

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34533

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659077

研究課題名(和文) miRNA発現プロファイルを用いた肝薬物代謝能の変動予測

研究課題名(英文) microRNA-based prediction of alterations in drug-metabolizing enzymes during inflammation disease

研究代表者

森家 望 (MORIYA, Nozomu)

兵庫医療大学・薬学部・助手

研究者番号：30509138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、疾病が起因となる薬物代謝酵素cytochrome P450 (CYP)の発現変動を予測するために、CYP遺伝子の発現調節に関与するmicroRNA (miRNA)の探索を目的に実施された。本研究結果より、第一に、炎症時における炎症制御の分子機構の違いによってCYP発現への影響が異なる可能性が示された。第二に、Cyp2b10遺伝子は、炎症時におけるmRNA及びタンパク質レベルの発現傾向に不一致が認められ、複数種のmiRNAがCyp2b10 3' UTRに作用する可能性が示唆された。今後、これらのmiRNAが疾病時におけるCyp2b10発現の予測に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Certain physiological states and diseases can alter the expression and activity of cytochrome P450s (CYPs), which have the potential to cause unexpected adverse effects. In this study, we addressed the challenge of predicting the disease-induced alterations in drug-metabolizing enzymes using microRNA (miRNA) as a diagnostic tool. Firstly, we demonstrated the alteration of the constitutive CYPs' expression levels during inflammation varies according to the immune-stimulation pathway. Furthermore, we observed that the expressions of Cyp2b10 mRNA and its protein were quite different from those of the other CYPs in both the anaphylactic and Lipopolysaccharide-treated mice. Using a luciferase assay, Cyp2b10 was determined to be a direct target of mmu-miR-421-3p and others. We proposed that these miRNAs have an important role in Cyp2b10 gene expression regulation and might be contribute to prediction of alterations in drug-metabolizing enzymes.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物代謝 cytochrome p450 microRNA 炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) は、広範囲にわたる基質特異性を有し、薬物の代謝を司る重要な酵素群である。その発現は、薬物などの外来性化合物 (xenobiotics) の曝露や、性別・年齢などの生理的要因の影響を受けることがこれまでに知られていた。しかし昨今、ある種の疾病が CYP 発現に影響を及ぼす可能性が指摘されている。これまでに研究代表者は、細菌感染症モデルマウスを作製し、病態による CYP の発現変動について検討した結果、肝臓における多くの CYP 遺伝子の発現抑制を明らかにした (Moriya N. et al, *Biol. Pharm. Bull.*, 35:473-80, 2012.)。この事実をヒトで考えると、感染症に罹患した患者では薬物代謝能が低下し、代謝・排泄されるべき薬物が体内に滞留する結果、予期せぬ副作用が発現することになる。事実、1980 年にシアトルでインフルエンザが流行した際、喘息の予防にテオフィリンを処方されていた小児に痙攣等の重篤な副作用が発生したことが知られており (Kraemer MJ. et al, *Pediatrics*, 69:476-80, 1982) これはインフルエンザ感染によってテオフィリンの代謝酵素である肝臓の CYP1A2 が顕著に低下したことが原因と考えられている。このような“疾病による薬物代謝能の変動”という概念は、2000 年以降急速に注目を集め、細菌感染症モデルを筆頭に様々な病態モデル動物を用いてそのメカニズムが研究されている。

2. 研究の目的

上述の研究背景を踏まえ、研究代表者は、疾病に罹患した患者の薬物代謝能を考慮した、新たな薬物処方設計法の確立を最終目的としている。本研究課題においては、その基盤研究として、「疾病の罹患によって薬物代謝能がどのように変動するか？」を明らかにすることを目的としている。特に、感染症に代表される炎症性疾患が CYP 発現へ及ぼす影響を明らかにするために、炎症を誘起する Lipopolysaccharide (LPS) を投与したマウス、及び I 型アレルギーモデルマウスを作製し、両マウスにおける CYP 発現変動を比較解析した。さらに、疾病による薬物代謝能の変動を予測するために、今日新しいバイオマーカーとして注目されている生体内低分子 RNA の microRNA (miRNA) に着目し、miRNA を用いた薬物代謝酵素変動予測の可能性を検討した。

