16	M	60	Caucasian	Aneurysm rupture
5	F	33	Hispanic	Cerebrovascular accident	17	M	79	Japanese	Death from cold
6	F	41	Caucasian	Cerebrovascular accident	18	F	82	Japanese	Hemorrhagic shock
7	M	38	Caucasian	Head trauma	19	F	23	Japanese	Drug abuse
8	M	56	Caucasian	Intracerebral hematoma	20	M	33	Japanese	Hemorrhagic shock
9	F	34	Black	Cerebrovascular accident	21	F	68	Japanese	Death from cold
10	F	35	Hispanic	Intracerebral hematoma	22	F	39	Japanese	Intracranial injury
11	M	36	Caucasian	Intracerebral hematoma	23	M	24	Japanese	Sudden death
12	M	46	Caucasian	Anoxia	24	M	73	Japanese	Drowning

#### C-10. PPAR $\alpha$ mRNA とタンパク質発現量との関係

24 検体のヒト個人肝における PPAR $\alpha$  mRNA の発現量には、約 11 倍の個人差が認められた。また、PPAR $\alpha$  タンパク質の発現量には約 7 倍の個人差が認められた。両者の間には正の相関関係が認められなかった ( $r = 0.09$ ,  $p = 0.65$ ) (Fig. 15)。このことから転写後調節が関与することが支持された。

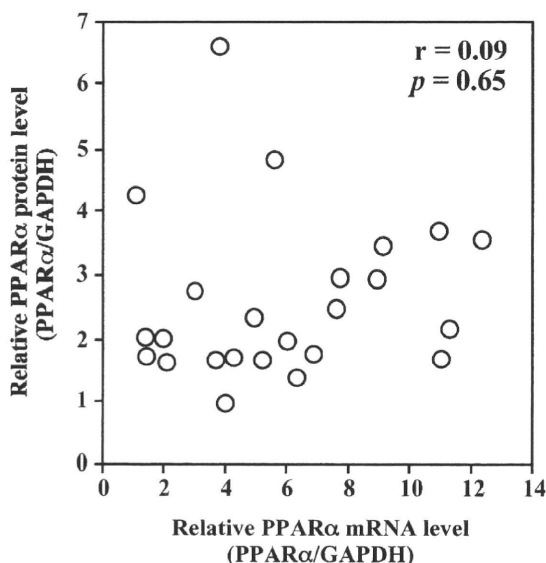


Fig. 15. Relationship between the PPAR $\alpha$  mRNA and protein levels in a panel of 24 human livers. The PPAR $\alpha$  mRNA levels were determined by real time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA levels. The PPAR $\alpha$  protein levels were determined by Western blot analysis and normalized with GAPDH protein levels. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. Data are the mean of two independent experiments.

#### C-11. miR-21 発現量と PPAR $\alpha$ 発現量との関係

24 検体のヒト個人肝における miR-21 の発現量の差は約 5 倍とそれほど大きくないことが示された。興味深いことに、miR-21 発現量は PPAR $\alpha$  タンパク質発現量 ( $r = -0.56$ ,  $p < 0.01$ ) と有意な逆相関を示した (Fig. 16)。また、翻訳効率として算出した PPAR $\alpha$  タンパク質発現量を mRNA 発現量で除した値も、miR-21 発

現量と有意な逆相関の関係 ( $r = -0.44$ ,  $p < 0.05$ ) を示した (Fig. 16)。一方 miR-21 と PPAR $\alpha$  mRNA との間に逆相関は認められなかった (Fig. 17)。このことから miR-21 は mRNA の分解ではなく、翻訳抑制により PPAR $\alpha$  を制御していることが支持された。従って、miR-21 による翻訳抑制がヒト肝における PPAR $\alpha$  の常在的な発現に寄与していることが示唆された。

