

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390039

研究課題名(和文) 遺伝子多型を考慮したmicroRNA発現制御に基づく薬物代謝能個人差解明の新展開

研究課題名(英文) Genotype-dependent regulation of drug-metabolizing enzymes by microRNAs

## 研究代表者

中島 美紀 (Nakajima, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬の効果や副作用の個人差は、薬の体内動態に大きな役割を果たす薬物代謝酵素活性の個人差に起因することが多い。本研究では、3'-非翻訳領域(3'-UTR)における遺伝子変異が薬物代謝酵素の発現量を変化させる原因について、microRNAによる発現制御に注目して解析した。ヒトCYP2E1、AKR1D1、TYMS等の3'-UTRに存在する遺伝子変異がmiRNAの結合性を変化させていることが、酵素発現量の個人差の分子メカニズムであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes are relevant to interindividual differences in pharmacokinetics, drug response and toxicity. Effects of SNPs in the coding region and 5'-UTR on enzyme activities or expression levels have been well studied, whereas SNPs in the 3'-UTR have been overlooked. Some SNPs in the 3'-UTR of concerned genes are associated with the change in the expression level. In this study, we found that human CYP2E1, AKR1D1, and TYMS are regulated by microRNA in the genotype-dependent manner. This is the first proof that a SNP(s) in the 3'-UTR of drug-metabolizing enzymes affects binding of miRNA to modulate the expression in the liver.

研究分野：薬物代謝

キーワード：マイクロRNA 遺伝子変異 個人差 転写後調節 薬物代謝酵素 薬物動態

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は標的 mRNA の主に 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) に結合し、翻訳を抑制あるいは mRNA を分解することにより発現を抑制する因子であり、さまざまな生命現象に関わっている。申請者は miRNA が薬物動態をも制御することを予測し、一早くこの分野にて研究を進めてきた。

一塩基多型 (SNP) は高頻度に認められる遺伝子変異である。薬物代謝酵素の SNP は個々の患者に適切な薬物治療を実現するために考慮すべき因子であることが、UGT1A1/イリノテカンや CYP2D6/タモキシフェンなどの例として知られている。これまでの遺伝子多型解析においては、アミノ酸変異を伴うような翻訳領域における SNP や転写活性に影響を与えるようなプロモーター領域 (5'-UTR) における SNP が注目され、対して 3'-UTR における SNP にはほとんど注意が払われてこなかった。3'-UTR 上の SNP により酵素の発現量が変化する例があっても、その原因・分子メカニズムは解明されていない。miRNA が 3'-UTR に結合して発現制御をすることが明らかになってきたことから、3'-UTR 上の SNP がどんな意味をもっているのか解明する必要がある。

そこで、遺伝子多型を考慮しつつ、miRNA による薬物代謝酵素の発現制御を解明することが、薬物代謝能の個人差を理解するために必要不可欠と考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

薬の効果や副作用の個人差は、薬の体内動態に大きな役割を果たす薬物代謝酵素活性の個人差に起因することが多い。これまでほとんど解析されていない 3'-UTR における遺伝子多型および miRNA による発現調節 (転写因子による発現制御よりも鋭敏に応答する) を融合させて薬物代謝酵素の発現量の個人差を評価することで、薬物体内動態の個人差を新たな着眼点から解明することを目的とした。研究対象はシトクロム P450 や抗がん薬関連代謝酵素とした。基礎情報の積み上げこそが、臨床応用の実現に向けて必須なものであり、薬物動態基礎研究から薬物治療に有用な情報を提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子判定

適切なプライマーや制限酵素を選択し、PCR-RFLP 法および AS-PCR 法、ならびにそれらの組み合わせによる遺伝子判定法を樹立した。

### (2) 遺伝子型と酵素発現量との関係

複数検体のヒト肝臓組織を用いて、遺伝子判定とウェスタンブロット分析を行い、3'-UTR に存在する遺伝子変異によりタンパク質発現量が影響を受けているか検討した。

### (3) ルシフェラーゼアッセイ

予測された miRNA 認識配列 (MRE) を含む 3'-UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだレポータープラスミドを作製し、細胞に pre-miRNA と共導入することで MRE が機能的かどうか評価した。