3. 研究の方法

- (1) LPS 投与マウスと I 型アレルギーモデルマウスにおける構成的 CYP 発現変動の比較解析
感染症モデルマウスとして、8 週齢の

Balb/c 雄性マウスに、LPS (1mg/kg) を腹腔内投与し、投与後 3 時間後の肝臓を採取した。また、I 型アレルギーモデルマウスは、8 週齢の Balb/c 雄性マウスに、抗原としてオボアルブミン (OVA) を腹腔内投与し (感作) その 14 日後に再び OVA を静脈内投与した (惹起)。14 日目の OVA 投与で全身性アナフィラキシーショックを誘発させ、肝臓を採取した。各々の肝臓から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製した後、real-time PCR 法を用いて、種々の Cyp 遺伝子及びサイトカイン遺伝子の発現を解析した。

- (2) Cyp2b10 遺伝子発現調節に關与する miRNA の探索

初めに、miWalk (Dweep H. et al, *J Biomed. Inform.*, 44:839-47, 2011) を用いて、Cyp2b10 3' UTR 配列に結合する可能性のある miRNA の予測を行った。検索条件は、Cyp2b10 遺伝子の 3' UTR を対象とし、Minimum seed length は「7」、p-value は「0.05」に設定した。また、miWalk が搭載している 12 の miRNA 標的遺伝子予測アルゴリズム全てで、検索を実施した。

検索結果から選出した 12 種類の miRNA 配列を有するオリゴを、pBasi ベクター (タカラバイオ) にライゲーションし、各種 miRNA 発現プラスミドを作製した。また、マウス肝癌細胞株の Hepa1c1c7 細胞から得られた cDNA をテンプレートに PCR 反応を行い、Cyp2b10 3' UTR 配列を増幅した。PCR 反応の際に用いた Forward プライマーには、Dra I サイトを、Reverse プライマーには Xho I サイトを含むように設計し、増幅した Cyp2b10 3' UTR 配列を pmirGLO ベクター (Promega) にライゲーションし、pmirGLO/Cyp2b10 3' UTR (レポーターベクター) を作製した。

これらのコンストラクトを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。96 well plate に HeLa 細胞を 1×10^4 個/well の濃度で播種して 24 時間培養した後、レポーターベクターと miRNA 発現ベクターを共発現させた。遺伝子導入 48 時間後、Dual-GLO Luciferase Assay System (Promega) を用いて、アッセイを行った。

- (3) miRNA 標的遺伝子探索における効率的なデータマイニング法の開発

現在、様々なアルゴリズムに基づいて miRNA の標的遺伝子を予測するプログラムが web 上に存在するが、これらの予測から得られる outcome data は膨大になり、疾患・病態と密に関連する miRNA を抽出するのはしばしば困難が伴う。そこで本項目では、自作 Excel VBA アルゴリズムを用いた、miRNA 標的遺伝子の効率的なデータマイニング法の開発を行った。本

法の開発には、これまでに網羅的な miRNA 発現変動が多数報告されている関節リウマチ (RA:Rheumatoid arthritis) に着目し、モデル疾患として採用した。初めに、RA 患者の生体内組織等で有意に発現が変動している miRNA の情報を文献から収集し、それらを統合した。次に、複数の既存 miRNA 標的遺伝子予測ソフトから標的遺伝子を予測し、得られた標的遺伝子を基に、DAVID (Huang DW, et al, *Nature Protoc.*, 4:44-57, 2009) を用いてパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) LPS 投与マウスと I 型アレルギーモデルマウスにおける構成的 CYP 発現変動の比較解析

LPS 投与マウスの肝臓において、Cyp1a2、Cyp2c29、Cyp3a11 遺伝子の発現低下が認められた。一方、アナフィラキシーショックを誘発させた I 型アレルギーモデルマウスの肝臓では、Cyp1a2、Cyp2c29、Cyp3a11 遺伝子発現に変動は認められなかった (図 1)。また、ウェスタンブロット法を用いて、両マウス肝臓におけるタンパク質レベルの CYP 発現についても検討したところ、遺伝子発現と同様の結果が認められた (図 2)。一方で、Cyp2b10 遺伝子は、いずれのマウス肝臓においても mRNA 発現の増加が認められたにも関わらず、タンパク質レベルでは低下が認められた。以上の知見より、LPS により誘発される炎症とアナフィラキシーショックによって生じる炎症では、CYP 発現へ及ぼす影響が、その CYP 分子種によって異なることが観察された。特に、Cyp2b10 遺伝子発現は、mRNA レベルとタンパク質レベルでの発現傾向に不一致が認められたことから、その発現調節に miRNA が関与することが強く疑われた。

