

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790206

研究課題名(和文)薬物動態制御タンパク質の発現・機能変動における酸化ストレス応答性miRNAの役割

研究課題名(英文)Role of oxidative stress-responsive miRNA on the variation of expression and function of protein regulating pharmacokinetics

研究代表者

池村 健治(Ikemura, Kenji)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70513935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA-145(miR-145)が、小腸のP-糖タンパク質(P-gp)の発現・機能を制御することを明らかにした。この成果は、miRNAによる小腸P-gpの転写後発現調節を示す世界初の報告である。さらに、miRNAは小腸上皮細胞に発現する薬物動態制御タンパク質の発現・機能を制御することから、薬物体内動態及び薬物吸収動態の個体内・個体間変動の要因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that microRNA-145(miR-145) regulates the expression and function of P-glycoprotein(P-gp) in the small intestine. This result provide new insight into the post-transcriptional regulation of intestinal P-gp. Moreover, miRNAs regulate the expression and function of proteins regulating pharmacokinetics in intestinal epithelial cells. Therefore, miRNAs could be significant factors affecting inter- and intra-individual variations in the pharmacokinetics and intestinal absorption of drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：マイクロRNA P-糖タンパク質 薬物体内動態 小腸上皮細胞 転写後調節

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素・薬物トランスポータは、薬物の体内動態、薬効、毒性を規定しており、これらの発現変動機構の解明は、薬物療法の適正化並びに個別化の実現に向け、その変動要因の解明が必要とされる。これまでに遺伝子多型による機能や発現量の変化、転写調節機構が解明されてきた。しかしながら、タンパク質と mRNA 発現量が乖離する報告も認められ、既知の変動因子のみでは説明困難な個体差が依然存在することから、新たな調節機構の解明が必要であった。近年、様々なタンパク質の転写後発現調節における microRNA(miRNA)の重要性が注目されている。また、癌をはじめとする各種疾患において miRNA の発現変動が報告され、これら疾患の共通因子である酸化ストレスにより miRNA の発現変動が認められることから、この発現変動が薬物体内動態の個体内・個体間変動の一因である可能性が考えられる。しかしながら、酸化ストレスによる miRNA 発現変動と薬物代謝酵素・薬物トランスポータ発現変動を結びつけた研究は存在せず、薬物体内動態における役割についての情報はほとんどない。

2. 研究の目的

酸化ストレス応答性 miRNA による薬物代謝酵素・薬物トランスポータの発現調節機構と薬物体内動態変動における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)酸化ストレス起因性肝虚血再灌流(I/R)障害モデルラットの作成

Wistar 系雄性ラット(9週齢)を用い、肝臓の左葉及び中葉への血流を60分間遮断することにより70%部分肝虚血を行い、肝I/R障害モデルラットを作製した。再灌流12時間後に小腸を摘出し、CYP3A活性及びP-糖タンパク質(P-gp)の mRNA 及びタンパク発現量を評価した。

(2)肝I/R後における小腸のmiRNA発現量の網羅的解析

肝I/Rによる小腸miRNA(475種類)の発現変動をmicroarray法で解析し、コントロール(Sham群)と比較し、発現量が1.5倍以上変動がみられるmiRNAを特定した。

(3)MDR1 mRNAの3'非翻訳領域(3'-UTR)に対するmiRNAの予想結合部位の検索

Microarray解析により特定したmiRNAの中から、*in silico*法によりMDR1 mRNAの3'-UTRを標的とするmiRNA候補を抽出した。

(4)MDR1-3'-UTRに対するmiRNAの機能解析

ヒト胎児腎由来のHEK293細胞を用い、ルシフェラーゼ遺伝子の下流にmiRNA予想結合部位を含むMDR1-3'-UTRを組み込んだプラスミド、あるいは予測結合部位を欠損させた欠