### (4) 安定発現細胞株の樹立と miRNA 過剰発現

遺伝子型の異なる 3'-UTR を含む cDNA を組み込んだプラスミドを細胞に導入し、安定発現細胞株をそれぞれの遺伝子型毎に樹立した。Pre-miRNA を導入し、mRNA またはタンパク質発現量が変動するかどうか、リアルタイム RT-PCR またはウェスタンブロットにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) チミジル酸合成酵素 (TYMS)

TYMS は 5-フルオロウラシル (5-FU) の標的酵素である。TYMS の 3'-UTR には 6 塩基挿入の遺伝子変異型が存在し、日本人における遺伝子頻度は約 30% である。この遺伝子変異型をもつ患者では 5-FU への応答性が悪いことが知られている。野生型に結合するが、6 塩基挿入型には結合しない miRNA として miR-14-5p を見出した。ホモ挿入型の SW480 細胞に miR-142-5p を過剰発現させたところ、TYMS mRNA およびタンパク質発現量に有意な変化は認められなかったが、ホモ野生型の HeLa 細胞では、TYMS mRNA およびタンパク質発現量の有意な増加が認められた。この結果は予想に反したものであり、miR-142-5p が TYMS の発現を抑制する何らかの因子に作用することで間接的な影響を及ぼした可能性が考えられた。

### (2) CYP2A6

CYP2A6 はテガフルやファドロゾールの代謝を触媒する酵素である。CYP2A6 の 3'-UTR には偽遺伝子である CYP2A7 と一部 (57 bp) 遺伝子変換された変異型 *CYP2A6\*1B* が存在し、日本人における遺伝子頻度は約 30% である。この変異型をもつヒトは野生型と比べて代謝活性が高いことが知られている。変換部位に結合が予測された miR-22、miR-155、miR-328 などが CYP2A6 の発現制御に関わっているか検討したところ、その可能性は否定された。

一方、さらに下流領域に miR-126\* 結合領域を見出し、この miRNA が CYP2A6 の発現制御に関わっていることをルシフェラーゼアッセイや発現細胞を用いた実験により明らかにした。ヒト肝約 20 検体において、CYP2A6 タンパク質発現量と miR-126\* 発現量との間に有意な負の相関関係が認められたことから、ヒト肝臓中の CYP2A6 が miR-126\* によって制御されていることが示された。さらに、CYP2A7 mRNA にも miR-126\* が結合し得ること、および CYP2A7 が miR-126\* の CYP2A6 への結合に対する「おとり」として機能し、

CYP2A6 発現量を変動させる要因となっていることを明らかにした。

### (3) CYP2E1

アセトアミノフェンやエタノールの代謝を触媒する CYP2E1 の 3'-UTR に存在する SNP が miRNA による認識に影響を与え、CYP2E1 発現量の個人差の原因となっている可能性について検討した。当該 SNP の遺伝子頻度は白人と黒人で約 80%、日本人では約 60% であり、高頻度で認められた。ヒト肝 32 検体を用いて、CYP2E1 発現量と SNP との関係調べたところ、SNP をホモで有する検体では CYP2E1 mRNA が低値傾向を示すものの、CYP2E1 蛋白質発現量は高値傾向を示し、転写後調節の関与が示唆された。SNP 領域に結合すると推定される miRNA として miR-570 を見出した。3'-UTR を含む CYP2E1 発現系を構築し、miR-570 を過剰発現させたところ、野生型 CYP2E1 タンパク質の発現が低下したのに対し、変異型では影響を受けなかったことから、miR-570 は遺伝子型特異的に CYP2E1 発現を制御していることを明らかにした。

### (4) アルド-ケト還元酵素 AKR1D1

胆汁酸合成に関わる還元酵素である AKR1D1 の 3'-UTR には複数の SNP が存在し、中でも rs1872930T>C の SNP を有するヒトでは肝臓中の AKR1D1 発現量が高いことが示されている。この発現量の差に miRNA が関わっている可能性を検討した。T 型と C 型の両遺伝子型について、3'-UTR を含む AKR1D1 安定発現細胞株を樹立し、miRNA を導入したところ、T 型の細胞株でのみ AKR1D1 mRNA 発現量およびタンパク質発現量の有意な低下が認められた。また、内因性の AKR1D1 発現量への miRNA の影響を調べるため、ホモ T 型のヒト肺癌由来 A549 細胞およびホモ C 型のヒト肝臓由来 HepG2 細胞へ miRNA を過剰発現させたところ、A549 細胞でのみ AKR1D1 発現量の有意な低下が認められた。従って、当該 miRNA は内因性の AKR1D1 に対して遺伝子型特異的に発現を抑制していることを明らかにした。

## 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)

Nakano M, Fukushima Y, Yokota S, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T, Nakajima M. CYP2A7 pseudogene transcript affects CYP2A6 expression in human liver by acting as a decoy for miR-126\*. *Drug Metab. Dispos.*, 43: 703-712, 2015. 査読あり DOI:10.1124/dmd.115.063255.  
Oda Y, Nakajima M, Tsuneyama K, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T, Yokoi T. Retinoid X receptor  $\alpha$  in human liver is regulated by

miR-34a. *Biochem. Pharmacol.*, 90: 179-187, 2014. 査読あり

DOI:10.1016/j.bcp.2014.05.002.

Takahashi K, Oda Y, Toyoda Y, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Regulation of cytochrome b5 expression by miR-223 in human liver: effects on cytochrome P450 activities. *Pharm. Res.*, 31: 780-794, 2014. 査読あり DOI:10.1007/s11095-013-1200-7.  
Yokoi T, Nakajima M. microRNAs as mediators of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53: 377-400, 2013. 査読あり DOI:

10.1146/annurev-pharmtox-011112-140250.  
中島美紀. 薬・異物や生体内化合物の代謝を制御する microRNA. *昭和大学薬学雑誌*, 4: 129-140, 2013. 査読あり  
[http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/showa\\_jour\\_pharm/back\\_number/frdi8b000000ilk2-at/nakajima.pdf](http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/showa_jour_pharm/back_number/frdi8b000000ilk2-at/nakajima.pdf)

### 〔学会発表〕(計 10 件)

岩上智香、深見達基、中島美紀. 3'-UTR の SNP によるヒト AKR1D1 の発現変動の原因となる microRNA の解明. 日本薬学会第 134 年会. 2015.3.26.-28. 神戸学院大学等 (神戸)

辰巳直之、深見達基、中島美紀. MicroRNA によるヒト UGT1A の発現制御解析: 薬物のグルクロン酸抱合活性への影響. 日本薬学会北陸支部総会第 126 回例会. 2014.11.16. 金沢大学 (金沢)

Miki Nakajima. MicroRNA-related polymorphisms to predict drug response. 19th North American Regional ISSX Meeting/29th JSSX Annual Meeting. 2014.10.18-24. San Francisco, USA.

中野正隆、福島靖也、横田真一、横井毅、中島美紀. ヒト CYP2A6 の miRNA による発現制御に与える偽遺伝子 CYP2A7 の影響. 第 6 回日本 RNAi 研究会. 2014.8.28-30. グランドプリンスホテル広島 (広島)

Nakano M, Fukushima Y, Yokota S, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. CYP2A7 pseudogene transcript affects CYP2A6 expression by acting as a decoy for microRNA binding. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2014.5.18-24, Stuttgart, Germany.

Nakajima M. New knowledge of microRNAs controlling human P450 expression or activities. 5th Asia Pacific ISSX Meeting. 2014.5.9-12. Tianjin, China.

中島美紀. 薬による microRNA の発現変動と薬効・副作用予測. 日本薬学会第 134 年会. 2014.3.28-30. 熊本大学 (熊本)

Nakano M, Mohri T, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Allele specific regulation of

human CYP2E1 by a microRNA. 日本薬物動態学会第 28 回年会. 2013.10.9-11. タワーホール船堀 (東京)

Nakajima M. New knowledge of the microRNA-mediated regulation of drug metabolism. 日本薬物動態学会第 28 回年会. 2013.10.9-11. タワーホール船堀 (東京)

中野正隆、茂利拓也、深見達基、横井毅、中島美紀. ヒト CYP2E1 3'-UTR 上の SNP が miR-570 結合性およびヒト肝における CYP2E1 発現量に与える影響. 第 5 回日本 RNAi 研究会. 2013.8.29-31. グランドプリンスホテル広島 (広島)

〔図書〕(計 1 件)

中島美紀. 異物代謝酵素のマイクロ RNA による制御 「毒性の科学-分子・細胞から人間集団まで」熊谷嘉人、姫野誠一郎、渡辺知保編 東京大学出版会, 200 (53-57), 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 美紀 (NAKAJIMA, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

中野 正隆 (NAKANO, Masataka)

岩上 智香 (IWAKAMI, Chika)