次に、この「差」の原因を探るために、既に CYP 遺伝子発現の抑制に関与することが示唆されている炎症性サイトカインの TNF、IL-1 遺伝子発現量を測定した。その結果、いずれのマウス肝臓においても、TNF、IL-1 の発現が増加していることが認められた (図 3)。以上の結果より、LPS による炎症が構成的 CYP 遺伝子発現に強く影響を及ぼすことが示された。一方、I 型アレルギーモデルマウスでは、CYP 遺伝子発現への影響が認められず、従来の炎症による CYP 遺伝子発現抑制機構をレスキューする未知の機構が存在する可能性が示唆された。

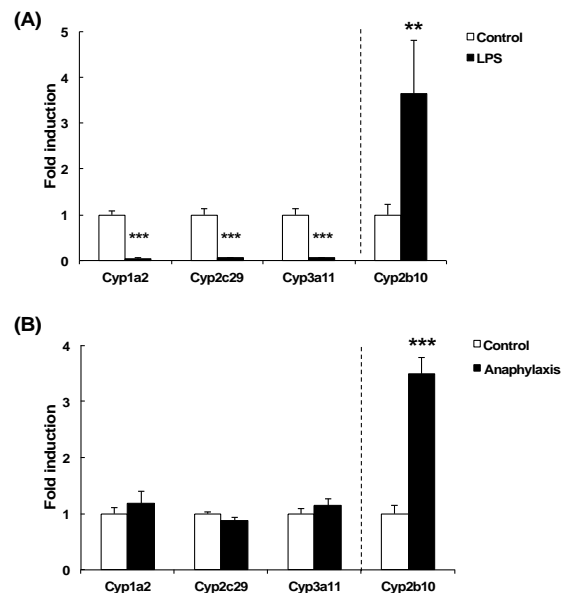


図 1 LPS 投与マウスと I 型アレルギーモデル肝臓における Cyp mRNA 発現

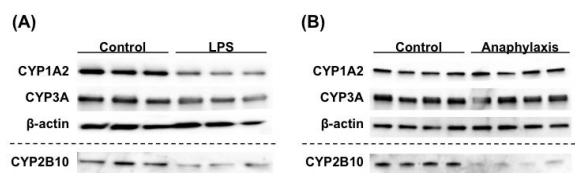


図 2 LPS 投与マウスと I 型アレルギーモデル肝臓における Cyp タンパク質発現

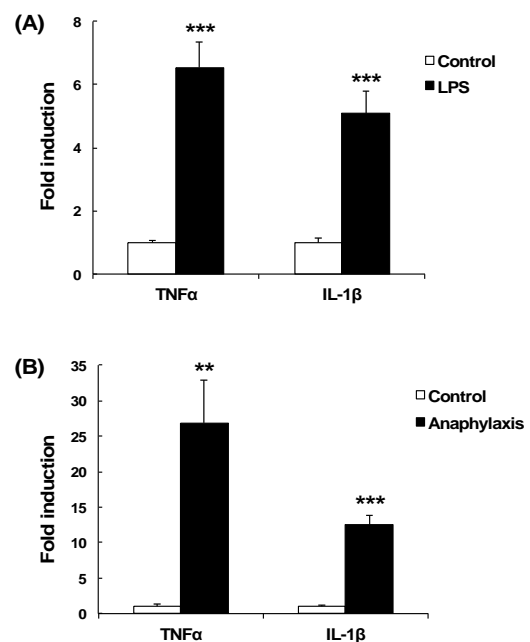


図 3 LPS 投与マウスと I 型アレルギーモデル肝臓における TNF、IL-1 mRNA 発現

(2) Cyp2b10 遺伝子発現調節に關与する miRNA の探索

(1)の結果から、Cyp2b10 遺伝子の発現調節には、miRNA が關与している可能性が疑われた。そこで、Cyp2b10 3' UTR と相互作用する miRNA を探索するために、miRWalk を用いて、*in silico*で Cyp2b10 遺伝子を標的とする miRNA の探索を行った。その結果、1288 個の miRNA が予測されたが、その中から、Cyp2b10 3' UTR に結合すると予測したアルゴリズム数が多い miRNA を 12 種ピックアップした。