損変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

(5)P-gpの発現量・機能に及ぼすmiRNAの役割に関する検討

miRNA阻害剤を培養ヒト腸上皮細胞Caco-2細胞に導入後、P-gp/MDR1の発現量をWestern Blot法及びRT-PCR法、輸送活性をRhodamine123(Rho123)の細胞内蓄積量により評価した。

(6)薬物体内動態変動におけるmiRNAの役割に関する調査

小腸上皮細胞に発現する薬物動態制御タンパク質のmiRNAを介した発現制御に関する論文を調査し、薬物吸収動態におけるmiRNAの重要性について調査した。

4. 研究成果

(1)小腸P-gp発現量とCYP3A活性に及ぼす肝I/R障害の影響

肝I/R障害時に、小腸上部特異的にCYP3A活性及びP-gpの発現量が亢進し、免疫抑制薬シクロスポリンAの経口バイオアベイラビリティの顕著な低下を惹起することを明らかにした。また、その調節因子を検索したところ、小腸上部のCYP3A活性の上昇は、内因性胆汁酸を介した転写上昇に起因するが、P-gpをコードするMdr1aおよびMdr1b mRNAの発現量には肝I/R障害の影響は認められず、小腸P-gp発現上昇には何らかの転写後調節機構の関与が示唆された。

(2)肝I/R障害後の小腸P-gpの発現制御機構におけるmiRNAの役割

肝I/R後の小腸では、Shamに比べ10種類のmiRNA発現量が顕著に減少し、4種類のmiRNA発現量の上昇が認められた(表1)。

表1. 肝I/R後の小腸上部におけるmiRNA発現量のマイクロアレイ解析の結果

発現減少		発現上昇	
miRNA名	変化率	miRNA名	変化率
miR-145	0.23	miR-203	1.55
miR-143	0.25	miR-138-2*	1.57
miR-24	0.54	miR-212	1.64
miR-26a	0.56	miR-21	1.78
miR-93	0.58		
LET-7B	0.61		
LET-7D	0.62		
miR-16	0.63		
miR-107	0.64		
miR-23b	0.64		

Cut off 値=1.5

変化が認められたmiRNAの中から、*in silico*解析を行った結果、miR-145のみがヒト、ラットMDR1-3'-UTRに相補的配列を有していた(図1)。

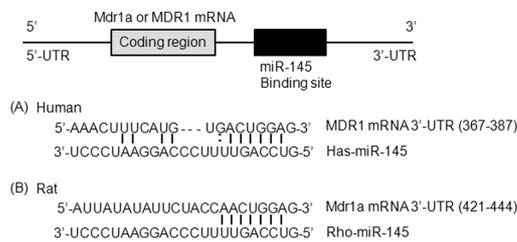


図1 *in silico*解析によるラット Mdr1a 及びヒト MDR1 mRNA の MDR1-3'-UTR 配列に対する miR-145 の予想結合部位

MDR1-3'-UTR 配列を導入した HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、miR-145 を過剰発現させた場合にルシフェラーゼ活性が顕著に低下し(図 2A)、miR-145 結合部位の欠損変異体ではルシフェラーゼ活性の低下が認められなかった。(図 2B)

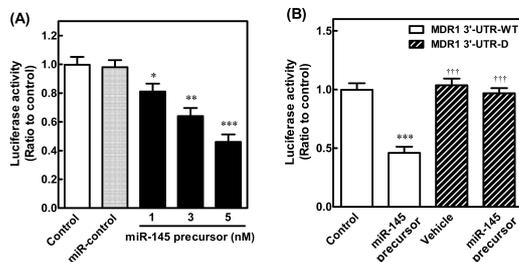


図2 HEK293 細胞における MDR1-3'-UTR に対する miR-145 の機能解析

平均値 ± 標準誤差 (n=3), *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 vs Control
 †††: p<0.001 vs WT+ miR-145 precursor
 WT:野生型 D:変異体

Caco-2 細胞に miR-145 阻害剤を作用させたところ、P-gp 発現量は約 1.6 倍、Rho123 輸送活性は約 2.8 倍まで上昇したが、MDR1 mRNA 発現量は不変であった。

