

miR-34a のヒト RXR α 発現制御および肝線維化への寄与

小田 祐輝
2015 年 1 月

博士論文

miR-34a のヒト RXR α 発現制御および肝線維化への寄与

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬物代謝安全性学研究室

学 籍 番 号 1229012003

氏 名 小田 祐輝

主任指導教員名 中島 美紀

目次

略語表

序論	1
第 I 章 miR-34aによるヒトRXR α の発現制御	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 実験材料および方法	5
I-2-1 実験材料および使用機器	5
I-2-2 細胞株および細胞培養	9
I-2-3 レポータープラスミドの構築	9
I-2-4 コロニーPCR	12
I-2-5 プラスミドDNAの大量調製	12
I-2-6 シーケンス解析	13
I-2-7 プラスミドDNAとpre-miRNAのHEK293細胞への導入および ルシフェラーゼアッセイ法	14
I-2-8 HepG2細胞へのpre-miRNAの導入	14
I-2-9 Total cell homogenateの調製とタンパク質定量	15
I-2-10 SDS-PAGEとウェスタンブロッティング	15
I-2-11 Total RNAの調製とcDNAへの逆転写反応	16
I-2-12 Real-time RT-PCRによるmRNA発現量の測定	16
I-2-13 RXRa mRNA安定性の評価	17
I-2-14 核の単離とNuclear run-on assay	18
I-2-15 CYP26 mRNAの誘導とCYP3A4プロモーターの転写活性	18

	の評価	
I-2-16	細胞へのエトポシド処置	19
I-2-17	Real-time RT-PCRによるmature miR-34a発現量の測定	19
I-2-18	ヒト肝サンプルにおけるRXR α タンパク質およびmature miR-34a発現量の測定	20
I-2-19	統計解析	21
第3節	実験結果	
I-3-1	ルシフェラーゼアッセイによるMREの同定	22
I-3-2	HepG2細胞におけるRXR α タンパク質発現量に及ぼすmiR-34a過剰発現の影響	23
I-3-3	HepG2細胞におけるRXR α mRNA発現量に及ぼすmiR-34a過剰発現の影響	23
I-3-4	HepG2細胞におけるRXR α mRNAの安定性に及ぼすmiR-34a過剰発現の影響	24
I-3-5	HepG2細胞におけるRXR α の転写に及ぼすmiR-34a過剰発現の影響	25
I-3-6	CYP26 mRNA誘導能およびCYP3A4転写活性に及ぼすmiR-34a過剰発現の影響	26
I-3-7	RXR α タンパク質発現量に及ぼすp53活性化の影響	27
I-3-8	線維化の認められる肝におけるmature miR-34a発現量とRXR α タンパク質発現量の解析	30
第4節	考察	32
第II章	miR-34aノックダウンの肝線維化への影響	35

第1節	緒言	35
第2節	実験材料および方法	36
II-2-1	実験材料および使用機器	36
II-2-2	マウスへのCCl ₄ およびAMO34a MENDの投与と採血ならびに 肝臓の採取	38
II-2-3	血漿の分離およびALT値の測定	39
II-2-4	HE染色およびPSR染色	39
II-2-5	マウス肝サンプルにおけるmature miR-34aおよびmRNA 発現量の測定	39
II-2-6	マウス肝実質細胞および非実質細胞におけるAlb mRNA およびmature miR-34a発現量の測定	40
II-2-7	Whole cell lysateの調製とタンパク質定量	41
II-2-8	SDS-PAGEとウェスタンブロッティング	41
II-2-9	統計解析	41
第3節	実験結果	42
II-3-1	肝線維化モデルの評価	42
II-3-2	Mature miR-34aの発現変動解析	43
II-3-3	肝線維化発症へのAMO34a MEND前投与によるmiR-34a ノックダウンの影響	45
II-3-4	肝線維化マーカーmRNA発現変動解析によるmiR-34a ノックダウンの肝線維化発症への影響評価	46
II-3-5	アポトーシスへのmiR-34aノックダウンの影響	48
II-3-6	肝線維化進行へのAMO34a MEND投与によるmiR-34a ノックダウンの影響	49
II-3-7	肝線維化マーカーmRNA発現変動解析によるmiR-34a	50

ノックダウンの肝線維化進行への影響評価

第4節 考察	52
第III章 総括	54
参考文献	56
論文目録	62
主論文	62
副論文	62
謝辞	63

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

ALT	Alanin aminotransferase
AMO	Anti-miRNA oligonucleotide
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammonium persulfate
APMSF	(<i>p</i> -Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride
ATP	Adenosine triphosphate
atRA	All- <i>trans</i> -retinoic acid
Bcl2	B-cell lymphoma 2
CAR	Constitutive androstane receptor
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Col	Collagen
CYP	Cytochrome P450
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide 5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid disodium salt
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FXR	Farnesoid X receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HE	Hematoxylin • Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
IgG	Immunoglobulin G
LXR	Liver X receptor
MEND	Multifunctional envelope-type nano device
miRNA	MicroRNA
MMP	Matrix metalloproteinase
MRE	MicroRNA recognition element
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Neaa	Non-essential amino acid
NPC	Non-parenchymal cell
NT	No transfection
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PSR	Picrosirius red
PLB	Passive lysis buffer
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primary miRNA
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PXR	Pregnane X receptor
RA	Retinoic acid
RAR	Retinoic acid receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease A

rNTP	Ribonucleotide 5'-triphosphate
RT	Reverse transcriptase
RXR α	Retinoid X receptor α
SIRT1	Sirtuin 1
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMA	Smooth muscle actin
snRNA	Small nuclear RNA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
Tgf β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TR	Thyroid hormone receptor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Triton X-100	Octylphenol ethylene oxide condensate
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UTR	Untranslated region
VDR	Vitamin D receptor

HE	Hematoxylin • Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
IgG	Immunoglobulin G
LXR	Liver X receptor
MEND	Multifunctional envelope-type nano device
miRNA	MicroRNA
MMP	Matrix metalloproteinase
MRE	MicroRNA recognition element
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Neaa	Non-essential amino acid
NPC	Non-parenchymal cell
NT	No transfection
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PSR	Picrosirius red
PLB	Passive lysis buffer
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primary miRNA
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PXR	Pregnane X receptor
RA	Retinoic acid
RAR	Retinoic acid receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease A

rNTP	Ribonucleotide 5'-triphosphate
RT	Reverse transcriptase
RXR α	Retinoid X receptor α
SIRT1	Sirtuin 1
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMA	Smooth muscle actin
snRNA	Small nuclear RNA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
Tgf β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TR	Thyroid hormone receptor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Triton X-100	Octylphenol ethylene oxide condensate
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UTR	Untranslated region
VDR	Vitamin D receptor

序論

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 である。初めに線虫で発見されて以降 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993)、動植物を含む様々な生物種で報告され、高等生物ほど報告されている miRNA の種類が多い。Fig. 1 には miRNA の成熟過程および遺伝子発現抑制機構を示した。miRNA はまず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)。転写産物である primary miRNA (pri-miRNA) は核内で Drosha と呼ばれる酵素によりプロセッシングを受け、60~80 塩基の precursor miRNA (pre-miRNA) となる。その後、Exportin 5 により核内から細胞質へと輸送され、ヘアピン構造部分が Dicer によって切断され、20~25 塩基の miRNA duplex が生成される。RISC (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、1 本鎖 RNA となった成熟 miRNA (Mature miRNA) は標的 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あるいは mRNA を分解することにより発現を負に制御する (Bartel, 2004)。

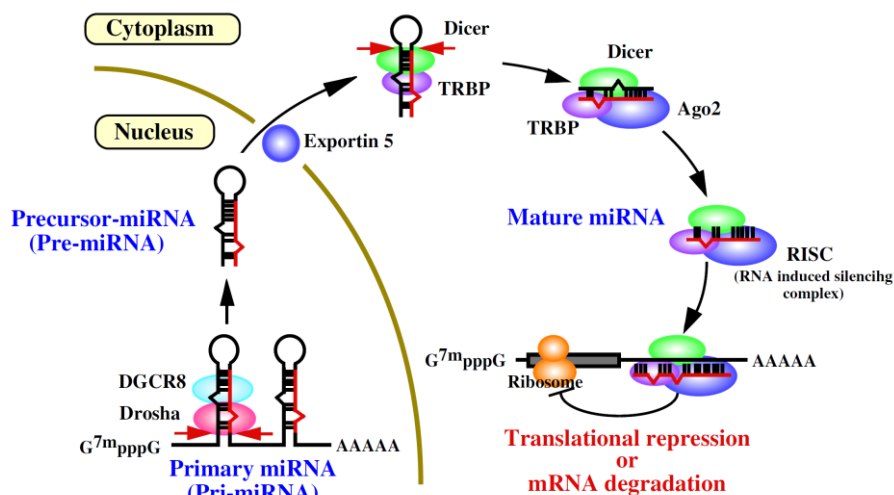


Fig. 1. Mechanism of gene silencing by miRNAs. miRNAs are first transcribed by an RNA polymerase II, generating the primary miRNA (pri-miRNA) transcripts. Pri-miRNA is processed to ~80-nt precursor miRNA (pre-miRNA) by the microprocessor complex composed of the RNase III enzyme Drosha and its cofactor DiGeorge syndrome critical region 8 protein (DGCR8). Pre-miRNA is exported from the nucleus by the nuclear export factor Exportin 5, processed to miRNA duplex by the cytoplasmic RNase III enzyme Dicer. miRNA duplex is incorporated into the effector complex RISC. After strand separation, the mature miRNA strand recognizes target mRNA and causes translational repression or mRNA degradation.

現在ヒトにおいて 2,500 種類以上の miRNA が報告されており (<http://www.mirbase.org/>)、その塩基配列は種をこえて広く保存されている。miRNA の 5'末端 2~7 塩基の配列 (seed sequence) は miRNA が機能的に働くために重要であることが知られており (Lewis et al., 2005)、それを基に種々の *in silico* ツールで各 miRNA の標的遺伝子を予測することができる (TargetScan, <http://www.targetscan.org/>; miRanda, <http://www.microrna.org/microrna/home.do>; Pictar, <http://pictar.org/>; RNA22, <http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)。ヒト全 mRNA の 60%程度が miRNA によって制御されていると推定されており (Friedman et al., 2009)、miRNA の発現異常や機能不全は癌などの疾患の発症、進行の要因となっていると考えられている。当研究室では、miRNA が cytochrome P450 (CYP) 1B1 や pregnane X receptor (PXR) といった薬物代謝酵素やその発現に関与する転写因子の発現調節にも関与していることを明らかにしてきており (Table 1)、薬物動態分野においても重要な因子と考えられる。

Table 1. Drug metabolism-related genes that are regulated by miRNAs in human.