次に、これらの 12 種類の miRNA 発現ベクターと pmirGLO/Cyp2b10 3' UTR を用いてルシフェラーゼアッセイを行なった。pmirGLO/Cyp2b10 と pBA を共発現させた細胞のルシフェラーゼ活性を 100%とし、各 miRNA を発現させた細胞は、その相対値を示した。その結果、mmu-miR-214-3p、mmu-miR-421-3p、mmu-miR-345-3p でルシフェラーゼ活性の有意な抑制が認められた。さらに、これら 3 種の miRNA について、ベクター量を 5, 10, 20, 40, 80 ng に設定し、用量依存的な抑制の有無を検討した。その結果、mmu-miR-421-3p、で用量依存的な抑制が認められた。最後に、同 miRNA の結合部位を欠損・変異させた pmirGLO/Cyp2b10 3' UTR を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、wild type で認められていた抑制(52.2%)が、欠損・変異によって 72.3%、74.5%まで回復することが認められた。

これらの知見から、mmu-miR-421-3p が Cyp2b10 3' UTR に結合し、Cyp2b10 遺伝子発現調節に關与することが示唆された。また、本研究で見出された mmu-miR-421-3p の発現が、疾病時における Cyp2b10 遺伝子発現の予測に役立つことが期待される。今後、Cyp2b10 を発現している細胞へ miR-421-3p を発現させ、Cyp2b10 のタンパク質発現へ及ぼす影響を詳細に検討する予定である。

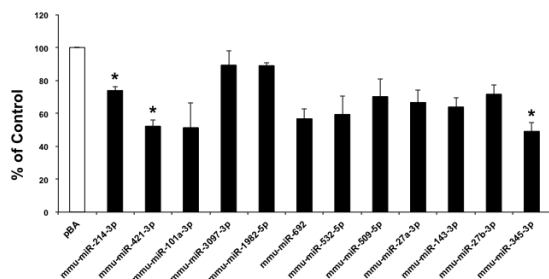


図 4 各種 miRNA 発現が pmirGLO/Cyp2b10 3' UTR によるルシフェラーゼ活性へ及ぼす影響

(3) miRNA 標的遺伝子探索における効率的なデータマイニング法の開発

本項目では、疾病時などにおける網羅的な miRNA 発現変動データを解析する際

の一助となる Excel VBA アルゴリズムを開発した。解析に係る作業(データ収集、標的遺伝子予測、パスウェイ解析)を Excel VBA を用いて自動化することで、解析に要する時間の大幅な短縮、及び人為的なミスの防止を達成した。また、一連の解析により、最終的に得られた有意なパスウェイは、既に RA との関連が報告されているパスウェイとよく類似しており、本データマイニング法の妥当性が確認されたと考えている。さらに、パスウェイ解析の結果から、RA 患者由来組織で変動を示した数種類の miRNA が、RA の増悪に關わる mTOR シグナル伝達経路や JAK/STAT 経路に關与する新たな可能性が示唆された。

今後、各種 CYP 誘導剤を投与したマウス肝臓における miRNA 発現変動データに対し、本項目で開発したデータマイニング法を用い、マウス CYP 発現変動に關与する、主たる miRNA の探索を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 1 件)

N. Moriya, H. Kataoka, H. Fujino, J. Nishikawa, F. Kugawa, Different expression patterns of hepatic cytochrome P450 s during anaphylactic or lipopolysaccharide-induced inflammation, *Die Pharmazie*, 査読有, 69, 2014, 142-147.
doi:10.1691/ph.2014.3725

(学会発表)(計 2 件)

森家望、中西祐貴、渡辺麻梨菜、九川文彦、Excel VBA を用いた関節リウマチ関連 miRNA の標的遺伝子予測、第 16 回日本 RNA 学会年会、ウインクあいち(愛知県名古屋市)、2014 年 7 月 23 日
森家望、中西祐貴、渡辺麻梨菜、九川文彦、関節リウマチ関連 miRNA 標的遺伝子の *in silico* 予測 - 既存データベースと自作 Excel VBA を用いて -、日本薬学会 第 134 年会、熊本市総合体育館(熊本)、2014 年 3 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森家 望 (MORIYA, Nozomu)
兵庫医療大学・薬学部・助手
研究者番号: 3 0 5 0 9 1 3 8

(2) 研究分担者

九川 文彦 (KUGAWA, Fumihiko)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 9 0 2 0 5 0 6 3