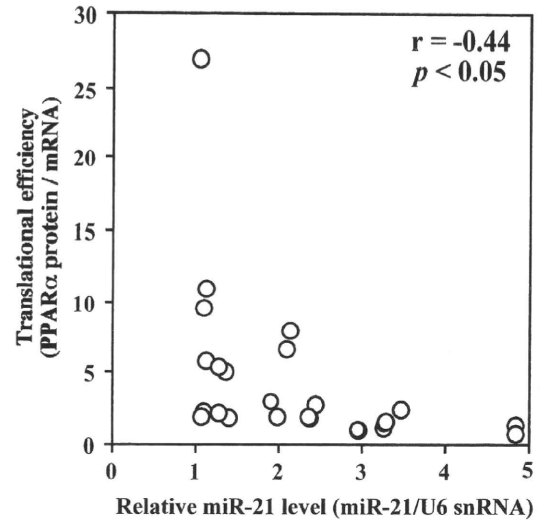
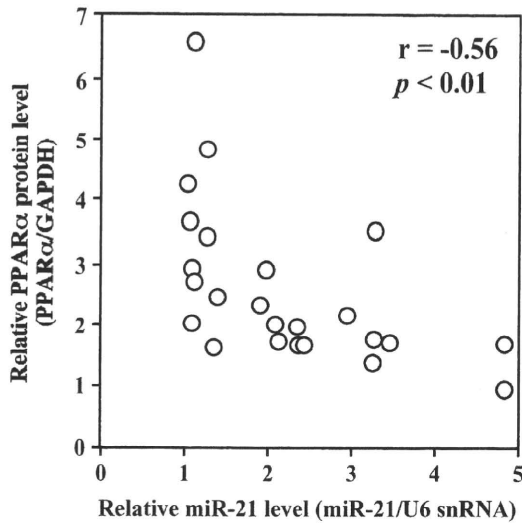


Fig. 16. Relationship between the miR-21 and PPAR $\alpha$  protein levels (A) or translational efficiency of PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$  protein/mRNA ratio) (B) in a panel of 24 human livers. The PPAR $\alpha$  mRNA and miR-21 levels were determined by real time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA and U6 snRNA levels, respectively. The PPAR $\alpha$  protein levels were determined by Western blot analysis and normalized with GAPDH protein levels. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. Data are the mean of two independent experiments.

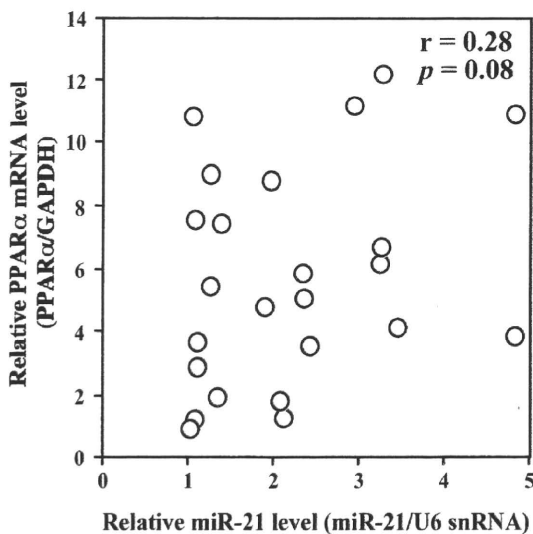


Fig. 17. Relationship between the miR-21 and PPAR $\alpha$  mRNA levels in a panel of 24 human livers. The PPAR $\alpha$  mRNA and miR-21 levels were determined by real time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA and U6 snRNA levels, respectively. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. Data are the mean of two independent experiments.

C-12. miR-27b 発現量と PPAR $\alpha$  発現量の関係

24 検体のヒト個人肝における miR-27b の発現量の差は、約 70 倍と

非常に大きいことが明らかになった。miR-27b 発現量は PPAR $\alpha$  タンパク質発現量 ( $r = -0.13, p = 0.49$ ) および PPAR $\alpha$  翻訳効率 ( $r = -0.16, p = 0.51$ ) と有意な相関を示さなかった