以上より、miR-145 は MDR1-3'-UTR に作用し P-gp の翻訳を抑制する結果、P-gp 発現量と機能を低下させることが明らかとなった。(図 3) 本機構は、肝 I/R 後の小腸上皮細胞に発現する P-gp の発現・機能上昇にも深く関与するものと考えられる。

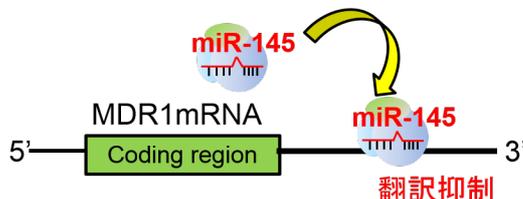


図3. miR-145 による P-gp の発現制御機構

(3) 薬物体内動態における miRNA の役割

miRNA は小腸上皮細胞の構造・分化・機能の維持に重要な役割を果たし、腸管に発現する様々な薬物トランスポータ・薬物代謝酵素・タイトジャンクションの発現・機能の制御に関与することを概説した。さらに、miRNA

は、年齢・性別・疾患により発現量が変動することから、薬物動態制御タンパク質の発現量の個体差をもたらす原因となる可能性があり、miRNA 発現量の変動は、薬物体内動態の個体内・個体間変動の要因となる可能性が示唆された。(図 4)

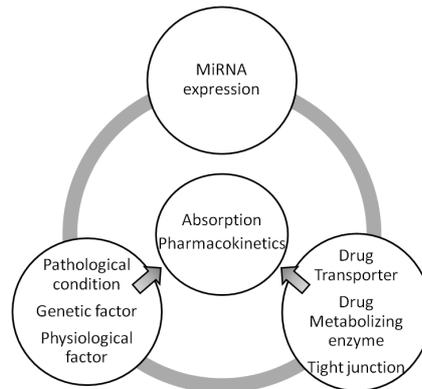


図4 薬物体内動態に及ぼす薬物制御蛋白質と miRNA の関係図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: Implication for intestinal barrier function. *Pharmacol Ther.* (2014) 掲載確定、査読有

Ikemura K, Nakagawa E, Kurata T, Iwamoto T, Okuda M. Altered pharmacokinetics of cimetidine caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (rOCT2) after liver ischemia-reperfusion injury. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28(6):504-509 (2013) 査読有

Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 83(2):399-405. (2013) 査読有

Ikemura K, Inoue K, Mizutani H, Oka H, Iwamoto T, Okuda M. An antioxidant Trolox restores decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia-reperfusion through distinct mechanisms between CYP3A and P-glycoprotein in the small intestine. *Eur J Pharmacol.* 5;690(1-3):192-201. (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

池村健治, miR-145 による小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の転写後発現調節機構、第 59 回日本薬学会東海支部総会大会、2013 年 7 月 6 日、名城大学 (愛知県名古屋市)

池村健治、miR-145 は小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の発現・機能調節に關与する、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日～26 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Kenji Ikemura, Decreased oral absorption of cyclosporine A through elevated intestinal CYP3A and P-glycoprotein by oxidative stress after liver ischemia-reperfusion、第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2011 年 11 月 26～27 日、名古屋大学医学部附属病院 (愛知県名古屋市)

池村健治、肝虚血再灌流障害時の Cyclosporine A の経口 bioavailability 低下における酸化ストレスの役割、日本薬剤学会第 26 年会、2011 年 5 月 29 日～31 日、タワーホテル船堀 (東京都江戸川区)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：マイクロ RNA145(miR-145) による MDR1/P-糖タンパク質(P-gp)の転写後発現調節

発明者：池村健治、岩本卓也、奥田真弘

権利者：国立大学法人三重大学、学校法人金城学院

種類：特許

番号：特願 2012-096869

出願年月日：2012 年 4 月 20 日

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池村 健治 (IKEMURA Kenji)

三重大学医学部附属病院・助教

研究者番号：70513935

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし