

- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B and Auwerx J (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR α and PPAR γ activators. *J Biol Chem* **272**: 28210-28217.
- 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.
- Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S and Yokoi T (2009) MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer* **125**: 1328-1333.
- Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki A and Yokoi T (2010) Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol* **79**: 1045-1052.
- Ng VY, Huang Y, Reddy LM, Falck JR, Lin ET and Kroetz DL (2007) Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Drug Metab Dispos* **35**: 1126-1134.
- Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blueloch RH, Frandsen NM and Willenbring H (2010) MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* **51**: 1735-1743.
- Takagi S, Nakajima M, Mohri T and Yokoi T (2008) Post-transcriptional regulation of human pregnane Xreceptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* **283**: 9673-9680.
- Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T and Yokoi T (2009) MicroRNAs regulate hepatocyte nuclear factor 4 α , modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J Biol Chem* **285**: 4415-4422.
- Tay Y, Zhang J, Thomson MA, Lim B and Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **23**: 1124-1128.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T and Yokoi T (2006) MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* **66**: 9090-9098.
- van Raalte DH, Li M, Pritchard PH and Wasan KM (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) - α : A pharmacological target with a promising future. *Pharm Res* **9**: 1531-1538.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE and Galas DJ (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4402-4407.
- Wightman B, Ha I and Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855-862.
- Zheng L, Lv GC, Sheng J and Yang YD (2010) Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR- α expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD. *J Gastroenterol Hepatol* **25**: 156-163.
- Zhu S, Si ML, Wu H and Mo YY (2007) MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* **282**: 14328-14336.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsuhiko Kida, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Yuki Oda, Shingo Takagi, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. PPAR α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm. Res.*, in press.

2. 学会発表

- Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko Kida, Tatsuki Fukami,

- and Tsuyoshi Yokoi. Human hepatocyte nuclear factor 4 α is regulated by miR-24. 3rd Asia Pacific ISSX Meeting, 2009.5.10-12, Bangkok, Thailand.
2. Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko Kida, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. miR-24 regulates human HNF4 α expression. 16th International Conference on Cytochrome P450, 2009.6-24-25, Nago, Japan. Oral & Poster
3. Katsuhiko Kida, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Yuki Oda, Shingo Tagagi, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Human PPAR α is regulated by miR-21. 9th International ISSX Meeting. 2010.9.4-8 Istanbul-Tukey
- H. 知的財産権の出願・登録
該当なし。

ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御

分担研究者 中島 美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

ヒト CYP2E1 は薬理学的および毒性学的に極めて重要な P450 分子種の 1 つである。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節に miRNA が関与するか検討した。CYP2E1 mRNA の 3'-UTR に miR-378 が結合する領域 (MRE378) を見出し、MRE378 に対して miR-378 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。Pre-miR-378 の導入により、MRE378 を含むプラスミドにおいてルシフェラーゼ活性の低下が認められたことから、MRE378 が miR-378 により認識され、発現制御に機能的に働いていることが示唆された。また、3'-UTR を含むまたは含まない CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞を構築することで、CYP2E1 タンパク質発現量への miR-378 の影響を検討した。3'-UTR を含む CYP2E1 安定発現細胞株においてのみ、pre-miR-378 導入による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が認められた。このことから、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に重要な役割を果たしていることが示された。次に、miR-378 による CYP2E1 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、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 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、また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。未解明であった CYP2E1 の転写後調節機構に対して、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-378 による CYP2E1 の発現制御は、ヒト肝における CYP2E1 発現量の個人差を引き起こす要因の 1 つとして考えられる。

A. 研究目的

薬物代謝反応は、酸化、還元、加水分解の第 I 相反応と抱合の第 II 相反応に分類される。薬物や癌原性物質、環境中の汚染物質などの生体外異物や内因性物

質の第 I 相反応代謝に関わる最も重要な酵素はシトクロム P450 (P450, CYP) である (Nelson et al., 1996)。P450 には多くの分子種が存在し、アミノ酸配列の相同性によりファミリーに分類されている。

主に CYP1、CYP2 および CYP3 ファミリーに属する分子種が薬物や生体外異物の代謝に深く関与する。P450 による代謝反応の多くは薬理的に不活性化物質への変換（解毒）であるが、代謝的活性化により活性代謝物を生成し毒性発現にも関与することが知られている (Gonzalez, 2005)。

CYP2E1 は主に肝臓に発現しており、肺や胎盤においても発現が認められる。CYP2E1 は比較的分子量の小さい化合物を基質とし、アセトアミノフェンやイソニアジドなどの薬物、エタノールやアセトン、四塩化炭素などの有機溶媒や、ニトロソアミン類などの癌原性物質など、数多くの化合物の代謝に関与し (Lu and Cederbaum, 2008)、薬理的だけでなく毒性学的にも極めて重要な P450 分子種の 1 つである。基質となるイソニアジド

やエタノールにより CYP2E1 自身が誘導され、その代謝が促進することが知られている (Bolt et al., 2003)。ヒト P450 分子種のほとんどは、生体外異物や内因性物質により誘導されるが、それは化合物がリガンドとなり核内レセプターを活性化し転写を促進する、という転写レベルでの調節機構によるものである (Dogra et al., 1998; Gonzalez et al., 1993; Honkakoski and Negishi, 2000)。しかし、CYP2E1 の誘導にはそのような核内レセプターは作用しない。CYP2E1 タンパク質の増加には、CYP2E1 mRNA の増加が伴わないと報告されており (Song et al., 1986)、CYP2E1 誘導メカニズムとして、mRNA やタンパク質の安定化などの転写後調節が関与していることが示されている (Song et al., 1987; Roberts et al., 1995)。

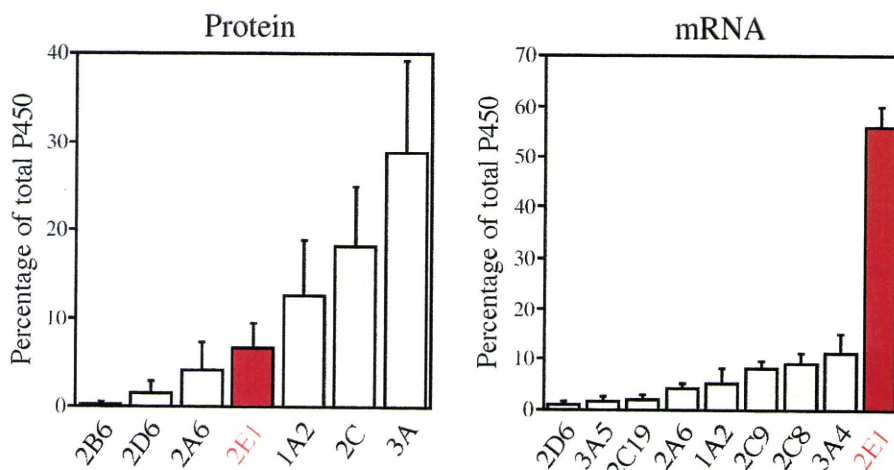


Fig. 1. The relative contents of individual P450 isoforms in human liver. The percentage of each P450 protein represents the mean \pm SD from 60 human liver samples (Shimada et al., 1994) The percentage of each P450 mRNA represents the mean \pm SD from 12 human liver samples (Bièche et al., 2007).

ヒト肝臓中に発現する P450 タンパク質のうち、最も主要なものは CYP3A4 であり、全 P450 発現量の約 30%を占め

ることが広く周知されている (Fig. 1)。次いで、CYP2C (20%) と CYP1A2 (13%) が高く発現し、CYP2E1 は 4 番目に高い

発現を示している (約 7%) (Shimada et al., 1994)。一方、mRNA 発現レベルで評価した場合には、CYP2E1 が最も高く、全 P450 発現量の 56% を占めていることが近年報告された (Bièche et al., 2007)。また Sumida ら (1999) は、ヒト肝サンプル 15 検体を用いた検討により

CYP2E1 mRNA 発現量が、CYP2E1 のプロブ基質であるクロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性と正の相関を示さないことを報告している ($y = 0.000x + 1.744$, $r = 0.036$)。これらの報告から、CYP2E1 の常在的発現にも転写後発現調節メカニズムが関わっていることが考えられる。

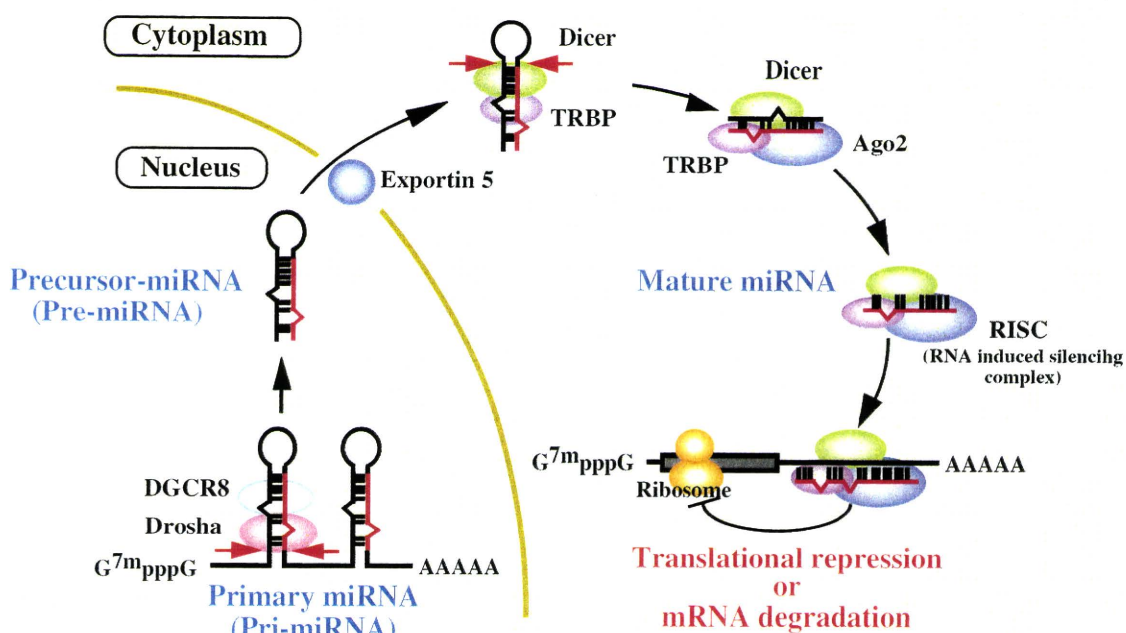


Fig. 2. Proposed mechanism of gene silencing by microRNAs. miRNA genes are transcribed by an RNA polymerase II to generate the primary miRNA (pri-miRNA) transcripts. The initiation step is mediated by the Drosha in the nucleus. The product of the nuclear processing is ~80-nt precursor miRNA (pre-miRNA). 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.

MicroRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない 20~25 塩基程度の内 在性の低分子 RNA である。初めに線虫で 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

ことが明らかとなり、遺伝子の転写後調 節に関わる重要因子の 1 つとして考えら れている。Fig. 2 は miRNA の成熟過程を 示す。miRNA の前駆体である primary miRNA (pri-miRNA) 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 によって転写された後 (Kim, 2005)、核内で Droscha 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。Pre-miRNA は、Exportin 5 により核内から細胞質へと輸送され、さらに Dicer によって 20~25 塩基の miRNA duplex に切り出される。その後、1 本鎖 RNA となった成熟 miRNA (mature miRNA) は RISC (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、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、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 (Bartel, 2004)。

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、その制御の異常により癌などの疾患が引き起こされると考えられている。これまでヒトにおいて 700 種類以上の miRNA が報告され、年々この数は増加してきており、それぞれの miRNA の標的 mRNA の予測も可能となっている (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。ヒト mRNA の 30%程度が miRNA によって制御されている可能性があること示唆されている (Lewis et al., 2005; Xie et al., 2005) 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。

これまで miRNA に関する研究は、癌分野において活発に行なわれている。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、癌の種類や進

行度によって発現量が変化すること (Calin et al., 2004; Lu et al., 2005) が明らかとなり、miRNA と発癌との密接な関連が示唆されている。一方、薬物動態分野においては、2006 年に CYP1B1 が miRNA によって発現調節されることが当研究室において初めて示された (Tsuchiya et al., 2006)。この研究により、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 位水酸化を担う CYP1B1 が miR-27b によって翻訳抑制を受けることが明らかにされた。その後、CYP3A4 などの薬物代謝酵素の誘導に関する pregnane X receptor (PXR) が miR-148a により翻訳抑制されること (Takagi et al., 2008)、CYP24 とその誘導的発現に関する 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) も当研究室において明らかになった。また Pan ら (2009a) は、miR-27b が CYP3A4 を制御しており、また VDR を制御することで間接的にも CYP3A4 の発現を負に調節していることを最近報告している。P450 のみならず、トランスポーターに関しても近年いくつかの報告がなされている (Kovalchuk et al., 2008; To et al., 2008; Pan et al., 2009b)。このように miRNA は薬物代謝酵素やその発現に関する転写因子、トランスポーターの発現調節にも関与することが次第に明らかとなっており、薬物動態分野においても発現変動に関与する重要な因子であると考えられる。

本研究では、CYP2E1 の転写後調節

メカニズムとして miRNA の関与の可能性を検討した。最初に、コンピュータ解析により CYP2E1 の 3'-UTR に相補的な miRNA を探索した。miRBase Target database (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) を用いた解析においては、miR-378, -607, -223, -105 など計 24 miRNAs が候補として挙げられた。Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) を用いた解析では 6 miRNAs が挙げられ、両アルゴリズムに共通して予測された miRNA

は miR-378 と miR-607 の 2 つであった。miR-607 は肝臓での発現が非常に低く、一方、miR-378 は肝臓で発現が認められ、CYP2E1 mRNA と最も高い相同性 (score 18.31 and energy -16.95) を示したことから、本研究では miR-378 に注目した。Fig. 3 は CYP2E1 mRNA の 3'-UTR に見出された miR-378 が結合し得る領域 (miR-378 recognition element: MRE378) を示す。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節における miRNA の役割を明らかにすることを目的とした。

Human CYP2E1 mRNA

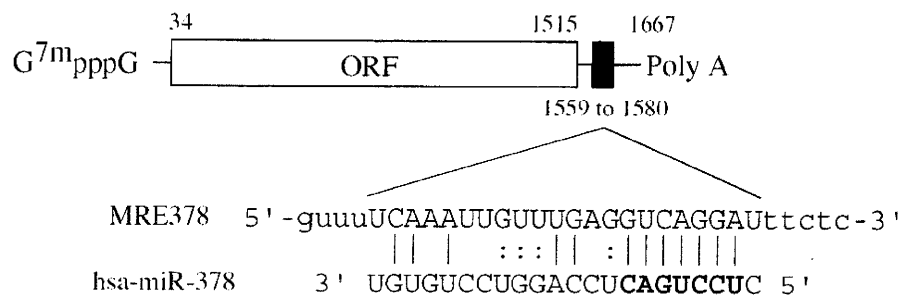


Fig. 3. Schematic representation of human CYP2E1 mRNA and the predicted target sequence of miR-378. The numbering refers to the 5' end of mRNA as 1, and the coding region is from +34 to +1515. MRE378 (from +1559 to +1580) is located on the 3'-UTR of human CYP2E1 mRNA. *bold letters*, seed sequence.

B. 研究方法

ヒト胚腎由来 HEK293 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。10% FBS、4.5 g/L グルコース、10 mM HEPES を含む DMEM で 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

作製したレポータープラスミドの概略を Fig. 4 に示す。pGL3/3xMRE は MRE378 を正方向に 3 つ、pGL3/3xMRE-Rev は逆方向に 3 つタン

デムに有している。また、pGL3/UTR1 および pGL3/2xUTR1 は CYP2E1 の MRE378 を含む 3'-UTR 断片の一部 (+1549 から+1627) をそれぞれ 1 つまたは 2 つ有しており、pGL3/UTR2 は MRE378 を含まない 3'-UTR 断片 (+1628 から+1657) を 1 つ有している。pGL3/c-378 は miR-378 に完全に相補的な配列を有しており、miR-378 に対する positive control として用いた。

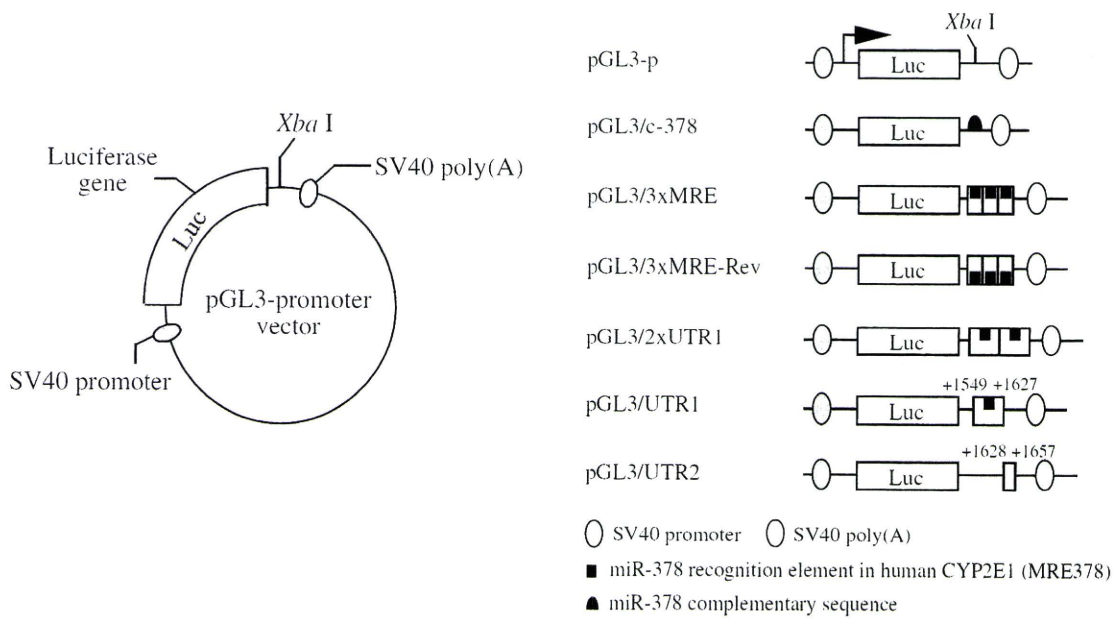


Fig. 4. Schematic representation of the luciferase reporter gene constructs. Various target fragments were inserted at the *Xba* I site, downstream of the luciferase gene in the pGL3-promoter (pGL3p) vector.

ヒト CYP2E1 の翻訳領域 (coding region) を含む発現プラスミド pTARGET/2E1 を作製した (Fig. 5B)。CYP2E1 の翻訳領域と 3' -UTR を含む発現プラスミド pTARGET/2E1+UTR (Fig. 5A) は以下の方法で作製した。I-2-3-2 で増幅させた PCR 産物 (+762 から+1667) を

pTARGET ベクターに T4 ligase を用いて組み込み、DH5a コンピテントセルに形質転換した。このプラスミドと pTARGET/2E1 プラスミドを組み換えるために、*Xho* I と *EcoR* V で同時に消化し、目的の DNA 断片を精製後、T4 ligase を用いて組み込み、DH5a コンピテントセルに形質転換した。

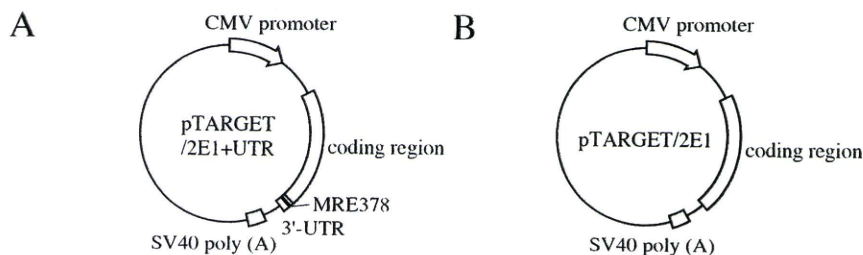


Fig. 5. Schematic representation of the CYP2E1 expression plasmids including (A) or excluding (B) 3'-UTR of CYP2E1.

C. 研究結果

C-1 ルシフェラーゼアッセイによる MRE の機能評価

HEK293 細胞に CYP2E1 の MRE378 を含む各種プラスミドを導入し、ルシフェ

レーザーアッセイにより pre-miR-378 の影響を検討した (Fig. 6)。Pre-miR-378 の導入により pGL3/c-378 ではコントロールの 35%まで活性が低下し、導入した pre-miRNA が細胞内で働いていることが確認された。pGL3-p および pGL3/3xMRE-Rev では活性の上昇が認められたが、pGL3/3xMRE においてコン

トロールの 27%まで活性の低下が認められた。さらに、pGL3/UTR1 および pGL3/2xUTR1 でも、pre-miR-378 の導入により活性の低下が認められたが、MRE を含まない pGL3/UTR2 では活性の上昇が認められた。以上の結果より MRE378 が機能的であることが示唆された。

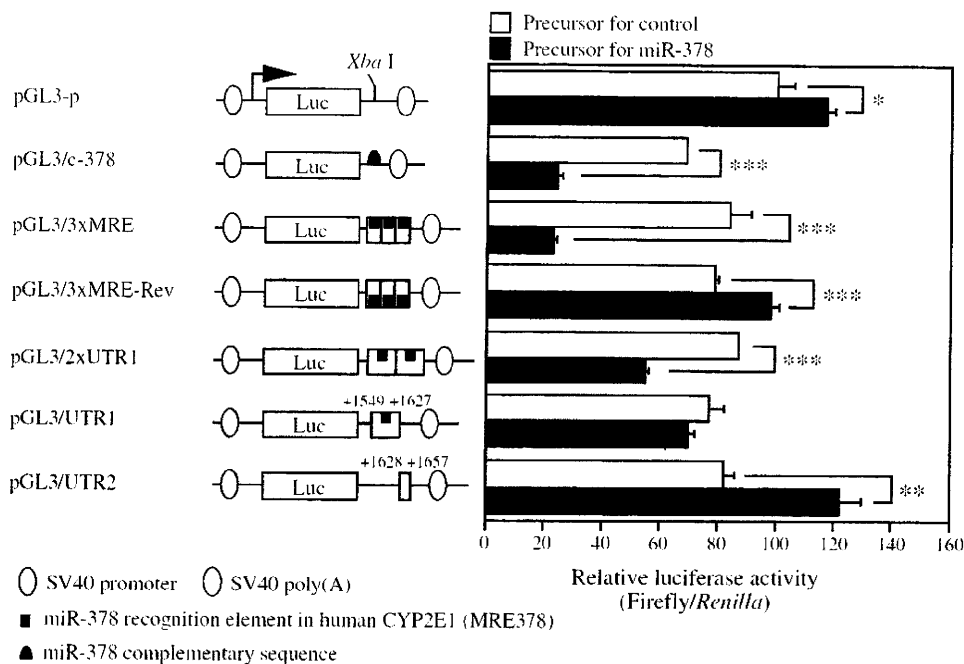


Fig. 6. Luciferase assays using the reporter plasmids containing various fragments downstream of the firefly luciferase gene. The reporter plasmids (170 ng) were transiently transfected with phRL-TK plasmid (30 ng) and 20 nM precursors for miR-378 or negative control #1 (control) into HEK293 cells. The firefly luciferase activity for each construct was normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3-p plasmid. Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control.

C-2 ルシフェラーゼ活性に及ぼす pre-miR-378 の濃度依存的な影響

3種のプラスミド pGL3-p、pGL3/3xMRE および pGL3/c-378 を用い、導入する pre-miR-378 の濃度を変化させ、同様に

ルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 7)。pGL3/3xMRE および pGL3/c-378 において、pGL3-p と比較して、1 nM で有意な活性の低下が認められ、さらに 5 nM, 25 nM と増大させることにより、濃度依存的な活性の低下が認められた。

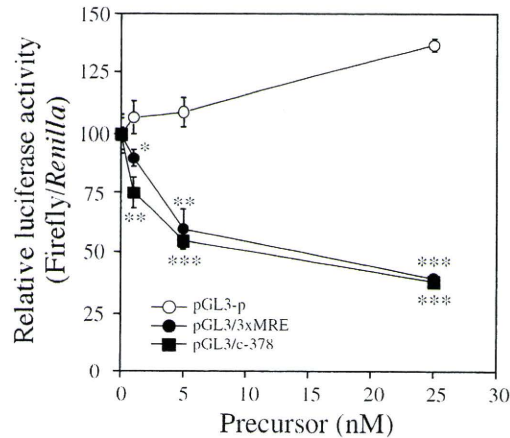


Fig. 7. Effects of the precursor for miR-378 on the luciferase activity. The precursors for miR-378 (1, 5, 25 nM) were transfected with the reporter plasmids (170 ng) and pRL-TK plasmid (30 ng) into HEK293 cells. The firefly luciferase activity for each construct was normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages relative to the activity without precursor. Each points represents the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with pGL3-p.

C-3 CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞における CYP2E1 タンパク質の発現量に及ぼす pre-miR-378 の影響

パク質発現変動の CYP2E1 酵素活性を指標とした評価

HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞に pre-miRNA を導入し、CYP2E1 のタンパク質発現量に及ぼす miR-378 過剰発現の影響を検討した (Fig. 8)。HEK293/2E1+UTR 細胞において、pre-miR-378 導入により、CYP2E1 タンパク質発現量はコントロールに比べ有意に低下した (60%)。しかし、HEK293/2E1 細胞においては、CYP2E1 タンパク質発現量の変動は認められなかった。従って、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に役割を果たしていることが示された。

Pre-miR-378 による CYP2E1 タンパク質の発現量の変動を、CYP2E1 のプロローブ基質であるクロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性を測定することにより評価した。HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞に pre-miRNA を導入し、クロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性を測定した (Fig. 9)。

HEK293/2E1+UTR 細胞において、pre-miR-378 導入により、クロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性はコントロールに比べ有意に低下が認められた (70%) が、HEK293/2E1 細胞において変動は認められなかった。従って、酵素活性を評価することによっても、pre-miR-378 による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が示された。

C-4 Pre-miR-378 による CYP2E1 タン

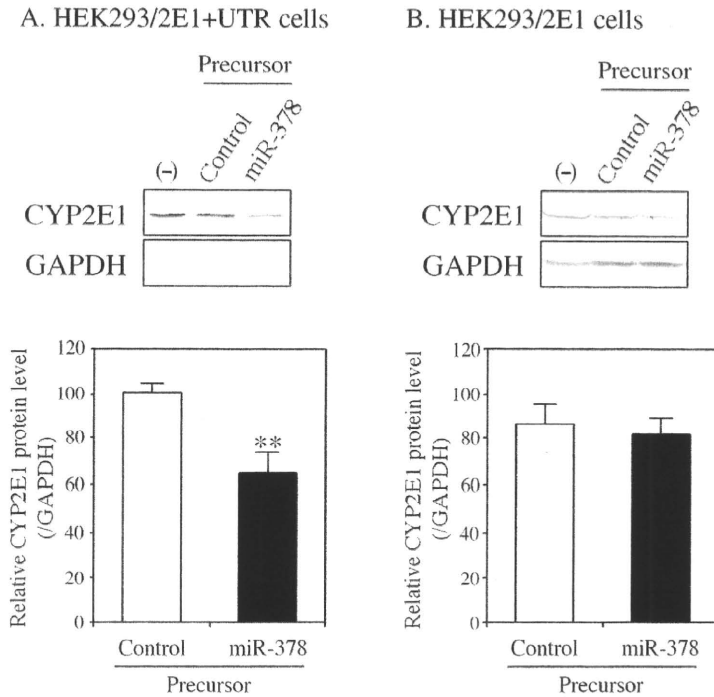


Fig. 8. Effects of overexpression of miR-378 on CYP2E1 protein level. The CYP2E1 protein levels in HEK293/2E1+UTR (A) and HEK293/2E1 (B) cells 48 hr after the transfection of 10 nM precursors for miR-378 or negative control #1 (control). The CYP2E1 protein levels were determined by Western blot analysis and were normalized with the GAPDH protein level. Values are expressed as percentages relative to no transfection (-). Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$, compared with the precursor for control.

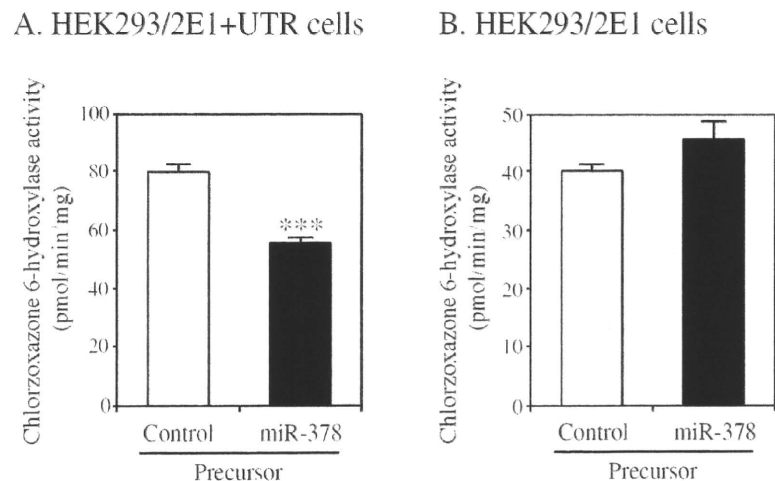


Fig. 9. Effects of overexpression of miR-378 on the CYP2E1 expression. Enzyme activity of CYP2E1 in HEK293/2E1+UTR (A) and HEK293/2E1 (B) cells 48 hr after the transfection of 10 nM precursors for miR-378 or control. Chlorzoxazone 6-hydroxylase activity was measured using the cell homogenate at a substrate concentration of 500 μ M. The control activities in homogenates from non-treated HEK293/2E1+UTR (A) and HEK293/2E1 (B) cells were 70.5 ± 8.5 and 41.9 ± 1.0 pmol/min/mg, respectively. Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments. *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control.

また、HEK293/2E1+UTR 細胞における酵素活性への pre-miR-378 の影響を、導入する pre-miR-378 の濃度を变化させて検討した (Fig. 10)。Precursor 濃度 0.1 から 10 nM の間において濃度依存的な活

性の低下が認められたが、50 nM ではさらなる活性の低下は認められなかった。以降の検討では、precursor の導入濃度を 10 nM とした。

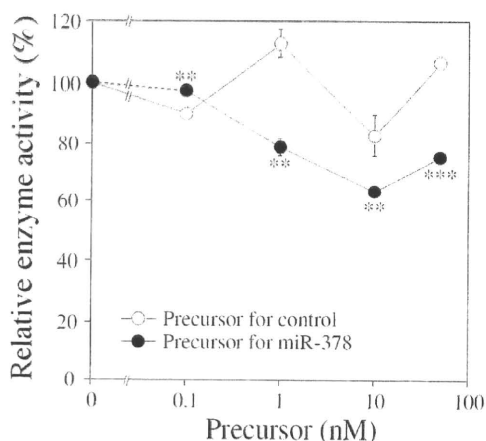


Fig. 10. Effects of the precursor for miR-378 on the CYP2E1 expression. The precursors for miR-378 or negative control #1 (0.1, 1, 10, 50 nM) were transfected into HEK293/2E1+UTR cells. After 48 hr, cell homogenates were prepared and chlorzoxazone 6-hydroxylase activity was measured. Values are expressed as percentages relative to the activity without precursor. Each points represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control.

C-5 CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞における CYP2E1 mRNA の発現量および安定性に及ぼす pre-miR-378 の影響

miR-378 による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が、mRNA の低下によるものか調べるため、HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞に pre-miRNA を導入し、CYP2E1 mRNA 発現量を real-time RT-PCR により評価した (Fig. 11A, B)。HEK293/2E1+UTR 細胞において、CYP2E1 mRNA 発現量はコントロールに比べ pre-miR-378 導入により有意に低下した (51%)。また HEK293/2E1 細胞においても、pre-miR-378 導入による CYP2E1 mRNA 発現量の有意な低下が認められた (55%)。従って、3'-UTR の有無に関わらず、miR-378 により CYP2E1 mRNA 発現量が低下することが明らかに

なった。

miR-378 による CYP2E1 mRNA 発現量の低下が、mRNA 分解の亢進によるものかどうか調べるため、CYP2E1 mRNA の安定性に及ぼす pre-miR-378 の影響を検討した。転写阻害剤である α -アマニチンを処置し、CYP2E1 mRNA の発現変動を評価した (Fig. 11C, D)。HEK293/2E1+UTR 細胞では、CYP2E1 mRNA の半減期は 5.6 hr であり、pre-miR-378 導入による変化は認められなかった。また、HEK293/2E1 細胞では CYP2E1 mRNA の半減期は、HEK293/2E1+UTR 細胞の半減期よりも長く 7.1 hr であったが、pre-miR-378 導入による変化は認められなかった。従って、miR-378 は CYP2E1 mRNA の分解には影響しないことが示された。

HEK293/2E1+UTR cells

HEK293/2E1 cells

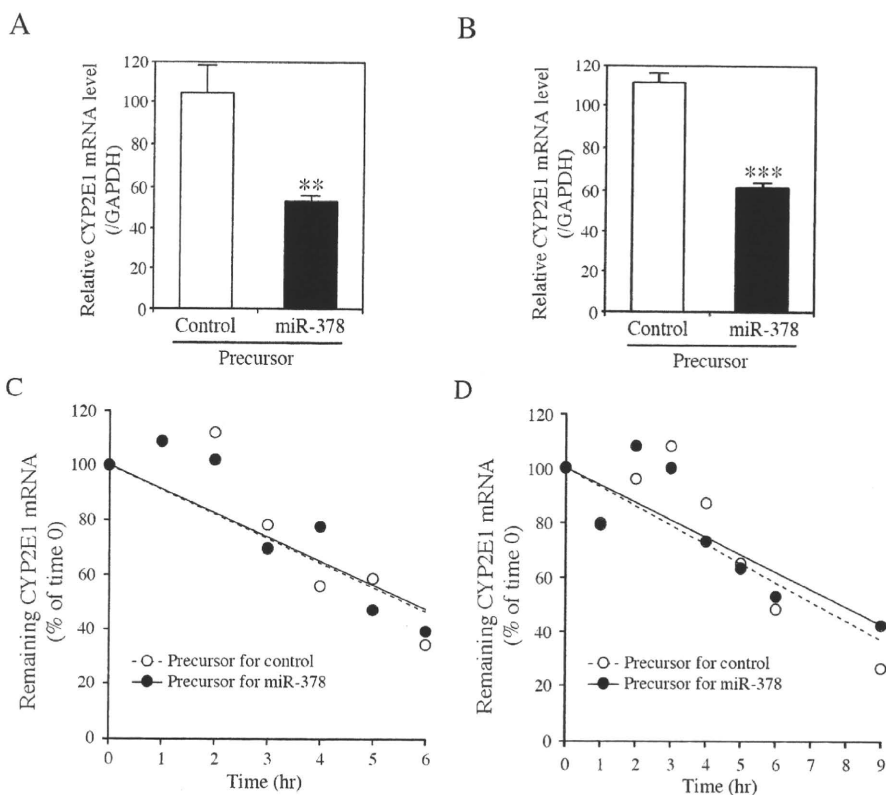


Fig. 11. Effects of overexpression of miR-378 on the CYP2E1 mRNA level and its stability. The CYP2E1 mRNA levels in HEK293/2E1+UTR (A) and HEK293/2E1 (B) cells 48 hr after the transfection of 10 nM precursors for miR-378 or negative control #1 (control). The CYP2E1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA. Values are expressed as percentages relative to no transfection. Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control. Stability of the CYP2E1 mRNA in the HEK293/2E1+UTR (C) and HEK293/2E1 (D) cells. The cells transfected with 10 nM precursors for miR-378 or negative control #1 (control) were simultaneously treated with 2 μ g/mL α -amanitin. Total RNA was prepared at the indicated times. The CYP2E1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA. The amounts of mRNA at time 0 (the time of addition of α -amanitin) in each group (miR-378 or control treated) were assigned a value of 100%, and all other values at different time points were expressed as percentages of the time 0 value. Data are the mean of two independent experiments.

C-6 CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞における CYP2E1 タンパク質の安定性に及ぼす pre-miR-378 の影響

miR-378 による CYP2E1 タンパク質

発現量の低下が、タンパク質分解の亢進によるものかどうか調べるため、CYP2E1 タンパク質の安定性に及ぼす

pre-miR-378 の影響を検討した。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド

を処置し、CYP2E1 タンパク質の発現変動を評価した (Fig. 12)。HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞において、pre-miR-378

導入による CYP2E1 タンパク質の分解への影響は認められなかった。従って、miR-378 はタンパク質の安定性に影響している訳ではないことが示された。

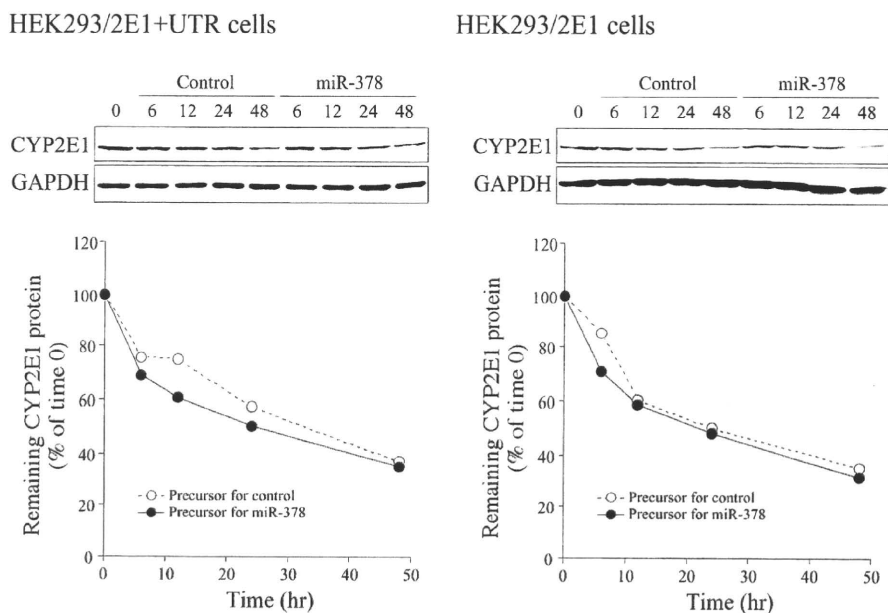


Fig. 12. Effects of overexpression of miR-378 on the stability of CYP2E1 protein. The HEK293/2E1+UTR and HEK293/2E1 cells were simultaneously treated with 100 μ M cycloheximide and 10 nM precursors for miR-378 or negative control #1 (control). Cell homogenates were prepared at 6, 12, 24 and 48 hr later and the CYP2E1 protein levels were determined by Western blotting and normalized with GAPDH protein. The values were expressed as percentages of the time 0 value. The reproducibility was confirmed by two independent experiments.

C-7 その他の miRNA の CYP2E1 タンパク質発現量に及ぼす影響

コンピュータ解析によって候補として予測された他の miRNA についても検討した。複数の miRNA の中から、CYP2E1 mRNA と比較的高い相同性を示した miRNA である miR-105 (score 16.97 and energy -15.39) と miR-223 (score

17.51 and energy -16.47) について検討した。HEK293/2E1+UTR 細胞にこれらの pre-miRNA を導入し、CYP2E1 のタンパク質発現量に及ぼす影響を検討した (Fig. 13)。その結果、どちらも CYP2E1 タンパク質発現量への影響を及ぼさないことが示された。従って、CYP2E1 の発現調節には miR-378 が特異的に関与していると考えられた。

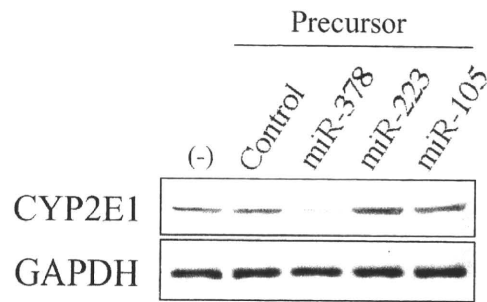


Fig. 13. Effects of overexpression of miRNAs on CYP2E1 protein level. The CYP2E1 protein levels in HEK293/2E1+UTR cells 48 hr after the transfection of 10 nM precursors for miR-378, miR-223, miR-105 or negative control #1 (control) were determined by Western blot analysis and normalized with the GAPDH protein level.