(Fig.18)。従って、ヒト肝臓における PPAR $\alpha$  の発現制御に対し、miR-27b の寄与は相関解析からは検知できず

miR-21 の寄与が大きい可能性が示唆された。

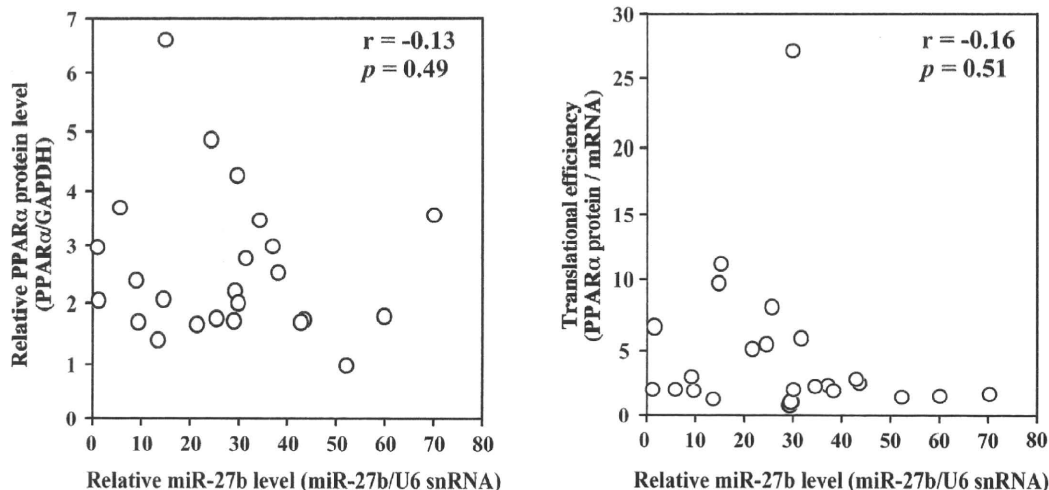


Fig. 18. Relationship between the miR-27b and PPAR $\alpha$  protein levels (A) or translational efficiency of PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$  protein/mRNA ratio) (B) in a panel of 24 human livers. The PPAR $\alpha$  mRNA and miR-27b levels were determined by real time RT-PCR and GAPDH mRNA and U6 snRNA levels, respectively. The PPAR $\alpha$  protein levels were determined by Western blot analysis and normalized with GAPDH protein levels. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. Data are the mean of two independent experiments.

#### D. 考察

PPAR $\alpha$  の発現調節に関しては、以下のことが報告されている。1) ラット肝臓においてグルココルチコイドにより PPAR $\alpha$  mRNA が誘導されること (Lemberger et al., 1996)。2) protein kinase C (PKC) の阻害によってヒト PPAR $\alpha$  mRNA や PPAR $\alpha$  の下流遺伝子が減少すること (Blanquart et al., 2004)。3) ヒト PPAR $\alpha$  は mitogen-activated protein kinase pathway を介してインスリンにより活性化されること (Juge-Aubry et al., 1999)。このように PPAR $\alpha$  の転写調節に関してはいくつか報告されているが、今回は異なる観点から

PPAR $\alpha$  の発現制御について検討した。

PPAR $\alpha$  の 3'-UTR (8376 塩基) に相補的な miRNA をコンピューター解析により探索した結果、いくつかの miRNA が挙げられた。本研究では肝臓に豊富に発現している 6 種の miRNA に注目して検討した。miRNA の 5' 末端から 2~8 塩基は seed sequence と呼ばれ、標的となる mRNA の認識に重要であることが知られている (Lewis et al., 2005)。候補として挙げられた miRNA は seed sequence の相補性がいずれも 7~8 塩基と高く、PPAR $\alpha$  の発現調節において機能的に働く可能性があると考えられた。

HuH7 細胞に 6 種の pre-miRNA を導

入した時、pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により有意な PPAR $\alpha$ タンパク質の低下が認められた (Fig. 3)。このことから miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$ の発現制御に関与していることが示唆された。しかし PPAR $\alpha$  mRNA は変動しなかった (Fig. 4) ことより、miR-21 および miR-27b は翻訳抑制により PPAR $\alpha$ の発現を制御していることが示唆された。また、AsO を用いた実験によっても miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$ の発現を制御していることが支持された (Fig. 5)。さらに、HepG2 細胞においても HuH7 細胞と同様の結果が得られたこと (Fig. 7) から、miR-21 および miR-27b による PPAR $\alpha$ の発現制御は細胞株の種類によらないことが示された。骨関節軟骨細胞において、miR-22 の過剰発現により PPAR $\alpha$ タンパク質が減少することが報告されている (Iliopoulos et al., 2008)。しかし今回 HuH7 細胞を用いた実験では miR-22 による PPAR $\alpha$ タンパク質発現量の低下は認められなかった。この矛盾には、用いる細胞株の違いにより、組織特異的な因子が miR-22 による PPAR $\alpha$ の発現制御を妨害していることが考えられる。また最近、非アルコール性脂肪肝モデルとして高濃度の脂肪酸で培養したヒト肝臓由来 L02 細胞を用いて、miR-10b が PPAR $\alpha$ の発現制御に関与することが報告されている (Zheng et al., 2010)。本研究におけるコンピューター解析においても、確かに miR-10b は候補として挙げられていた。しかし、ヒト肝臓における発現が非常に低い (miR-21 の 137 分の 1) ことから選択しなかった

(Barad et al., 2004)。筆者らは高濃度の脂肪酸で L02 細胞を培養することにより miR-10b 発現量が上昇し、その際に PPAR $\alpha$ タンパク質発現量が減少することを明らかにしている。従って、miR-10b は非アルコール性脂肪肝においては PPAR $\alpha$ の発現制御に関与すると考えられるが、常在的な PPAR $\alpha$ の発現制御に関しては不明である。

さらに miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$ の下流遺伝子に及ぼす影響について検討した際 (Fig. 8)、pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により常在的 ACS mRNA の減少およびリガンドによる ACS mRNA の誘導が消失した。一方で、AsO-miR-21 および AsO-miR-27b の導入により、常在的な ACS mRNA に影響が認められなかった。miRNA の過剰発現により miR-21 および miR-27b 発現量はそれぞれ 73 倍および 25 倍に上昇した一方で、ノックダウンによりどちらも半減したにすぎない (Fig. 6)。miRNA の過剰発現とノックダウンによる miRNA の変動の程度が異なることが、常在的な ACS mRNA 発現量の上昇に影響した原因かもしれない。一方で、リガンド存在下では誘導率の上昇が認められた。従って、miR-21 と miR-27b は PPAR $\alpha$ の下流遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが示された。以上、ここでは miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$ の発現を翻訳抑制により負に制御しており、それが PPAR $\alpha$ の下流遺伝子の発現に影響を及ぼすことを明らかにした。

miR-21 および miR-27b による PPAR $\alpha$ の発現制御が PPAR $\alpha$  mRNA のど



の領域でおこっているのか明らかにすることを目的とした。miR-21 の過剰発現 (Fig. 12) およびノックダウン (Fig. 13) により MRE21\_1 が機能的であることが示された。一方で、miR-27b 過剰発現により 3'-UTR に存在する MRE27b から機能的な MRE27b の同定をすることができなかった (Fig. 14)。これまでに miRNA は 3'-UTR だけでなく、翻訳領域 (Tay et al., 2008) や 5'-UTR (Lytel et al., 2007) の MRE にも機能的に働くことが報告されている。そこでさらに PPAR $\alpha$  の翻訳領域や 5'-UTR に機能的な MRE27b が存在するか検討したが、機能的な MRE27b を同定することはできなかった。本研究で明らかとなった機能的な MRE21\_1 は配列全体の相同性が miR-21 とかなり高い。一方で、今回候補となった 3'-UTR 内の MRE27b の中で、標的 mRNA の認識に重要である seed sequence との相同性が高い MRE27b\_5 は周辺の配列はそれほど相同性が高くないために機能的ではなかったのかもしれない。最近の研究で、miR-27b は PPAR $\gamma$  の発現制御を行うことが示唆されている (Lin et al., 2009, Jennewein et al., 2010)。Jennewein らは PPAR $\gamma$  mRNA 内に機能的な MRE27b を同定していた。PPAR $\gamma$  と PPAR $\alpha$  の MRE27b の配列を比較したが、その相同性はそれほど高くなかった (55%)。従って、これらの MRE に関して単純な比較をすることはできないと考えられる。一般にコンピューター解析による MRE の同定は偽陽性の確率が高いとされ、これが本研究において機能的な MRE27b を同定できなかった要因の 1 つであると考え

られる。しかし pre-miR-27b の導入により PPAR $\alpha$  タンパク質発現量は低下したことから、miR-27b が直接的もしくは他の因子を介して間接的に PPAR $\alpha$  に作用していると考えられる。今回検討した MRE21\_1 と MRE21\_2 の miR-21 との相同性を比較すると、MRE21\_1 (energy -21.8) の方が MRE21\_2 (energy -20.8) よりも相同性が高かった。また 6 種の miRNA の MRE のうち、miRNA と最も相同性が高い MRE が MRE21\_1 であった。PPAR $\alpha$  mRNA の翻訳領域はヒトと比較してラットやマウスでアミノ酸相同性が 90% 以上と高いのに対し、3'-UTR に関してはヒト、ラット、マウスでそれぞれ 8376、1560、238 塩基対と長さがかなり異なっている。miR-21 の塩基配列はヒト、ラット、マウスで完全一致している。また MRE21\_1 に関してヒトとマウスでは seed sequence は完全に保存されている。従って、miR-21 による発現制御がマウスでも同様に起こっている可能性が考えられる。I 章で述べたように、miR-21 による PPAR $\alpha$  の発現制御は脂質代謝に関連する下流遺伝子の発現にも影響することから、マウスは *in vivo* での脂質代謝における miR-21 による PPAR $\alpha$  の発現制御の意義を調べるための良いモデルとなるかもしれない。

以上、ここでは PPAR $\alpha$  の発現制御に MRE21\_1 が機能的に働いていることを明らかにした。また MRE27b は同定に至らなかったが、細胞株における検討を考慮すると、miR-27b は PPAR $\alpha$  の発現制御に関与していると考えられる。本章では、miR-21 および miR-27b によ

る PPAR $\alpha$  発現調節が実際にヒト肝臓中でも起きている事象であるか、24検体のヒト個人肝における PPAR $\alpha$  mRNA とタンパク質発現量、miR-21 および miR-27b 発現量の相関関係を調べることで評価した。PPAR $\alpha$  mRNA 発現量とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、転写後調節の関与が支持された (Fig. 15)。また miR-21 発現量と PPAR $\alpha$  タンパク質発現量および PPAR $\alpha$  翻訳効率との間に有意な逆相関が認められた (Fig. 16)。従って、ヒト肝臓における PPAR $\alpha$  の発現制御に対し、miR-21 の寄与が大きい可能性が示唆された。miR-21 は様々な癌において発現量が上昇していることがよく知られている (Marquez et al., 2010)。また programmed cell death 4 (Asangani et al., 2008), tropomyosin 1 (Zhu et al., 2007) や phosphate and tensin homolog (Meng et al., 2007) といった癌抑制遺伝子の発現を抑制することからも miR-21 は癌遺伝子と考えられている。さらに miR-21 は肝臓の再生の際に発現量が上昇し、肝細胞の分化に重要との報告もある (Song et al., 2010, Marquez et al., 2010)。このように、細胞増殖において重要な役割を果たしていることが示されている miR-21 が、脂質代謝においても重要であることが示された。

一方、miR-27b 発現量と PPAR $\alpha$  タンパク質発現量および PPAR $\alpha$  翻訳効率との間には有意な相関は認められず (Fig. 18)、ヒト肝臓における PPAR $\alpha$  の発現制御への miR-27b の寄与は相関解析からは検知できなかった。miR-27b は個体差が非常に大きかった一方で、PPAR $\alpha$  タンパク質

や PPAR $\alpha$  mRNA はあまり個体差が大きくなかった。これが miR-27b と PPAR $\alpha$  タンパク質の間に有意な相関関係が認められなかった原因かもしれない。しかし、細胞株を用いた実験を考慮すると、相関解析の結果は miR-27b による PPAR $\alpha$  の発現制御への関与を否定するものではないと考えられる。

以上、本研究では PPAR $\alpha$  およびその下流遺伝子の発現制御という脂質代謝や異物代謝での miR-21 および miR-27b の新たな機能を明らかにした

## E. 結論

PPAR $\alpha$  は脂質代謝や異物代謝を担う代謝酵素の発現調節を行う重要な転写因子である。本研究では、ヒト肝臓における PPAR $\alpha$  の発現調節に miRNA が関与するか検討した。

第 I 章では PPAR $\alpha$  に結合する可能性が *in silico* で予測された複数の miRNA のうち、肝臓で高く発現している miR-21、miR-22、miR-24、miR-27b、miR-181a、let-7a について、PPAR $\alpha$  の発現量およびその機能に与える miRNA の影響について検討した。pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、ヒト肝癌由来 HuH7 および HepG2 細胞において PPAR $\alpha$  タンパク質発現量が低下することを見出した。その際、PPAR $\alpha$  mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 および miR-27b は PPAR $\alpha$  を翻訳抑制により制御することが示された。さらに pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、PPAR $\alpha$  の下流遺伝子である ACS

mRNAの常在的発現量の減少およびリガンドによるACS mRNAの誘導の消失が認められ、一方AsO-miR-21およびAsO-miR-27bの導入により誘導されたACS mRNAのさらなる上昇が認められた。このことからmiR-21およびmiR-27bがPPAR $\alpha$ の下流遺伝子にも影響することが示された。

第II章では、PPAR $\alpha$  mRNAに見出されたMREのうち、どのMREが機能的に作用するかをルシフェラーゼアッセイにより検討した。この検討より、2つのMRE21のうち相同性が高く(energy -21.8)、seed sequenceと完全に相補的な配列をもつMRE21\_1がmiR-21により認識され、発現調節に機能的に働いていることが示唆された。一方で、seed sequenceとの相補性が高い8つのMRE27bはいずれも機能的ではなかった。従って、直接的に働いているか間接的に働いているかは明らかでないが、細胞株を用いた検討からmiR-27bはPPAR $\alpha$ の発現制御に関与すると考えられる。

第III章では、miR-21およびmiR-27bによるPPAR $\alpha$ 発現調節が実際にヒト肝臓中でも起きている事象であるか、24検体のヒト個人肝におけるPPAR $\alpha$  mRNAとタンパク質発現量、miR-21およびmiR-27b発現量の相関関係を調べることで評価した。PPAR $\alpha$  mRNAとタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、転写後調節の関与が示唆された。またmiR-21発現量とPPAR $\alpha$ タンパク質発現量およびPPAR $\alpha$ 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められた。一方で、miR-27b発現量とPPAR $\alpha$ タンパク質発

現量およびPPAR $\alpha$ 翻訳効率との間には有意な逆相関が認められなかった。従って、ヒト肝臓におけるPPAR $\alpha$ の発現制御に対し、miR-27bの寄与は相関解析からは検知できずmiR-21の寄与が大きい可能性が示唆された。しかし、miR-27b過剰発現によりPPAR $\alpha$ タンパク質発現量が減少しただけでなく、内因性のmiR-27bのノックダウンによってPPAR $\alpha$ タンパク質発現量が増加したことから、miR-27bもヒト肝臓中におけるPPAR $\alpha$ の常在的な発現に寄与していると考えられる。これまでにPPAR $\alpha$ の発現制御に関してmiRNAの関与が示唆されつつあるが、ヒト肝臓における常在的なPPAR $\alpha$ の発現とmiRNAの関係については不明であった。本研究により、ヒト肝臓における常在的なPPAR $\alpha$ 発現調節機構に対して、miRNAによる翻訳抑制機構を新たに提唱することが出来た。miR-21およびmiR-27bによるPPAR $\alpha$ の発現制御は、ヒト肝における脂質代謝や異物代謝を変動させる因子であると考えられる

<参考文献>

Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S and Allgayer H (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27: 2128-2136.

Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenfoer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z and Einat P (2004) MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14: 2486-2494.

Barbier O, Duran-Sandoval D,

- Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart JC and Staels B (2003b) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem* **278**: 32852-32860.
- Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, Fontaine C, Torra P, Duhem C, Kosykh V, Fruchart JC, Guillemette C and Staels B (2003a) The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  target gene. *J Biol Chem* **278**: 13975-13983.
- Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart JC, Staels B and Glineur C (2004) The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Mol Endocrinol* **18**: 1906-1918.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, and Bartel DP (2009) Most mammalian miRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105.
- Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S and Henrion-Caude A (2008) miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* **48**: 648-656.
- Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P and Tsezou A (2008) Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE* **3**: e3740.
- Jennewein C, Knethen AV, Schmid T and Brune B (2010) MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) mRNA destabilization. *J Biol Chem* **285**: 11846-11853.
- Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG and Meier CA (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* **274**: 10505-10510.
- Kersten S, Desvergne B and Wahli W (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**: 421-424.
- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Rev Mol Cell Biol* **6**: 376-385.
- Komagata S, Nakajima M, Takagi S, Mohri T, Taniya T and Yokoi T (2009) Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol Pharmacol* **76**: 702-709.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854.
- Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W and Auwerx J (1996) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* **271**: 1764-1769.
- Lewis BP, Burge CB and Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
- Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J and Yun Z (2009) A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* **276**: 2348-2358.
- Lytel JR, Yario TA and Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 9667-9672.
- Marquez RT, Wendlandt E, Galle CS, Keck K and McCaffrey AP (2010) MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF- $\kappa$ B signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G535-G541.