C-8. ヒト肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性との関係

25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA の発現量には、約 10 倍の個人差が認められた。CYP2E1 タンパク質の発現量では、最も高値を示したサンプル (199.7 pmol/mg) と最も低値を示したサンプル (27.7 pmol/mg) を比較すると約 7 倍の個人差が認められた。CYP2E1 の指標酵素活性として頻用されるクロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性では、最も高値を示したサンプル (1.49 nmol/min/mg) と最も低値を示したサンプル (0.05 nmol/min/mg) を比較すると約 30 倍の個人差が認められた。CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性の相関について検討した結果を Fig. 14 に示す。CYP2E1 タンパク質発現量は CYP2E1 mRNA 発現量と有意な逆相関を

示した ($r = -0.55, p < 0.05$) ことから、転写後調節の関与が支持された。一方、CYP2E1 タンパク質発現量と酵素活性の間には有意な正の相関が認められた ($r = 0.78, p < 0.0001$)。

C-9. ヒト肝における mature miR-378 と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との関係

25 検体のヒト個人肝における mature miR-378 の発現量には、約 18 倍の個人差が認められた。CYP2E1 タンパク質発現量を mRNA 発現量で除した値を翻訳効率として算出した。mature miR-378 発現量は、CYP2E1 タンパク質発現量 ($r = -0.47, p < 0.05$) と、さらに CYP2E1 翻訳効率 ($r = -0.53, p < 0.01$) と有意な逆相関を示した (Fig. 15)。従って、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。

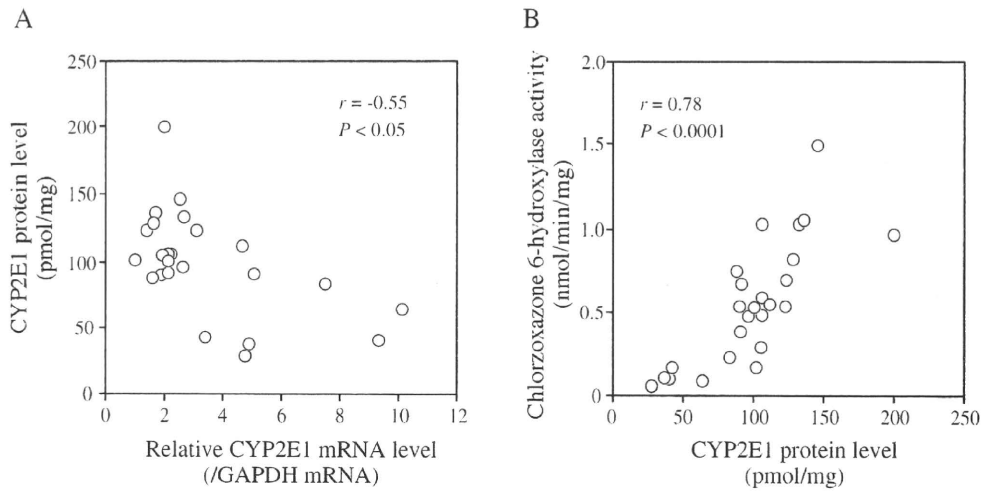


Fig. 14. Relationship between the CYP2E1 mRNA and protein levels (A), the CYP2E1 protein levels and chlorzoxazone 6-hydroxylase activities (B) in human livers. The CYP2E1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with GAPDH mRNA levels. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. The absolute CYP2E1 protein levels were determined by Western blot analysis. The chlorzoxazone 6-hydroxylase activity was measured using human liver microsomes at a substrate concentration of 500 μ M. Data are the mean of two independent experiments.

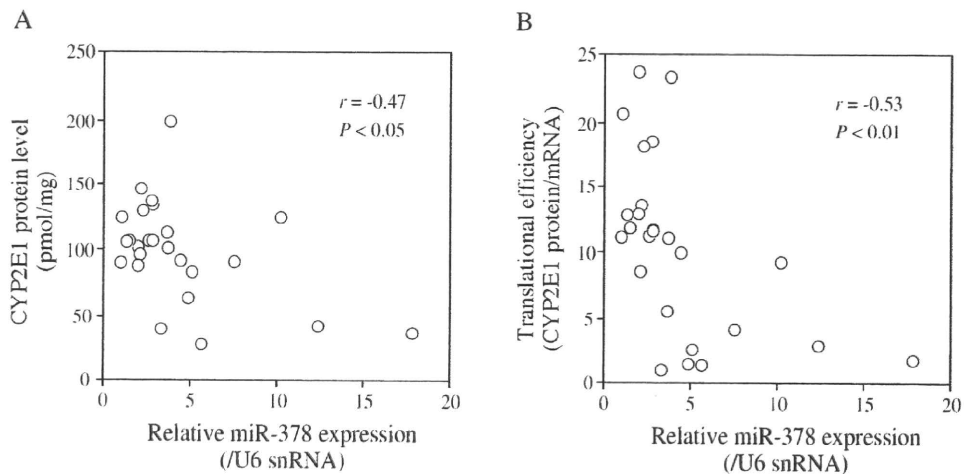


Fig. 15. Relationship between the miR-378 and CYP2E1 protein levels (A) or translational efficiency of CYP2E1 (CYP2E1 protein/mRNA ratio) (B) in human livers. The expression levels of miR-378 and CYP2E1 mRNA were determined by real-time RT-PCR and normalized with U6 snRNA levels and GAPDH mRNA levels, respectively. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. The absolute CYP2E1 protein levels were determined by Western blot analysis. Data are the mean of two independent experiments.

C-10. ヒト肝における mature

miR-378 と CYP2E1 mRNA 発現量の
関係

mature miR-378 と CYP2E1 mRNA の
相関について検討した結果を Fig. 16 に示

す。両者の間に逆相関が認められなかった ($r = 0.31$, $p = 0.13$) ことから、miR-378 の CYP2E1 mRNA の分解への影響ばかりでなく、Fig. 11 より示唆された CYP2E1 の転写活性への影響の可能性も

低いと考えられる。このことより、miR-378 は主に翻訳抑制に寄与していることが示唆され、Fig. 15 の結果は支持されると考えられる。

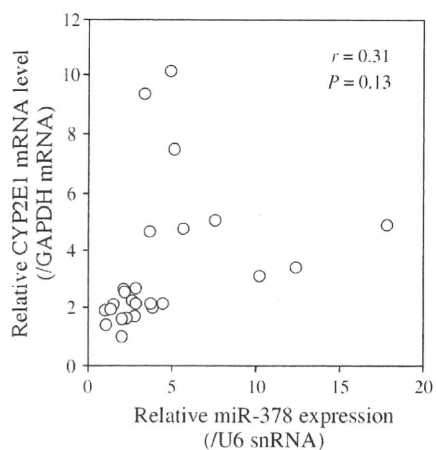


Fig. 16. Relationship between the miR-378 and CYP2E1 mRNA levels in human livers. The expression levels of miR-378 and CYP2E1 mRNA were determined by real-time RT-PCR and normalized with U6 snRNA levels and GAPDH mRNA levels, respectively. The values represent the levels relative to that of the lowest sample. Data are the mean of two independent experiments.

D. 考察

CYP2E1 の 3'-UTR に相補的な miRNA をコンピュータ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 CYP2E1 mRNA と最も高い相同性を示し、また肝臓で発現している miR-378 に注目して検討した。ヒト CYP2E1 mRNA の 3'-UTR の長さは 152 塩基対であるが、終始コドンから 44 塩基離れた位置に miR-378 の結合領域 (MRE378) が存在していた (Fig. 3)。miRNA の 5'末端から 2~8 塩基までは 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)。CYP2E1 の MRE378 は miR-378 の seed sequence と完全に一致していたため、miR-378 が CYP2E1 の発現調節において機能的に働くことが可能であったと考えられる。

HEK293 細胞に pre-miR-378 を導入して miR-378 を過剰発現させたところ、MRE378 を含むプラスミドにおいてルシフェラーゼ活性の有意な低下が認められた (Fig. 6)。Pre-miR-378 を導入した際、pGL3-p、pGL3/3xMRE-Rev および pGL3/UTR2 プラスミドでは、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇するという現象が認められた。これらプラスミドはいずれも MRE378 を正方向に含まないものであり、活性上昇の原因としては、miR-378 が SV40 プロモーターに作用することにより直接的にルシフェラーゼ活性を上昇させている、もしくはルシフェラーゼ活

性に対して抑制的に働く何らかの因子に作用して間接的に活性を上昇させている可能性が考えられた。一般的に 1 つの miRNA は 200 以上の遺伝子を標的とするといわれている (Yang et al., 2008)。そのため後者の可能性も考えられる。

pGL3/UTR1 プラスミドにおいてルシフェラーゼ活性低下の程度は小さく、有意差が認められなかったのは、上述のように今回の評価系では MRE378 を介した影響を過小評価している可能性があるためと考えられる。しかし、MRE378 を複数有する pGL3/3xMRE と pGL3/2xUTR1 プラスミドではルシフェラーゼ活性の有意な低下が認められたことから、MRE378 が miR-378 により認識され、発現制御に機能的に働いていることは確かと考えられる。

HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞を用いて pre-miR-378 の CYP2E1 タンパク質発現量への影響を検討した結果、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 発現抑制に役割を果たしていることが示された。miR-378 が CYP2E1 mRNA の翻訳を抑制しているか、mRNA の分解を亢進しているのかを調べるため、CYP2E1 mRNA の発現量に及ぼす pre-miR-378 の影響を検討した (Fig. 11)。どちらの細胞においても CYP2E1 mRNA 発現量の有意な低下が認められ、pre-miR-378 は CYP2E1 mRNA に対して 3'-UTR 非依存的に影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、mRNA の安定性には影響しなかったことから、転写活性の低下が 1 つの

原因と考えられた。本検討は、発現系を用いた実験系であるため、pTARGET ベクターが有する CMV プロモーター活性に miR-378 が作用した可能性が考えられた。これを検証するため、同じ発現ベクターを用いた他の遺伝子の発現系として、当研究室で以前作製された HEK293/CYP2A6、HEK293/UGT1A3、HEK293/UGT1A4 細胞の 3 種類を用いた検討を行なった。Fig. 11 と同様に pre-miR-378 を導入して 48 時間後 RNA を回収し、それぞれの mRNA 発現量を real-time RT-PCR で定量したが、miR-378 導入による mRNA の低下は認められなかった (data not shown)。従って、miR-378 は pTARGET ベクターの転写活性に影響している訳ではないことが示された。CYP2E1 mRNA 低下の原因については更なる解析が必要である。しかし、3'-UTR を含まない HEK293/CYP2E1 細胞では、miR-378 過剰発現による CYP2E1 タンパク質発現量に影響を示さなかった (Fig. 8) ことから、翻訳を阻害することが miR-378 の主要なメカニズムと考えられる。

CYP2E1 mRNA の安定性の検討において、CYP2E1 mRNA の半減期は HEK/2E1 細胞よりも HEK293/2E1+UTR 細胞の方が短いことが明らかになった。3'-UTR の存在が mRNA の安定性を低下させ、分解が亢進されると予想されるものの、その理由は不明である。3'-UTR に結合して mRNA の安定性を低下させる heterogeneous nuclear ribonucleic protein (hnRNP) D /

AUF1 や tristetraprolin などの RNA 結合タンパク質がいくつか報告されている (Bolognani and Perrone-Bizzozero, 2008) が、ヒト CYP2E1 mRNA に結合するかどうかは不明であり、今後の課題である。

CYP2E1 mRNA の翻訳領域はヒトと比較してラットとマウスでアミノ酸相同性がどちらも約 80% 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 152, 130, 258 塩基対と短い特徴は共通しているものの、塩基配列の相同性は低い。mature miR-378 の塩基配列は、ヒト、ラット、マウスで完全一致しているが、MRE378 はヒトにしか存在せず、miR-378 による CYP2E1 発現調節はヒト特異的と考えられる。ヒト以外の種では、他の miRNA が CYP2E1 の発現調節に関わっている可能性もあり、種ごとに検討する必要がある。

本章では、miR-378 による CYP2E1 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、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 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、これは過去の報告 (Sumida et al., 1999) と一致するものであり、転写後調節の関与が支持された。また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の

常在的な発現に寄与していることが示唆された。CYP2E1 の誘導的な発現には、mRNA やタンパク質の安定性の変化、すなわち、転写後および翻訳後調節が関わっていると認識されてきた (Song et al., 1987; Roberts et al., 1995)。本研究では、常在的な CYP2E1 発現に及ぼす miR-378 の関与は示唆されたが、化学物質による CYP2E1 の誘導発現への miR-378 の関与を明らかにすることは、今後の課題である。

25 検体のヒト個人肝において、mature miR-378 発現量には 18 倍の個人差が認められた。miR-378 発現量の個人差を解析した初めての報告となる。しかし、miR-378 の発現調節機構に関してはまだ明らかにされていない。miRNA は intergenic, intronic, exonic に分類され、miR-378 はヒト 5 番染色体上の *peroxisome-proliferator-activated receptor-γ co-activator 1β (PGC1β)* 遺伝子のイントロン 1 にコードされている intronic miRNA である。このことから、miR-378 の発現は PGC1β のプロモーターの調節下にあり PGC1β の発現と協調している可能性が考えられる。興味深いことに、ヒトやマウスにおける PGC1β の発現は糖尿病や肥満において低下することが報告されており (Crunkhorn et al., 2007; Patti et al., 2003)、また、ラット初代培養肝細胞にインスリンを処置すると PGC1β mRNA の発現が誘導されることが示されている (Liu et al., 2009)。一方、CYP2E1 の発現は糖尿病や肥満において上昇し、インスリンにより低下す

ることがヒトとラットにおいて報告されている (Wang et al., 2003; De Waziers et al., 1995; Woodcroft et al., 2002)。このように PGC1β と CYP2E1 が相反した発現変動を示すという事象は興味深く、PGC1β と miR-378 の発現の相関が確認されれば、本研究結果が示す生理学的意義が支持されると考えられる。

miR-378 は癌抑制遺伝子 *Sufu* (suppressor of fused) と *Fus-1* の発現を抑制し、腫瘍細胞の生存、増殖および血管新生を促進することが報告されている (Lee et al., 2007)。また、miR-378 は vascular endothelial growth factor (VEGF) の 3'-UTR に結合する miR-125a などの miRNA に対して競合することにより、VEGF の発現を促進することが報告されている (Hua et al., 2006)。このように miR-378 は、癌遺伝子として機能することが示されてきたが、本研究では薬物動態分野における miR-378 の新しい機能を明らかにした。

F. 結論

ヒト CYP2E1 は薬理学的および毒性学的に極めて重要な P450 分子種の 1 つである。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節に miRNA が関与するか検討した。CYP2E1 mRNA の 3'-UTR に miR-378 が結合する領域 (MRE378) を見出し、MRE378 に対して miR-378 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。Pre-miR-378 の導入により、MRE378 を含むプラスミドにおい