	Target	miRNA	Reference
Drug-metabolizing enzyme	CYP1B1	miR-27b	Tsuchiya et al., 2006
	CYP24	miR-125b	Komagata et al., 2009
	CYP2E1	miR-378	Mohri et al., 2010
Transcription factor	PXR	miR-148a	Takagi et al., 2008
	VDR	miR-125b	Mohri et al., 2009
	HNF4 α	miR-24, 34a	Takagi et al., 2009
	PPAR α	miR-21, 27b	Kida et al., 2011
	ARNT	miR-24	Oda et al., 2012
Other	Cytochrome <i>b</i> ₅	miR-223	Takahashi et al., 2014

CYP, cytochrome P450; PXR, pregnane X receptor; VDR, vitamin D receptor; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α ; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator.

miR-34 ファミリーは miR-34a、miR-34b、miR-34c の 3 miRNAs から構成され、これら miRNAs の seed sequence は同一であるため、共通した遺伝子を標的の候補とされている。マウスにおいて、miR-34a はほとんどの臓器に発現が認められるの

に対し、miR-34b/c は肺を除いてその発現量が miR-34a と比べて低値であることから (Bommer et al., 2007)、生体内では主に miR-34a が標的遺伝子の発現制御に寄与していると考えられる。miR-34a は B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) をはじめとする癌遺伝子の発現を抑制することから、癌抑制遺伝子として知られている (Liu and Tang, 2011)。細胞の癌化に伴い、miR-34a をコードする遺伝子が存在する染色体の 1p36 領域の一部が欠失することや (Calin et al., 2004)、miR-34a のプロモーター領域が高メチル化されることが報告されており (Lodygin et al., 2008)、癌細胞において miR-34a の発現はジェネティックおよびエピジェネティックな機構により抑制されている。このように miR-34a に関する研究は癌分野において活発に行われている。当研究室においても肝臓における様々な遺伝子の制御を担う hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) が 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ものの、癌以外における miR-34a の役割に関する情報は少ない。

本研究では肝臓における miR-34a の役割を明らかにすることを目的とし、第 I 章では、ヒト retinoid X receptor α (RXR α) 発現に与える miR-34a の影響を解析した。近年、miR-34a の発現誘導に関与する p53 が肝線維化の進行に関与することが報告され (Kodama et al., 2011)、一方で RXR α は肝線維化に対して保護的に働くことが報告された (Wang et al., 2011) ことから、RXR α 発現に与える miR-34a の影響の生理学的、病理学的意義について肝線維化に着目し検討した。第 II 章では、四塩化炭素 (carbon tetrachloride, CCl₄) を用いて肝線維化モデルマウスを作製し、肝線維化における miR-34a の役割についてより詳細に検討した。

第 I 章 miR-34a によるヒト RXR α の発現制御

第 1 節 緒言

RXR α はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属している転写因子であり、肝臓や腎臓、脾臓、肺、骨格筋に高い発現が認められる (Mangelsdorf et al., 1992)。RXR α は retinoic acid receptor (RAR)、VDR、thyroid hormone receptor (TR)、PXR、constitutive androstane receptor (CAR)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、farnesoid X receptor (FXR)、liver X receptor (LXR) などの受容体とヘテロダイマーを形成し、これらの受容体のリガンドである *all-trans*-retinoic acid (atRA) や活性型ビタミン D₃、甲状腺ホルモン、薬物、脂肪酸、胆汁酸に応答して、薬物代謝酵素や胆汁酸合成酵素などの標的遺伝子のプロモーター領域内に存在する応答配列に結合することで発現を誘導する。また、PPAR/RXR α および LXR/RXR α ヘテロダイマーは、RXR α のアゴニストである *9-cis*-retinoic acid (RA) によっても活性化される (Shulman et al., 2004)。このように、RXR α は多くの遺伝子の発現に関わる重要な因子である。

RXR α の発現調節に関しては、ユビキチン/プロテアソーム系による分解が知られており、mitogen-activated protein kinase pathway (Lattuada et al., 2007) および protein kinase C pathway (Tsao et al., 2005) によりその分解が阻害されることが報告されている。また、ラット心筋細胞において高グルコース培養により生じた酸化ストレスにより RXR α のタンパク質発現量が低下することが報告されているのみで、転写調節、転写後調節に関する情報は少ない。Target scan を用いたコンピュータ解析により探索したところ、ヒト RXR α mRNA に miR-34a が結合し得る領域が存在したことから、本章では、RXR α の発現調節メカニズムとして miR-34a の関与の可能性を検討した。

第 2 節 実験材料および実験方法

I-2-1 実験材料および使用機器

DMEM は日水製薬 (Tokyo, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS)、非必須アミノ酸 (Neaa)、T4 ligase、Lipofectamine 2000 Reagent、Lipofectamin RNAiMAX、Pre-miR hsa-mir-34a、Pre-miR negative control #1、TaqMan MicroRNA Assay および TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit は Life Technologies (Carlsbad, CA) より購入した。LB broth は Merck (Darmstadt, Germany) により購入した。TaqDNA ポリメラーゼおよび dNTPs はグライナージャパン (Tokyo, Japan) より購入した。制限酵素および Ribonucleotide Solution Mix は New England Biolabs (Ipswich, MA) より購入した。pGL3-promoter (pGL3-p)、pGL4.74-TK、pRL-SV40, Dual-Luciferase Reporter Assay System および RNasin Ribonuclease Inhibitor は Promega (Madison, WI) より購入した。Plasmid Midi Kit および RNase A Solution は Qiagen (Tokyo, Japan) より購入した。シーケンス反応には GE Healthcare Bio-sciences (Buckinghamshire, UK) の Thermo Sequence Cy5 Dye Terminator Kit と Thermo Sequence Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いた。RNAiso、SYBR Premix Ex Taq (2×)、ROX およびランダムヘキサマーはタカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より購入した。プライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Bio-Rad Protein Assay Kit は Bio-Rad (Hercules, CA) より、Immobilon-P PVDF 膜は Millipore (Billerica, MA) より購入した。ウサギ抗ヒト RXR α 抗体 (ポリクローナル) は Santa Cruz (California, Japan)、ウサギ抗ヒト β -actin 抗体 (ポリクローナル) は BioVision (Mountain view, CA)、IRDye 680LT ヤギ抗ウサギ IgG は LI-COR Biosciences (Cambridge, UK) より購入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents は Pierce (Rockford, IL) より、 α -アマニチンは Calbiochem (San Diego, CA) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

24 well プレート、12 well プレート、6 well プレートおよび 100 mm ディッシュは

Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ) より入手した。大腸菌の大量培養には TAITEC (Saitama, Japan) の Bio-shaker BR-33FM 型を用い、集菌のための遠心分離機は KUBOTA (Tokyo, Japan) の KR-20000T 型を用いた。プラスミド DNA の定量には NanoDrop Technologies の NanoDrop ND-1000 を使用した。シーケンス解析には Siemens Medical Solutions Diagnostics (Deerfield, IL) の Long-Read Tower DNA シークエンサーを使用した。ルミノメーターは PerkinElmer (Osaka, Japan) の Wallac 1420 ARVOSx マルチラベルカウンタを使用した。プラスミド DNA および RNA の定量には NanoDrop Technologies (Wilmington, DE) の NanoDrop ND-1000 を使用した。Real-time RT-PCR には Stratagene の Mx3000 を使用した。以下に本章で使用した培地および試薬の組成を示した。必要のあるものはオートクレーブ (121°C、20 分間または 40 分間) 等の滅菌処理を行った。

フェノール/クロロホルム溶液

1 M Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化させたフェノールとクロロホルムの 1 : 1 の混合液、0.1% 8-ヒドロキシキノリン、0.2% 2-メルカプトエタノール

クロロホルム溶液

クロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の比で混合した。

LB-Amp 培地

LB broth 5 g、寒天末 2.5 g に精製水を加え全量 200 mL とし、121°C、20 分間オートクレーブした。放冷後、ampicillin (Amp) を最終濃度 100 µg/mL になるように加えた。

LB-Amp 寒天培地

LB broth 5 g、寒天末 2.5 g に精製水を加え全量 200 mL とし、121°C、20 分間オートクレーブした。放冷後、Amp を最終濃度 100 µg/mL になるように加え、ディッシュに撒いた。

Buffer P1

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 µg/mL RNase A

Buffer P2

100 mM 水酸化ナトリウム、1% SDS

Buffer P3

3 M 酢酸カリウム (pH 5.5)

Buffer QBT

750 mM 塩化ナトリウム、50 mM MOPS (pH 7.0)、15%イソプロパノール、0.15% Triton X-100

Buffer QC

1 M 塩化ナトリウム、50 mM MOPS (pH 7.0)、15%イソプロパノール

Buffer QF

1.25 M 塩化ナトリウム、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)、15%イソプロパノール

TE

10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA

TGE 緩衝液

10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、20%グリセロール、1 mM EDTA

トリプシン-EDTA 溶液

0.05%トリプシン、0.02% EDTA を PBS に溶解

DEPC 処理精製水

最終濃度が 0.1%になるように DEPC を加えた精製水を 37°C で 2 時間加温した。

サンプル処理液

SDS 6.0 g、2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 20 mL、ピロニン Y 6.0 mg、グリセロール 60 mL に精製水を加え、全量を 192 mL とした。

30%アクリルアミド

アクリルアミド 29.2 g、ビスアクリルアミド 0.8 g に精製水を加え全量を 100 mL とした。

泳動用緩衝液 (pH 8.4)

Tris 2.4 g、グリシン 11.5 g、SDS 0.8 g

転写用緩衝液 (pH 8.4)

Tris 3.0 g、グリシン 14.4 g、メタノール 200 mL

PBS

塩化ナトリウム 8 g、塩化カリウム 0.2 g、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 2.9 g、リン酸二水素カリウム 0.2 g

0.1% PBST

PBS に 0.1%となるように Tween 20 を添加した。

Transcription 緩衝液

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、150 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウム、0.5 mM 塩化マンガン、1 mM DTT、0.1 mM EDTA、10%グリセロール

Table 2. Sequence of primers used for plasmid construction.

Primer	Sequence	Position
UTR-S	5'-TTT TCT AGA CCC TGC CCG ATC CAC CG-3'	3449 – 3465
UTR-AS	5'-TTT TCT AGA CCT GCA CCC TCC TGC CAT TTC-3'	3570 – 3591
CDS-S	5'-ACC TGA CCT ACA CCT GCC GC-3'	659 – 678
CDS-AS	5'-GCA CGG CTT CCC GCT TCA TG-3'	759 – 778

Nucleotide position on cDNA when the 5' end of mRNA is 1.

ヒト肝 total RNA からランダムヘキサマーを用いて、後述する I-2-11 に準じて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、10 pmol/μL のセンスプライマーとアンチセンスプライマーをそれぞれ 1 μL、PCR 緩衝液 2.5 μL、2.5 mM dNTP 2.5 μL、2.5 mM 塩化カルシウム 1.5 μL、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 μL (0.1 U)、滅菌精製水を加えて全量 25 μL として PCR を行った。MRE1 の増幅には UTR-S プライマーと UTR-AS プライマー (Table 2) を用い、94°C で 3 分間反応させた後、94°C で 30 秒間、65°C で 30 秒間、72°C で 40 秒間を 45 サイクル、続いて 72°C で 5 分間反応させた。MRE2 の増幅には CDS-S プライマーと CDS-AS プライマーを用い、94°C で 3 分間反応させた後、94°C で 30 秒間、63°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 45 サイクル、続いて 72°C で 5 分間反応させた。それぞれの断片は以下の方法で回収した。EtBr を含む 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、目的の断片が含まれる部分を切り出した。これらをあらかじめ 2% (w/v) 炭酸水素ナトリウムおよび 1 mM EDTA (pH 8.0) を含む水溶液中で 10 分間煮沸処理を行った透析膜を用いて回収し、DNA 断片を精製した。精製は以下の方法に従った。フェノール/クロロホルム溶液 400 μL を加えて 5 分間ボルテックスし、7,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離して上清を回収した。次にクロロホルム溶液 400 μL を加えて 5 分間ボルテックスし、7,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離した。上清に 3 M 酢酸ナトリウムを 40 μL と 100% 冷エタノールを 1 mL 加え、-80°C で冷却後、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、沈殿を 70% 冷エタノール 1 mL で洗浄した。沈殿を乾燥後、TE に溶解させ、DNA を精製した。MRE1 (143 塩基対) は *Xba* I で消化し、MRE2 (220 塩基対) は Klenow fragment 処理により平滑末端化した。また pGL3-p ベクターを *Xba* I で消化し、必要に応じて Klenow fragment を用いて以下の方法により平滑末端化した。pGL3-p ベクター 10 ng に

Klenow Buffer を 2.5 μL 、2.5 mM dNTPs を 1 μL 、Klenow fragment (5 units/ μL) を 1 μL 、滅菌精製水を加えて全量を 25 μL とし、サーマルサイクラーを用いて 37°C で 30 分間反応させた。70°C、5 分間で酵素を失活させた後 DNA を精製した。*Xba* I 処理したベクターまたは平滑末端化したベクターに上述の DNA 断片を T4 ligase を用いてライゲーションし、DH5 α コンピテントセルに形質転換した。

Positive control のプラスミドである pGL3/c-miR-34a (Fig. 3) は以下の方法により構築した。両末端に *Xba* I 認識配列を付加させた c-miR-34a センス鎖: 5'-CTA GA*A*CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA T-3'および c-miR-34a アンチセンス鎖: 5'-CTA GAT**GGC AGT GTC TTA GCT GGT TGT** T-3'を用意した (下線部は *Xba* I 認識配列、斜体は miR-34a と相補的な配列、太字は miR-34a の配列を示す)。100 pmol/ μL センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれ 3.5 μL に、0.1 M 塩化マグネシウム 1 μL 、0.5 M 塩化ナトリウム 2 μL を加え全量を 10 μL とした。90°C で 3 分間加熱後、60 分かけて徐々に冷却することでアニールさせた。二本鎖化されたオリゴヌクレオチドは両端が *Xba* I 消化末端となるように設計されている。この二本鎖オリゴヌクレオチド 2 μL に、Protruding end kinase buffer を 10 μL 、100 μM ATP を 1 μL 、T4 kinase を 2 μL 加え、滅菌精製水で全量を 100 μL とし、37°C で 60 分間インキュベートし、DNA 断片 5'末端にリン酸を付加した。これを、*Xba* I で消化しておいた pGL3-p ベクターに T4 ligase を用いてライゲーションし、DH5 α コンピテントセルに形質転換することで pGL3/c-miR-34a を得た。

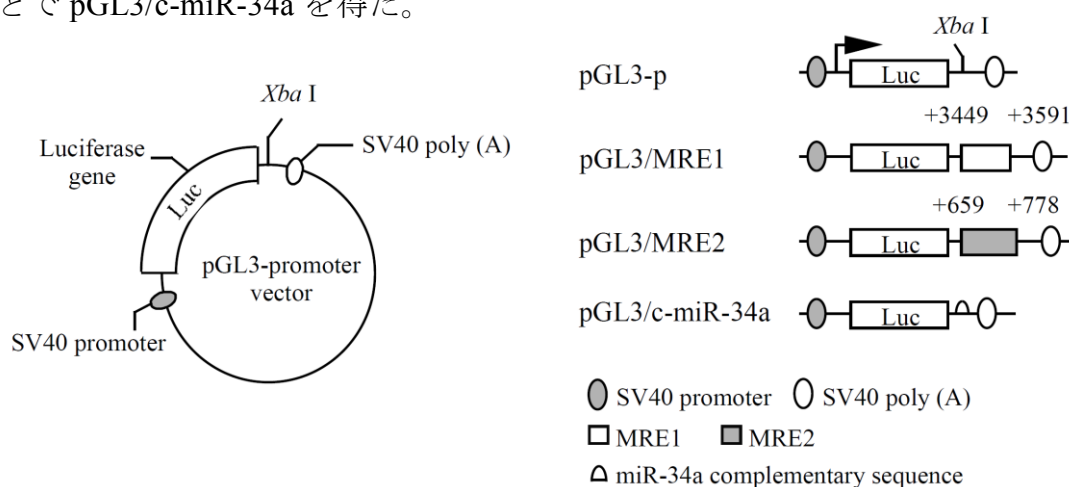


Fig. 3. Schematic representation of luciferase reporter gene constructs. Various target fragments were inserted into the *Xba* I site, downstream of the luciferase gene in the pGL3-promoter (pGL3p) vector.

I-2-4 コロニーPCR

目的の DNA 断片が挿入されていることを確認するため、pGL3-p ベクターのルシフェラーゼ遺伝子上に設計された pGL3-Lucend-S プライマー (5'-AAT CAG AGA TCC TCA TAA AG-3') (10 pmol/μL) と pGL3-p ベクターの SV40 poly (A) シグナル上に設計した SV poly (A)-AS プライマー (5'-TAC TTG CTT TAA AAA ACC TCC C-3') (10 pmol/μL) をそれぞれ 1 μL、PCR 緩衝液 2.5 μL、2.5 mM dNTP 2.5 μL、2.5 mM 塩化マグネシウム 1.5 μL、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 μL (0.1 U)、滅菌精製水を加えて全量 25 μL とした。寒天培地から単離したコロニーを突ついた滅菌爪楊枝を入れて混合し、94°C で 3 分間反応させた後、94°C で 30 秒間、54°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 30 サイクル、続いて 72°C で 3 分間反応させた。反応後、一部を分取し EtBr を含む 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

I-2-5 プラスミド DNA の大量調製

目的の DNA 断片が含まれるコロニーを、LB-Amp 培地 3 mL 中で 37°C、8 時間培養した。その培養液 50 μL に、60% (v/v) グリセロールを 50 μL 加えて、これを大腸菌のグリセロールストックとして -80°C で保存した。グリセロールストックを滅菌爪楊枝でつつき、LB-Amp 培地 25 mL で一晚 (16~20 時間) 培養した。6,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離することにより集菌し、Plasmid Midi Kit を用いプラスミドの大量調製を行った。大腸菌ペレットを 4 mL の Buffer P1 に懸濁させ、4 mL の Buffer P2 を加え転倒攪拌した後、室温で 5 分間静置した。4 mL の Buffer P3 を加え、ただちに転倒攪拌した後、氷中で 15 分間静置した。5,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した上清を 1.5 mL チューブに分注し、さらに 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離してタンパク質を取り除いた。この上清をあらかじめ Buffer QBT 4 mL で平衡化した QIAGEN-tip 100 に添着させ、Buffer QC 20 mL で洗浄した後、Buffer QF 5 mL を加えて DNA を溶出させた。3.5 mL のイソプロパノールを加え転倒攪拌した後、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後、

TE 100 μL に溶解した。プラスミドの定量には Nanodrop を用いた。

I-2-6 シークエンス解析

目的の DNA 配列が挿入されているか確認するため、I-2-5 で調製したレポータープラスミドを、以下の方法に従いシークエンス解析した。このシークエンス反応には、pGL3-p ベクターのルシフェラーゼ遺伝子上に設計された pGL3-Lucend-S プライマー (5'-AAT CAG AGA TCC TCA TAA AG-3') と pGL3-p ベクターの SV40 poly (A) シグナル上に設計した SV poly (A)-AS プライマー (5'-TAC TTG CTT TAA AAA ACC TCC C-3') を用いた。Thermo Sequence Cy5 Dye Terminator Kit または Thermo Sequence Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて以下のように反応液を調製した。Cy5 では、プラスミド 1 μL (2 μg 以上)、Reaction buffer 3.5 μL 、プライマー (10 pmol/ μL) 0.5 μL 、Thermo Sequence DNA polymerase 1 μL 、滅菌精製水を加えて全量を 27 μL とし、先に分注しておいた dNTP/Cy5-ddNTP 2 μL に 6 μL ずつ加え反応液とした。Cy5.5 では、プラスミド 1 μL (2 μg 以上)、Reaction buffer 3.5 μL 、プライマー (10 pmol/ μL) 0.5 μL 、Thermo Sequence DNA polymerase 2 μL 、滅菌精製水を加えて全量を 31.5 μL とし、先に分注しておいた dNTP/Cy5.5-ddNTP 1 μL に 7 μL ずつ加え反応液とした。サーマルサイクラーを用いて 95°C で 1 秒間反応させた後、95°C で 30 秒間、54°C で 30 秒間、72°C で 90 秒間を 45 サイクルの条件でシークエンス反応を行った。反応終了後、反応液を 1.5 mL チューブに移し各チューブに 7.5 M 酢酸アンモニウム 2 μL 、グリコーゲン溶液 2 μL 、氷冷しておいた 100%エタノール 30 μL を加え、-20°C で 20 分間放置した。その後 15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、Formamide loading dye 6 μL を加えて溶解させ、そのうち 2 μL を Long-Read Tower DNA シークエンサーにより解析した。

I-2-7 プラスミド DNA と pre-miRNA の HEK293 細胞への導入およびルシフェラーゼアッセイ法

レポータープラスミドと pre-miRNA の HEK293 細胞への導入は Lipofectamine 2000 を用いた forward transfection 法により行った。トランスフェクション効率を補正するため、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL4.74-TK) を共発現させた。Cellmatrix (新田ゼラチン, Osaka, Japan) でコラーゲンコートした 24 well プレートに HEK293 を 1×10^5 cells/well になるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。190 ng の pGL3 プラスミドおよび 10 ng の pGL4.74-TK と 25 pmol の pre-miRNA に FBS 非含有培地を加えて 50 μ L に調製した。また 1 μ L の Lipofectamine 2000 Reagent と FBS 非含有培地を合わせて 50 μ L とした溶液を別に調製し、室温で 15 分間インキュベートした。これらの溶液を混合して、さらに室温で 15 分間インキュベートした後、細胞から培地を除去し、1 well あたり 100 μ L ずつ添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で 48 時間培養した。

Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit を用い、ルシフェラーゼアッセイを行った。培養した細胞から培地を取り除き、PLB を 100 μ L/well ずつ加えて室温で 15 分間振とうし、1.5 mL のチューブに移して 15,000 rpm、1 分間遠心分離した。得られた上清を新しいチューブに回収し、これをセルライゼートとした。96 well プレートに 20 μ L ずつセルライゼートを分注した後、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタにセットし LAR II 100 μ L を添加することでホタルルシフェラーゼ活性を、Stop & Glo Reagent 100 μ L を添加することでウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。活性値はホタルルシフェラーゼの発光度をウミシイタケルシフェラーゼの発光度で除することにより求めた。

I-2-8 HepG2 細胞への pre-miRNA の導入

HepG2 細胞への pre-miRNA の導入は Lipofectamine RNAiMAX を用いた reverse transfection 法により行った。FBS 非含有培地に Lipofectamine RNAiMAX 7.5 μ L と、

150 pmol の pre-miRNA を加え、6 well プレート 1 well あたり全量 500 μ L になるようにし、室温で 20 分間インキュベートした。転倒攪拌後、6 well プレートに添加し、 5×10^5 cells/2.5 mL となるように FBS 含有培地で希釈した HepG2 細胞を加えて、5% CO₂ 存在下、37 °C で 72 時間培養した。

I-2-9 Total cell homogenate の調製とタンパク質定量

I-2-8 に準じて pre-miRNA を導入した細胞をトリプシン-EDTA 溶液で剥離して 1.5 mL チューブに回収した。3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引し、沈殿を 1 mL の PBS に懸濁した。3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引し、50 μ L の TGE 緩衝液に懸濁した。液体窒素と 37°C 温浴で凍結融解を 3 回繰り返す、テフロンホモジナイザーを使用し、氷上で 30 秒間ホモジナイズして total cell homogenate を得た。タンパク質定量は Bradford 法 (Bradford, 1976) に従い、Bio-Rad の Protein Assay kit を用いた。 γ -グロブリン溶液 0、5、10、15、20 mg/mL を検量線に、精製水で 10 倍希釈した total cell homogenate 10 μ L と精製水で 5 倍希釈した Dye Reagent (Bio-Rad) 490 μ L を混合し、室温で反応させた。595 nm の吸光度を Biotrak II plate reader (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) を用いて測定した。

I-2-10 SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

I-2-9 で調製した total cell homogenate を用い、Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、SDS-PAGE を行った。厚さ 1 mm、10%ポリアクリルアミドゲルにタンパク質を 20-30 μ g アプライした。SDS-PAGE 後、Transfer cell を用いタンパク質をアクリルアミドゲルから Immobilon-P PVDF 膜に電氣的に転写した。この際、ろ紙、アクリルアミドゲル、PVDF 膜は転写用緩衝液に浸して行った。転写後、PVDF 膜を Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Cambridge, UK) で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体反応を室温で行った。1 次抗体として、ウサギ抗ヒト

RXR α 抗体 (200 倍希釈) またはウサギ抗ヒト β -actin 抗体 (100 倍希釈) を用い、それぞれ一晩反応させた。次に、0.1% PBST で 5 分間ずつ 4 回洗浄後、2 次抗体反応を室温で行った。2 次抗体として、IRDye 680LT 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (PBST で 10,000 倍希釈) を用い、1 時間反応させた。その後、0.1% PBST で 5 分間ずつ 3 回、さらに 0.1% PBST/0.01% SDS で 5 分間洗浄し、最後に PBS で 5 分間洗浄した。バンドの検出には Odyssey インフラレッドイメージングシステム (LI-COR Biosciences) を使用し、定量には Odyssey software (ver 1.2) を用いた。

I-2-11 Total RNA の調製と cDNA への逆転写反応

細胞から培地を取り除き、RNAiso を 500 μ L/well ずつ加え、10 分間室温に放置した後、1.5 mL チューブに移した。100 μ L のクロロホルムを加え激しく攪拌し、5 分間室温に置いた後 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離した。水層を別の 1.5 mL チューブに回収し、250 μ L のイソプロパノールを加え、転倒攪拌した後室温に 5 分間放置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し、沈殿を 1 mL の 70%エタノールで洗浄した。この沈殿を風乾し、DEPC 処理精製水を加え、60 $^{\circ}$ C の水浴で 10 分間溶解させた後、260 nm における吸光度を NanoDrop により測定した。この total RNA を用いて以下のように逆転写反応を行った。Total RNA 2 μ g、ランダムヘキサマー (150 ng/ μ L) 1 μ L に DEPC 処理精製水を加えて 29 μ L とし、サーマルサイクラーを用いて 70 $^{\circ}$ C で 10 分間反応後、氷冷した。Reaction buffer for ReverTra Ace 8 μ L、10 mM dNTPs 2 μ L、ReverTra Ace (100 units/ μ L) 1 μ L を加えて全量を 40 μ L とした。30 $^{\circ}$ C で 10 分間、42 $^{\circ}$ C で 1 時間、98 $^{\circ}$ C で 10 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させ cDNA を合成した。

I-2-12 Real-time RT-PCR による mRNA 発現量の測定

I-2-11 で得た cDNA サンプル 1 μ L に、10 pmol/ μ L のセンスプライマーとアンチセンスプライマー (Table 3) をそれぞれ 0.8 μ L、ROX 0.25 μ L、SYBR Premix Ex Taq 10

μL を加え滅菌精製水で全量を 20 μL とした。反応は以下のプロトコールで行った。RXRα はホールド反応を 95°C で 1 分間行った後、解離反応を 94°C で 15 秒間、アニーリングを 62°C で 30 秒間、伸長反応を 72°C で 30 秒間とし、40 サイクル行った。β-actin はホールド反応を 95°C で 1 分間行った後、解離反応を 94°C で 20 秒間、アニーリングと伸長反応を 64°C で 20 秒間とし、40 サイクル行った。CYP26 はホールド反応を 95°C で 1 分間行った後、解離反応を 95°C で 10 秒間、アニーリングと伸長反応を 68°C で 30 秒間とし、40 サイクル行った。p21 はホールド反応を 95°C で 1 分間行った後、解離反応を 94°C で 20 秒間、アニーリングと伸長反応を 65°C で 20 秒間とし、40 サイクル行った。

Table 3. Sequence of primers used for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence
RXRα forward	5'-TGC GCA AGG ACC TGA CCT ACA C-3'
RXRα reverse	5'-GAC TCC ACC TCA TTC TCG TTC CG-3'
β-actin forward ^a	5'-TCA CCC TGA AGT ACC CCA TC-3'
β-actin reverse ^a	5'-GAT AGC ACA GCC TGG ATA GC-3'
CYP26 forward	5'-CCG CTG CTG CTC TTC CTG GCT GCG A-3'
CYP26 reverse	5'-GAC CGA CAC CAG CCG GTC GTC TCC GA-3'
p21 forward ^b	5'-CTG TCA CTG TCT TGT ACC CTT GTG C-3'
p21 reverse ^b	5'-GGA GAA GAT CAG CCG GCG TTT G-3'

^aOda et al (2012); ^bTakagi et al (2009).

I-2-13 RXRα mRNA 安定性の評価

I-2-8 に準じて pre-miRNA を導入した HepG2 細胞に同時に 10 μg/mL の α-アマニチンを処置し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。3、6、9、12 時間後、I-2-11 に準じて total RNA を調製および cDNA への逆転写反応を行い、I-2-12 に従って RXRα mRNA 発現量を測定した。

I-2-14 核の単離と Nuclear run-on assay

I-2-8 に準じて pre-miRNA を導入した HepG2 細胞を 5% CO₂ 存在下、37°C で 48 時間培養し、トリプシン-EDTA 溶液で剥離して 1.5 mL チューブに回収した。3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引し、沈殿を 1 mL の PBS に懸濁した。3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引し、CER I 緩衝液を 100 µL/40 mg cells で加え激しく攪拌し、10 分間氷上でインキュベートした後、CER II 緩衝液を 5.5 µL/40 mg cells で加え激しく攪拌した。1 分間氷上でインキュベートした後、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を除去して核を単離し、300 µL の Transcription 緩衝液に懸濁した。RNase A Solution (50 µg/mL) 1 µL を加え、37°C で 20 分間反応させた後、RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 units/µL) 2.5 µL を加え、37°C で 5 分間反応させ RNase A を失活させた。Ribonucleotide Solution Mix (80 mM each rNTP) 1 µL を加え、25°C で 30 分間反応させ mRNA の *de novo* 合成を行った。RNAiso を 1 mL 加え、I-2-11 に準じて total RNA の調製および cDNA への逆転写反応を行い、I-2-12 に従って RXRα mRNA 発現量を測定した。

I-2-15 CYP26 mRNA の誘導と CYP3A4 プロモーターの転写活性の評価

I-2-8 に準じ、HepG2 細胞に pre-miRNA を導入し、5% CO₂ 存在下、37°C で 72 時間培養後、DMSO に溶解した atRA および 9-*cis*-RA を最終濃度がそれぞれ 1 nM および 2 nM になるように添加した培地に交換し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。コントロールとして 0.1% DMSO を同様に処置した。I-2-11 に準じて total RNA を調製および cDNA への逆転写反応を行い、I-2-12 に従って CYP26 mRNA 発現量を測定した。

CYP3A4 プロモーターの転写活性に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響における検討では、290 ng の pCYP3A4-362-7.7K、10 ng の pRL-SV40 と 10 pmol の pre-miRNA に、DNA : TransFast Transfection Reagent = 1 : 6 になるように TransFast Transfection Reagent を添加し、FBS 非含有培地を加えて 200 µL とした。室温で 20 分間インキ

ュベートして複合体を形成させた後、細胞から培地を除去し、1 well あたり 200 μL ずつ入れて 5% CO_2 存在下 37°C で培養した。48 時間後、DMSO に溶解した rifampicin を最終濃度が 10 μM になるように添加した培地に交換し、5% CO_2 存在下、37°C で 24 時間培養した。コントロールとして 0.1% DMSO (v/v) を同様に処置した。I-2-7 に従ってルシフェラーゼアッセイを行った。

I-2-16 細胞へのエトポシド処置

I-2-2 に準じ、HepG2 細胞および HuH7 細胞を 5% CO_2 存在下、37°C で 48 時間培養した。最終濃度が 1 μM になるようエトポシドを添加した培地に交換し、5% CO_2 存在下、37°C で 48 時間培養した。I-2-11 に準じて total RNA を調製および cDNA への逆転写反応を行い、I-2-12 に従って p21 mRNA 発現量を測定した。また I-2-9 に準じて細胞を回収し total cell homogenate を調製し、I-2-10 に従って RXR α タンパク質発現量を測定した。

I-2-17 Real-time RT-PCR による mature miR-34a 発現量の測定

TaqMan MicroRNA Assay を用いた real-time RT-PCR 法により mature miR-34a を測定した。I-2-16 で得た total RNA から TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成した。Total RNA 75 ng、100 mM dNTPs 0.075 μL 、Reverse Transcription Buffer 0.75 μL 、MultiScribe Reverse Transcriptase 0.5 μL 、RNase Inhibitor 0.095 μL 、miR-34a 用 RT primer 1.5 μL 、Nuclease-free water を加え全量 7.5 μL とし、5 分間氷冷した。その後、16°C で 30 分間、42°C で 30 分間、85°C で 5 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させ cDNA を合成した。得られた cDNA サンプル 1.33 μL に、TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μL 、TaqMan MicroRNA Assay mix 1 μL 、Nuclease-free water を加え全量 20 μL とした。反応は以下のプロトコールで行った。ホールド反応を 95°C で 10 分間行った後、解離反応を 95°C で 15 秒間、アニーリングと伸長反応を 60°C で 60 秒間とし、40 サイクル行った。U6 small nuclear RNA (U6

snRNA) についても同様に行った。

II-2-18 ヒト肝サンプルにおける RXR α タンパク質および mature miR-34a 発現量の測定

ヒト肝サンプルを用いた実験は金沢大学および岩手医科大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て行った。ヒト肝サンプルは岩手医科大学 医学部法医学講座教授の青木 康博博士および富山大学大学院 医学薬学研究部病理診断学准教授の常山 幸一より御供与頂いた。ドナー情報は Table 4 にまとめた。

Table 4. Characteristics of 14 donors used in the present study.

	No.	Age (yr)	Sex	Fibrosis	Diagnosis
Normal liver	1	82	F	None	Mild fatty degeneration around central vein Nuclear glycogen deposition Lung cancer without liver metastasis
	2	68	F	None	Death from cold
	3	72	F	None	Asphyxia
	4	72	M	None	Bile duct cancer
	5	83	M	None	Acute myocardial infarction
	6	64	F	None	Colorectal cancer with liver metastasis
Fibrotic liver	7	78	F	Mild	Mild hepatic congestion Multiple myeloma without liver metastasis
	8	49	F	Severe	Primary biliary cirrhosis
	9	70	F	Mild	Moderate hepatic congestion Mild fatty liver Acute myocardial infarction
	10	78	M	Severe	Hepatocellular carcinoma with cirrhosis (hepatitis C virus positive)
	11	75	M	Severe	Hepatocellular carcinoma with cirrhosis
	12	55	M	Mild	Mild alcoholic liver fibrosis
	13	62	M	Severe	Alcoholic cirrhosis
	14	61	F	Severe	Primary biliary cirrhosis

肝約 1 g に、3 倍容のホモジナイズ用緩衝液を加え、テフロン potter 型ホモジナイザーで 3 ストローク処理し、total cell homogenate を得た。タンパク質濃度は I-2-9

に準じて測定し、I-2-10 に準じタンパク質を 30 μ g アプライして、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った。

肝約 50 mg に RNAiso を 1 mL 加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズした後、1.5 mL チューブに回収した。I-2-11 に準じて total RNA の調製し、I-2-17 に準じて mature miR-34a 発現量を測定した。

I-2-19 統計解析

二群間の比較は Student's *t*-test により、多群間の比較は One-way ANOVA と Tukey's test により解析した。正常肝サンプルと線維化肝サンプルにおける mature miR-34a および RXR α タンパク質発現量の比較は Mann-Whitney' U test により、相関関係は Spearman's product-moment method により解析した。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意とした。

第3節 実験結果

I-3-1 ルシフェラーゼアッセイによる MRE の同定

コンピュータ解析により RXR α の mRNA に見出された MRE が機能的であるか調べるために、HEK293 細胞に作製したレポータープラスミドを導入し、miR-34a 過剰発現の影響を検討した。Pre-miR-34a の導入により pGL3/c-miR-34a では活性がコントロールの 13%まで低下したことから、導入した pre-miR-34a が機能的に働いていることが示された (Fig. 4)。しかし、3'-UTR に存在する MRE1 を含む断片を組み込んだプラスミドにおいては活性の低下は認められなかった。一方、翻訳領域に見出された MRE2 を含む断片を組み込んだプラスミドにおいては有意な活性の低下が認められた。従って、MRE2 が miR-34a 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された。

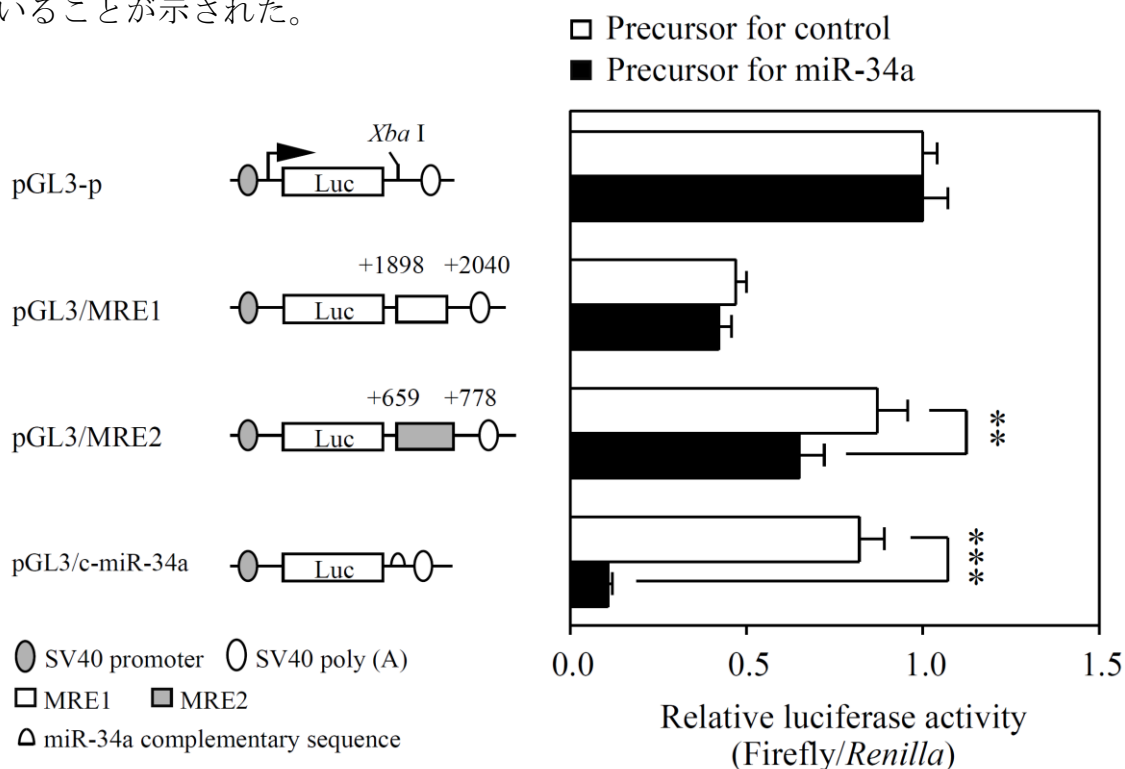


Fig. 4. Effects of overexpression of miR-34a on luciferase activity in HEK293 cells. The reporter plasmids (190 ng) were transiently transfected with pGL4.74-TK vector (10 ng) and 50 nM precursors for miR-34a or negative control #1 (control) into HEK293 cells. The firefly luciferase activities for each construct were 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 of three independent experiments. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ by Student's t-test.

I-3-2 HepG2 細胞における RXR α タンパク質発現量に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

Pre-miR-34a (50 nM) を HepG2 細胞に導入し、72 時間後における RXR α 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. 5)。その結果 RXR α タンパク質発現量は、pre-miR-34a の導入により有意に低下した (コントロールの 49%)。従って miR-34a が RXR α の発現制御に関わることが示唆された。

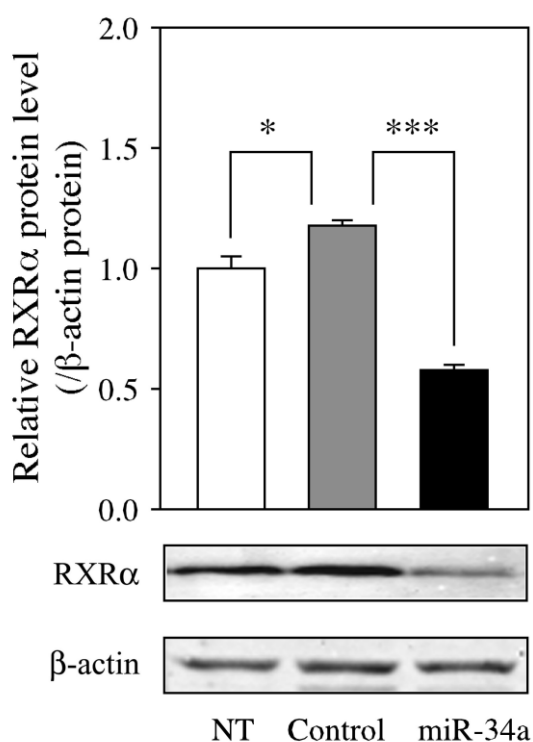


Fig. 5. Effects of overexpression of various miRNA on expression level of endogenous RXR α protein in HepG2 cells. The precursor for miR-34a and negative control #1 (control) (50 nM) were transfected into the cells. After 72 hr, the cells were harvested and total cell homogenates (20 μ g) were subjected to Western blot analysis. RXR α protein levels were normalized with the β -actin protein levels. Values are expressed as percentages relative to no transfection (NT). Data are the means \pm SD of three independent experiments. * P < 0.05 and *** P < 0.001 by Student's t-test.

I-3-3 HepG2 細胞における RXR α mRNA 発現量に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

miR-34a による RXR α タンパク質発現量の低下が、RXR α mRNA 発現量の低下に起因するものか調べるため、miR-34a 過剰発現時の RXR α mRNA 発現量を調べた (Fig. 6)。negative control #1 を導入した場合には、RXR α mRNA 発現量は導入後 6 時間と比べて 12 時間で 2 倍、24 時間で 3.5 倍に上昇した後、48 時間でプラトーとなり 72 時間以降では時間依存的に低下した。24、48、72 時間後において、コントロールと比べて pre-miR-34a 導入により RXR α mRNA 発現量の有意な低下が認められた。従って、miR-34a は転写を抑制あるいは mRNA の分解を亢進することで RXR α

の発現を制御していることが示唆された。

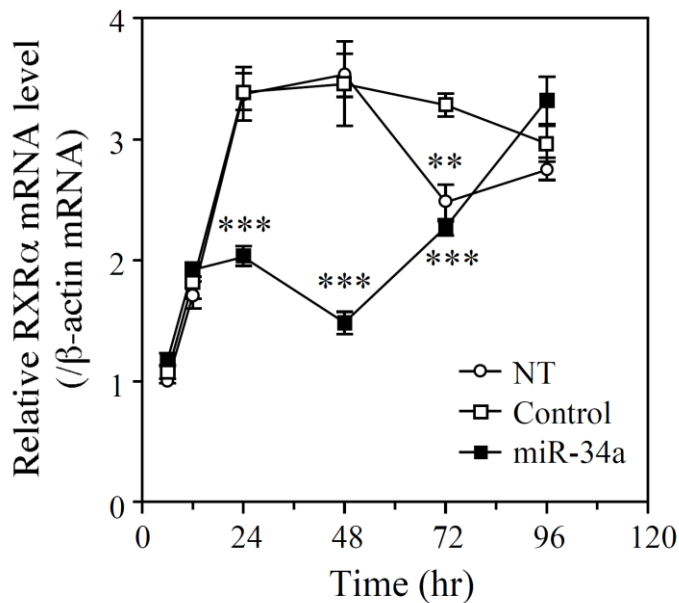


Fig. 6. Effects of overexpression of miR-34a on expression level of endogenous RXR α mRNA in HepG2 cells. The precursor for miR-34a and negative control #1 (control) (50 nM) were transfected into the cells. After the indicated times, the cells were harvested and total RNA were isolated. RXR α mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with the β -actin mRNA levels. Values are expressed as percentages relative to no transfection (NT) at time 6. Data are the means \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control by Student's t-test.

I-3-4 HepG2 細胞における RXR α mRNA の安定性に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

miR-34a による RXR α mRNA 発現量の低下が、mRNA 分解の亢進によるものか調べるため、転写阻害剤である α -アマニチンを処置し、RXR α mRNA の発現変動を評価した (Fig. 7)。処置後 3 時間と比較して、negative control #1 を導入した場合には RXR α mRNA 発現量は 6 時間後、90%まで低下した。pre-miR-34a を導入した場合には 73%まで低下し、その低下率に有意差が認められた。9 時間後、negative control #1 を導入した場合には RXR α mRNA 発現量は 75%まで低下したが、pre-miR-34a を導入した場合には 61%まで低下し、その低下率に有意差が認められた。12 時間後、negative control #1 を導入した場合には RXR α mRNA 発現量は 76%まで低下したが、pre-miR-34a を導入した場合には 58%まで低下し、その低下率に有意差が認められた。RXR α mRNA 発現量の半減期は、negative control #1 を導入した場合には約 19 時間、Pre-miR-34a を導入した場合には約 12 時間であった。従って、miR-34a は mRNA の分解を亢進することで RXR α の発現を制御していることが示唆された。

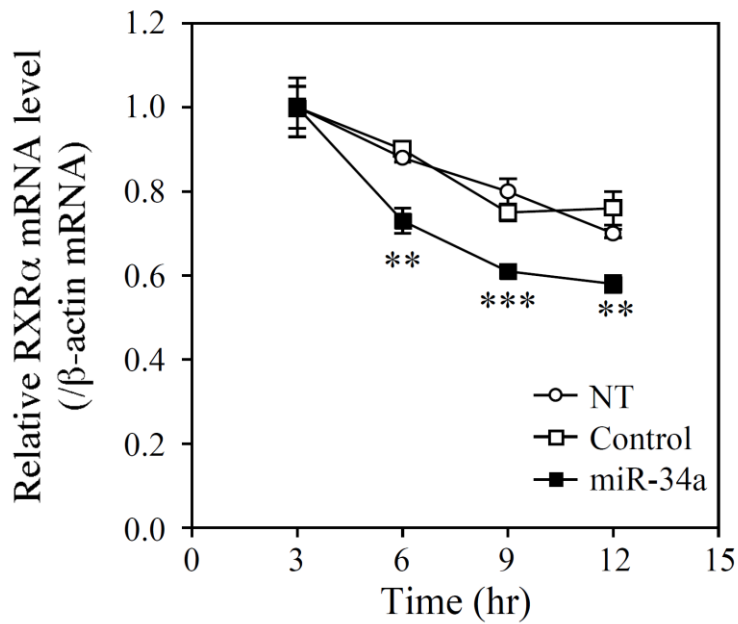


Fig. 7. Effects of overexpression of miR-34a on stability of RXR α mRNA in HepG2 cells. The cells transfected with the precursor for miR-34a and negative control #1 (control) (50 nM) were simultaneously treated with 10 μ g/mL α -amanitin. After the indicated times, the cells were harvested and total RNA were isolated. RXR α mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with the β -actin mRNA levels. Values are expressed as percentages relative to the value at time 3. Data are the means \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with the precursor for control by Student's t-test.

I-3-5 HepG2 細胞における RXR α の転写に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

miR-34a による RXR α mRNA 発現量の低下が、転写能の低下によるものか調べるため、Nuclear run-on assay を行った (Fig. 8)。転写反応前と転写反応後における RXR α mRNA 量を比較した時、上昇率は NT (no transfection)、negative control #1 または pre-miR-34a を導入したいずれにおいても同程度であった。従って、miR-34a は RXR α の転写能に影響を与えているわけではないことが示唆された。

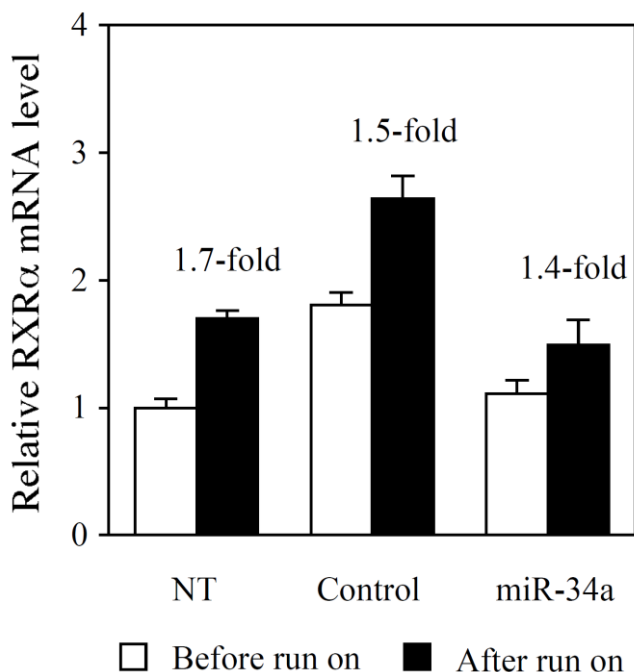


Fig. 8. Effects of overexpression of miR-34a on RXR α mRNA transcription in HepG2 cells. The precursor for miR-34a and negative control #1 (control) (50 nM) were transfected into the cells. After 48 hr, the cells were harvested and nuclei (15 mg) were used for Nuclear run-on assay. The *de novo* expression levels of RXR α mRNA were determined by real-time RT-PCR. Values are expressed as percentages relative to no transfection (NT) before run on. Data are the means \pm SD of three independent experiments.

I-3-6 CYP26 mRNA 誘導能およびCYP3A4 転写活性に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

CYP26 はレチノイン酸処置により RAR/RXR α ヘテロダイマーを介して誘導されることが知られている (White et al., 1997)。そこで、miR-34a による RXR α タンパク質の発現抑制が CYP26 mRNA の誘導能に影響を及ぼすかどうか、pre-miR-34a を導入して検討を行った (Fig. 9A)。RAR のリガンドである atRA または RXR α のリガンドである 9-*cis*-RA を処置することにより、CYP26 mRNA は有意に誘導された (3.2 倍と 4.9 倍)。一方、pre-miR-34a の導入により、リガンド処置による CYP26 mRNA の誘導能は消失した (1.6 倍と 1.1 倍)。

同様に、もう1つのヘテロダイマーパートナーPXRの下流遺伝子であるCYP3A4への影響も調べた。HepG2細胞ではCYP3A4 mRNAの発現量が低く、誘導も認められなかったため、CYP3A4遺伝子上流のPXR/RXR α の結合領域を組み込んだレポータープラスミドを用いて転写活性化能を評価した (Fig. 9B)。PXRのリガンドであるリファンピシンを処置することにより、CYP3A4の転写活性の有意な上昇が認められたが (4.1倍)、miR-34aの過剰発現によりその上昇は完全に消失した (1.2倍)。以上より、miR-34aはヘテロダイマーパートナーに関わらずRXR α の下流遺伝子の誘導に影響を及ぼすことが示された。

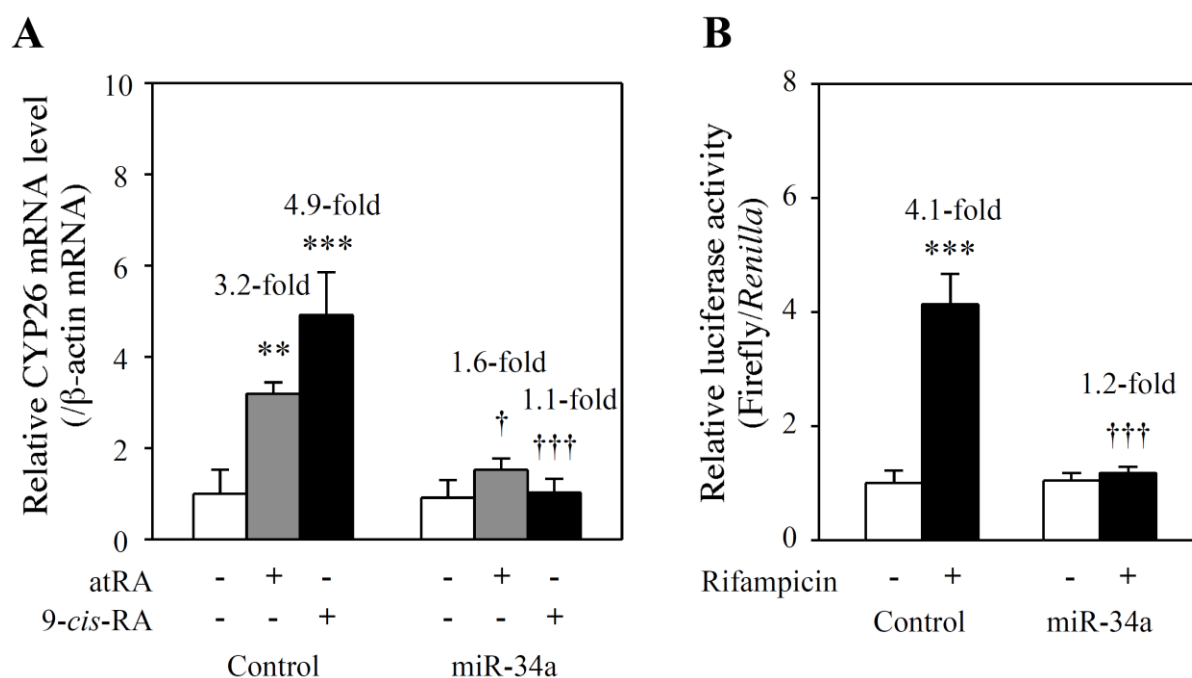


Fig. 9. Effects of overexpression of miR-34a on induction of CYP26 and transactivity of CYP3A4 in HepG2 cells. (A) The precursor for miR-34a or control (50 nM) was transfected into HepG2 cells. After 72 h, the cells were exposed to 1 nM atRA, 2 nM 9-cis-RA, or 0.1% DMSO for 24 h, and the total RNA was then prepared. The CYP26 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the β -actin mRNA levels. (B) The reporter plasmid pCYP3A4-362-7.7K (290 ng) was transiently transfected with the pRL-SV40 plasmid (10 ng) and the precursors for miR-34a or control into HepG2 cells. After 48 h, the cells were treated with 10 μ M rifampicin for 24 h, and the luciferase activity was measured. The values are expressed as percentages relative to that of the precursor for control (-). Data are the means \pm SD of three independent experiments. ** P < 0.01 and *** P < 0.001, compared with vehicle treatment (-); † P < 0.05 and ††† P < 0.001 compared with the precursor for control.

I-3-7 RXR α タンパク質発現量に及ぼす p53 活性化の影響

ここまでの検討で、ヒト RXR α の発現制御に miR-34a が関わっていることを明らかにした。miR-34a は癌抑制遺伝子 p53 の下流遺伝子であり、p53 の活性化により miR-34a の発現が誘導される (Raver-Shapira et al., 2007)。近年、p53 が線維化の促進に関与する connective tissue growth factor の発現を誘導することで肝線維化の進行に関与するということが報告された (Kodama et al., 2011)。興味深いことに、肝線維症モデルラット (50% CCl₄ in vegetable oil 1.5 mL/kg, *p.o.*, 8 week) では RXR α タンパク質発現量が正常ラットより低値を示すことが報告されている (Wang et al., 2011)。一方、レンチウイルスベクターを用いて肝線維症モデルラットに RXR α を過剰発現させると肝線維化のマーカーであるコラーゲンの低下が認められることから、RXR α は肝線維化に対して保護的に働くことが報告されている (Wang et al., 2011)。以上より、miR-34a を介した RXR α の発現低下は肝線維化の進行に関与している可能性が考えられた (Fig. 10A)。

そこで、p53 活性化による miR-34a の発現誘導が RXR α タンパク質発現量に影響を及ぼすか、p53 活性化能を有するエトポシドを HepG2 細胞 (野生型 p53 発現細胞株) に処置し検討を行った。Fig. 10B に示すように、エトポシドの処置により p53 の下流遺伝子である p21 mRNA 発現量の 9.9 倍の上昇が認められ、p53 が活性化されていることが示された。またその時、mature miR-34a 発現量も有意な上昇 (1.5 倍) を示し (Fig. 10C)、RXR α タンパク質発現量の有意な低下 (82%) が認められた (Fig. 10D)。続いて変異型 p53 発現細胞株である HuH7 細胞にエトポシドを処置し同様の検討を行った。HepG2 細胞と異なり、HuH7 細胞では p21 mRNA、mature miR-34a 発現量、RXR α タンパク質発現量に変化は認められなかった (Fig. 10E-G)。以上より、p53 の活性化を介した miR-34a の誘導は RXR α の発現を低下させることが示唆された。

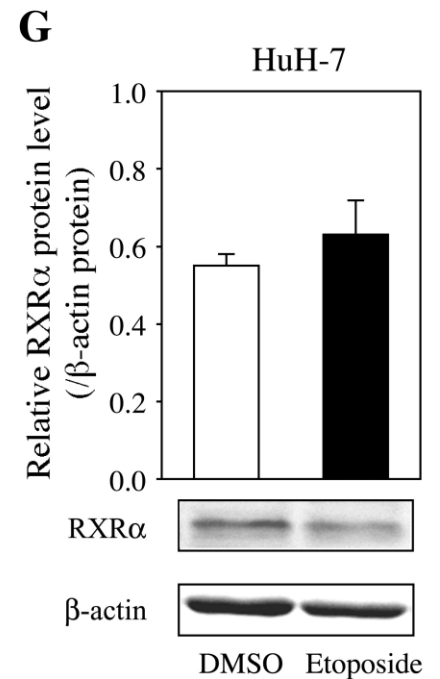
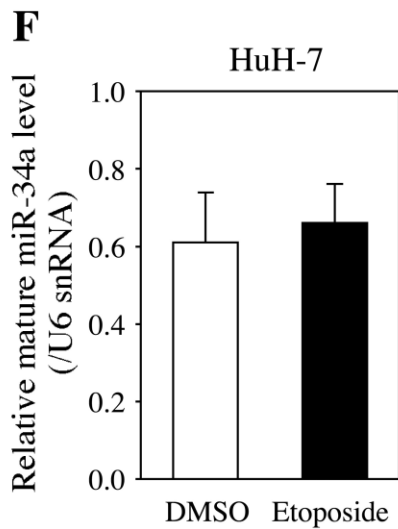
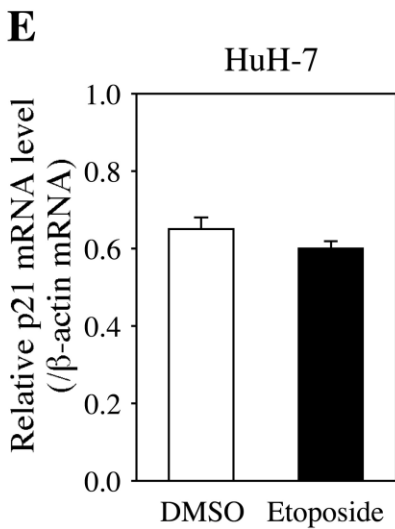
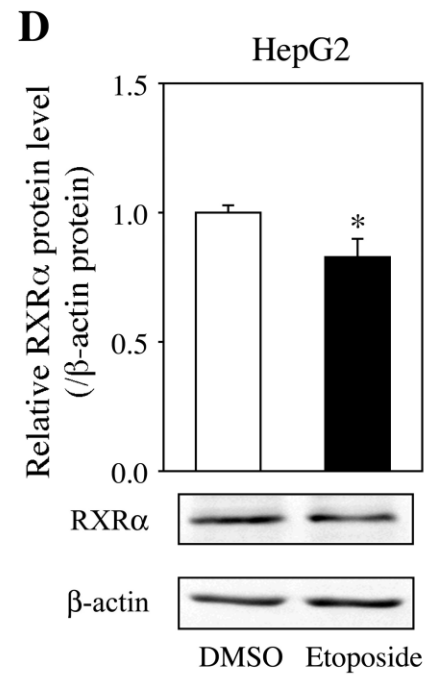
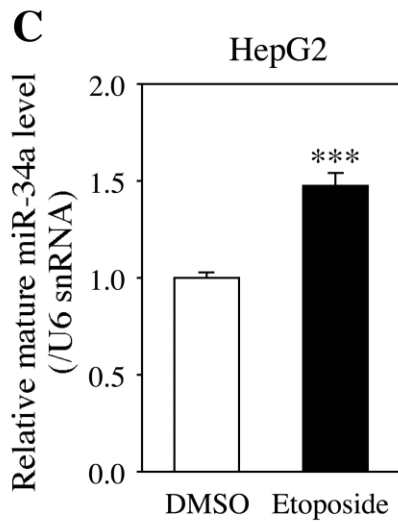
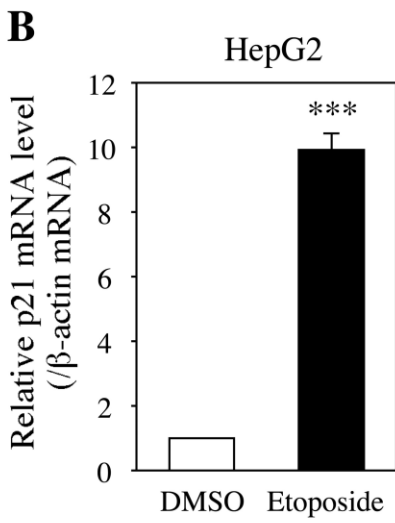
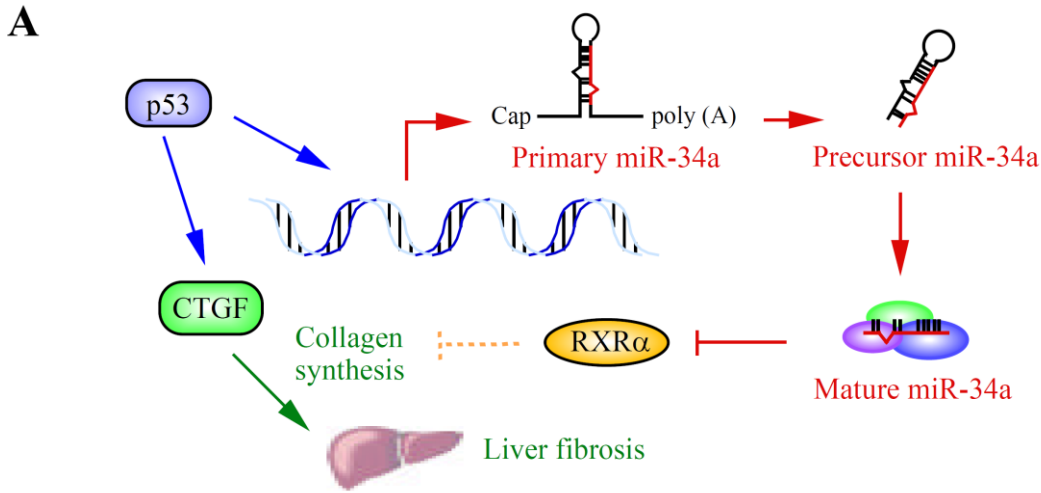


Fig. 10. Effects of induction of miR-34a through p53 activation on expression of endogenous RXR α protein in HepG2 and HuH-7 cells. (A) Schema showing previous findings and new insights on the progression of liver fibrosis through p53 activation. (B-E) HepG2 and HuH-7 cells were treated with 1 μ M etoposide or 0.1% DMSO for 48 h, and the total RNA and total cell homogenates were isolated. (B and E) The p21 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the β -actin mRNA levels. (C and F) The mature miR-34a levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the U6 snRNA levels. (D and G) The RXR α protein levels were determined by Western blot analysis and normalized to the β -actin protein levels. The values are expressed as percentages relative to that of HepG2 cells treated with DMSO. Data are the means \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the DMSO treatment by Student's t-test.

I-3-8 線維化の認められる肝における mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量の解析

miR-34a による RXR α の発現制御と肝線維化との関連を明らかにするため、線維化ヒト肝サンプルを用いて mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量を測定し、正常肝サンプルと比較した。正常肝組織と比べて線維化の認められる肝組織では mature miR-34a は有意ではないものの ($P = 0.08$) 高値を示す傾向が認められ (Fig. 11A)、一方、RXR α タンパク質発現量は有意に ($P < 0.05$) 低い値を示した (Fig. 11B)。また、mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量との間には有意な ($R_s = -0.79, P < 0.001$) 逆相関関係が認められた (Fig. 11C)。従って、miR-34a の高発現が RXR α による保護作用を破綻させ、線維化の悪化に関与していることが示唆された。

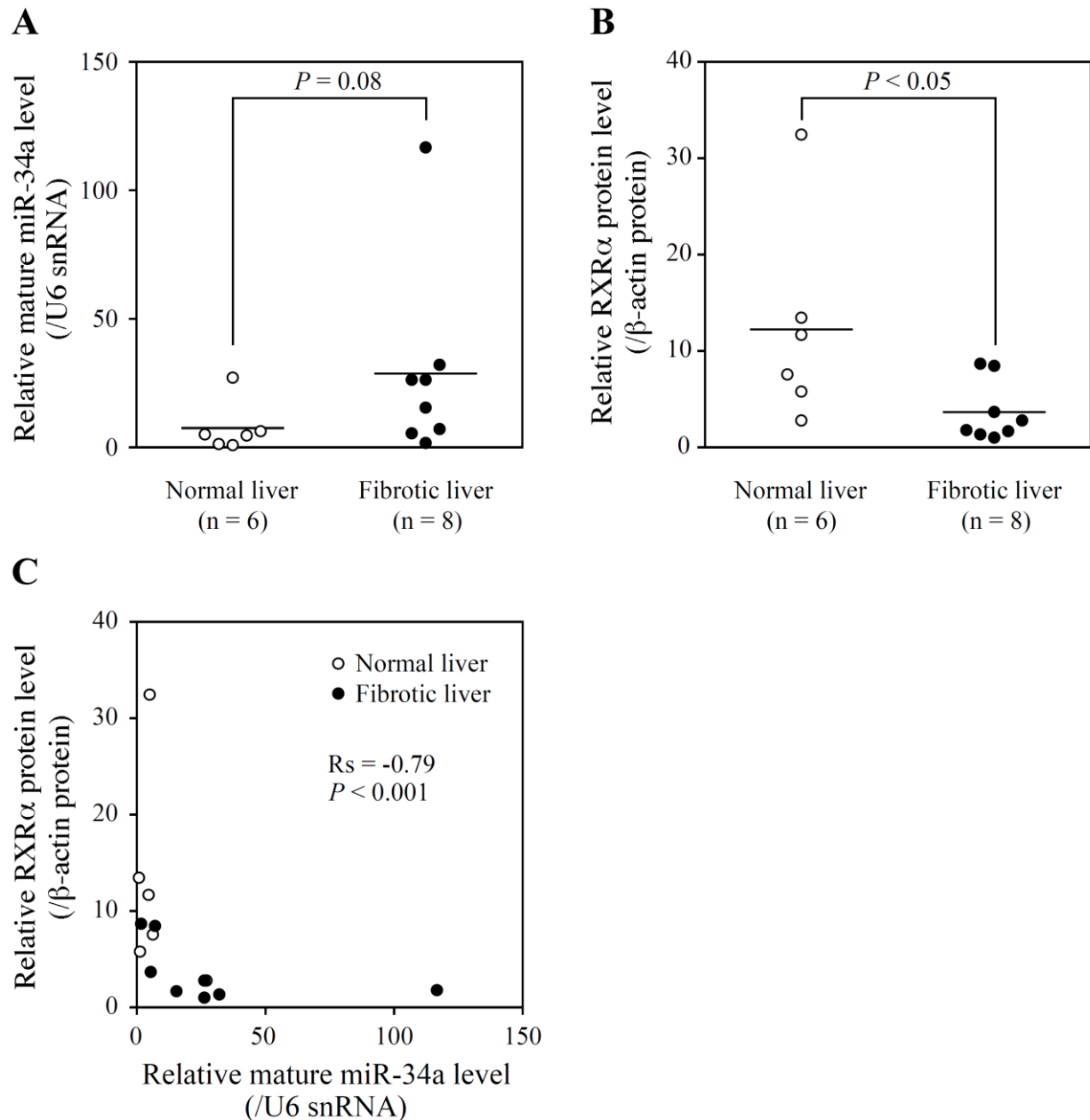


Fig. 11. Expression levels of mature miR-34a and RXR α protein in fibrotic and normal human livers and their relationship. (A) The mature miR-34a levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the U6 snRNA levels. The bars represent the means. (B) The RXR α protein levels were determined by Western blot analysis and normalized to the β -actin protein levels. The bars indicate the means of each group. (C) Relationship between the mature miR-34a and RXR α protein levels. The values are expressed as percentages relative to the lowest value. Each point represents the mean of two independent experiments.

第4節 考察

本章では RXR α の発現調節に miR-34a が関与する可能性を検討した。哺乳類の場合、miRNA は標的 mRNA の主に 3'-UTR に結合して標的遺伝子の発現を負に制御する (Wu et al., 2004)。3'-UTR の MRE を探すプログラム TargetScan を用いて、RXR α mRNA の 3'-UTR に MRE が存在するか検討したところ、1 つ認められた (MRE1)。しかし、その MRE1 は機能的でないことがルシフェラーゼアッセイにより示された (Fig. 4)。miRNA は翻訳領域の MRE にも機能的に働くことが報告されている (Tay et al., 2008)。そこで、翻訳領域についても MRE を探索できるプログラム RNA22 を用いて、RXR α の翻訳領域に MRE が存在するか検討したところ、1 つ認められ (MRE2)、その MRE2 が機能的であることが示された。miR-34a との相補性は MRE1 (-38.6 kcal/mol) の方が MRE2 (-27.9 kcal/mol) より高かった。したがって、MRE が機能的かどうかを miRNA との相補性のみから判断することはできない。このことは以前より報告されていることと一致する (Xia et al., 2009)。一般にコンピュータ解析による MRE の同定は偽陽性の確率が高いとされている (Alexiou et al., 2009)。予測プログラムはそれぞれで用いるアルゴリズムが異なっており、探索方法やそれにより予測される miRNA の数も多岐にわたる。また、miRNA が mRNA を認識する際、mRNA の 2 次構造も重要であるが、コンピュータ解析による MRE の同定の際には考慮されていない。より精度の高いアルゴリズムの構築が求められており、そのためには機能的な MRE とそうでないものの条件など、基礎的な情報を蓄積する必要があると考えられる。

HepG2 細胞に miR-34a を過剰発現させたところ、RXR α タンパク質発現量の低下が認められた (Fig. 5)。また、RXR α mRNA 発現量の低下が認められた (Fig. 6) ことから、miR-34a による RXR α タンパク質発現量の低下は mRNA 発現量の低下に伴うものであることが示唆された。この時、RXR α mRNA の安定性が低下し (Fig. 7)、RXR α の転写能には影響が認められなかったこと (Fig. 8)、から、miR-34a は mRNA の分解を亢進することで RXR α の発現を制御していることが示された。miRNA が翻訳領域の MRE を認識する場合、翻訳抑制ではなく、mRNA の分解を介して標的遺

伝子の発現を制御することが報告されている (Duursma et al., 2008; Ott et al., 2011)。当研究室においても miR-24 が HNF4 α の翻訳領域に存在する MRE を認識して mRNA の分解を亢進することを明らかにしている (Takagi et al., 2010)。本検討の結果は、翻訳領域の MRE が機能的である場合、mRNA の分解が発現制御メカニズムであることを支持するものとする。

miR-34a が RXR α の下流遺伝子に及ぼす影響について検討した際、miR-34a の過剰発現により、リガンドによる CYP26 mRNA の誘導が消失した (Fig. 9A)。9-*cis*-RA は RAR よりも RXR α に高い親和性を示すが、atRA は RAR にのみ親和性を示す (Marill et al., 2003)。従って、ヘテロダイマーパートナーのリガンドの場合であっても miR-34a による RXR α の発現抑制は下流遺伝子の誘導に影響を及ぼすと予想される。このことは、PXR のリガンドであるリファンピシン処置により上昇した CYP3A4 転写活性が miR-34a の過剰発現により消失したこと (Fig. 9B) からも支持される。CYP3A4 は市場の医薬品の 50% 以上を代謝することから、miR-34a は薬物代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。加えて、RXR α が脂肪酸やコレステロールの代謝に関与していることから (Wan et al., 2000)、miR-34a は脂質代謝も制御しているかもしれない。

p53 活性化能を有する etoposide を HepG2 細胞 (野生型 p53 発現細胞株) に処置した時、mature miR-34a 発現量の有意な上昇が認められ (Fig. 10C)、RXR α タンパク質発現量は有意に低下した (Fig. 10D)。HuH7 細胞 (変異型 p53 発現細胞株) ではこのような現象は認められなかったことから、p53 の活性化を介した miR-34a の発現誘導が RXR α タンパク質発現量の低下に関与していることが示唆された。p53 は DNA 損傷、活性酸素種、低酸素状態で活性化することから、RXR α の発現はストレス下で制御されている可能性が考えられる。

正常肝組織と比べて線維化の認められるヒト肝組織では RXR α タンパク質発現量は低値を示すことを初めて明らかにした (Fig. 11B)。一方、mature miR-34a 発現量は高値を示す傾向が認められ (Fig. 11A)、mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量の間には有意な逆相関が認められた (Fig. 11C)。従って、肝線維化に伴う RXR α の発現変動の背景に miR-34a による発現制御が関与していることが示唆された。本検

討で用いた線維化ヒト肝サンプルには、線維化の程度が軽度なもの (n = 3) と重度なもの (n = 5) が存在した (Table 4)。しかし、線維化の程度と mature miR-34a または RXR α タンパク質発現量との間に有意な関係は認められなかった (data not shown)。miR-34a は肝線維化の発症または進行に関与している可能性が考えられる。RXR α による肝線維化の抑制機構は不明であるが、atRA を処置するとコラーゲン合成に関与する activator protein 1 経路が抑制され、RXR α アンタゴニスト処置によりその抑制は減弱することが報告されている。今後、miR-34a による RXR α の発現制御が I 型コラーゲンなどの線維化マーカーに与える影響について検討していく必要があると考える。本検討により、miR-34a は肝線維化に対しても重要であることが示唆された。

ラット肝星細胞において RXR α の発現が miR-27a/b により制御されることが報告されている (Ji et al., 2009)。miR-27a/b の seed sequence はラット RXR α mRNA との相補性が 8 塩基と高く、MRE の配列がヒトとラットで保存されていることから、ヒト RXR α の発現調節においても機能的に働く可能性があると考えられた。しかし、HepG2 細胞に miR-27b を過剰発現させたところ、ヒト RXR α タンパク質発現量の低下は認められなかった (data not shown)。miRNA に認識される標的遺伝子の配列を組み込んだ sponge と呼ばれる発現プラスミドを細胞へ導入すると、内因性の標的遺伝子への miRNA の作用が減弱することが知られていることから (Ebert et al., 2010)、HepG 細胞では miR-27b で制御される他の因子が多く存在し RXR α への作用を減弱させている可能性が考えられる。

以上、本章では miR-34a が RXR α の発現を mRNA の分解により負に制御しており、それが RXR α の下流遺伝子の誘導能に影響を及ぼすことを明らかにした。これまで、miR-34a の機能は癌領域を中心に研究されてきたが、今回の検討により薬物代謝や肝線維化の発症、進行にも関与するという新たな知見を得た。

第 II 章 miR-34a ノックダウンの肝線維化への影響

第 1 節 緒言

肝線維症は肝細胞障害に対する創傷治癒の結果、I型コラーゲンなどの細胞外マトリックスが過剰に蓄積した病態である。肝線維症が進行すると肝硬変、肝癌へと進展するが、現在までに有効な治療法が確立されていない。これまで miRNA を治療標的とする試みがいくつかなされている (Takeshita et al., 2010; Liu et al., 2011)。例えば、miR-122 は C 型肝炎ウイルスの複製に必要とされるものであるが、C 型肝炎ウイルスを感染させたチンパンジーにアンチセンスオリゴを投与して miR-122 をノックダウンすると、ウイルス数の低下および肝機能の回復が認められたことが報告されている (Lanford et al., 2010)。I 章で述べたように、miR-34a の発現量は肝線維化に伴い上昇することから、miR-34a ノックダウンの肝線維化への影響を検討することは肝線維症を治療する上で有用と考える。

未修飾の RNA は生体内でヌクレアーゼにより速やかに分解されることが知られている。2'-O-メチル化やホスホロチオエート化といった化学修飾はヌクレアーゼに対する安定性を向上させることから、現在アンチセンスオリゴの修飾に広く用いられている。しかし、このような分子はその極性の高さから細胞膜透過性が乏しく、腎クリアランスを受けて速やかに体外に排泄されてしまうため、目的の細胞への導入効率の悪さが課題になっている。Multifunctional envelope-type nano device (MEND) は北海道大学の原島 秀吉教授らによって開発された pH 応答性カチオン性膜脂質である。血中では、MEND は電氣的に中性を示し、ApoE タンパク質と結合して low density lipoprotein receptor を発現する肝実質細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれる (Fig. 12)。エンドソームの成熟化に伴ってエンドソーム内が酸性化すると、MEND はカチオン性に変化しエンドソーム膜との静電的に相互作用して予め内封したおいた核酸を細胞質に効率良く送達することが可能である。

本章では、肝線維化を引き起こす化学物質として頻用されている CCl₄ を用いて肝線維化モデルマウスを作製し、miR-34a に対するアンチセンスオリゴを封入した

MEND を投与し、miR-34a ノックダウンの肝線維化への影響を検討した。

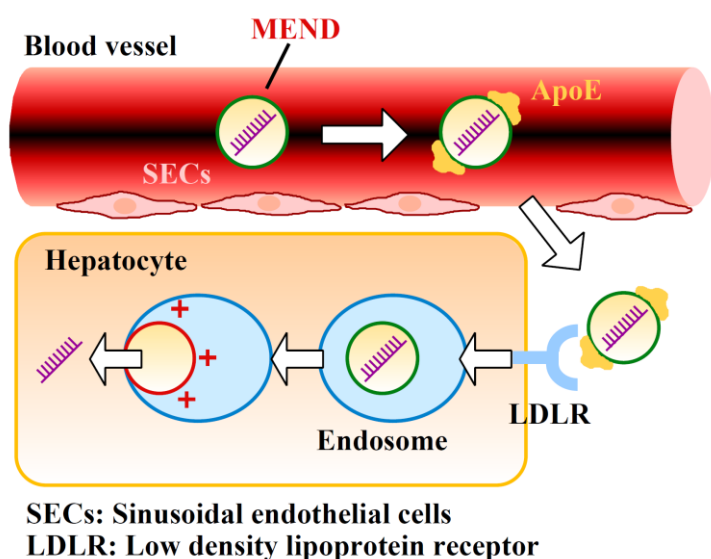


Fig. 12. Delivery of nucleic acid by MEND. MEND have the potential to behave as neutral liposomes in blood vessel, acquiring apoE. MEND is taken up by hepatocytes through LDLR-mediated endocytosis. After uptake, the membrane structure of MEND changes in response to endosomal acidification. Nucleic acid encapsulated in MEND is released from endosome via membrane fusion.

第 2 節 実験材料および実験方法

II-2-1 実験材料および使用機器

CCl₄、オリーブ油、マイヤーヘマトキシリン溶液、エオジン溶液、ファストグリーン FCF、ワンギーソン液 P は和光純薬工業より購入した。ALT 値測定用の富士ドライケムスライドは富士フィルム (Saitama, Japan) より購入した。Direct red 80 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。Optimal cutting temperature (O.C.T) compound はサクラファインテックジャパン (Tokyo, Japan) より購入した。脂溶性の封入材 Mount-quick は大道産業 (Saitama, Japan) より購入した。ペントバルビタールナトリウムは東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。ベニユーラ静脈留置針 SS-7 (24G×25 mm) はトップ (Tokyo, Japan) より購入した。ペリスタポンプはアトー (Tokyo, Japan) の SJ-1211 型および SJ-1220 型を使用した。全ての塩基を 2'-O-メチル化およびホスホロチオエート化修飾した anti-miRNA oligonucleotide for miR-34a (AMO miR-34a, 5'-ACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3') は北海道システムサイエンスに合成を依頼した。マウスモノクローナル cytochrome c 抗体は Abcam (Cambridge, UK)、IRDye 680LT ヤギ抗マウス IgG は LI-COR Biosciences より購入し

た。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

以下に本章で使用した培地および試薬の組成を示した。必要のあるものはオートクレーブ (121°C、20 分間または 40 分間) 等の滅菌処理を行った。前章で既に使用した試薬等の記載は省略した。

Picrosirius red (PSR) 溶液

Direct red 80 およびファストグリーン FCF 0.2 g をワンギーソン液 P 200 mL に溶解させた。

EGTA 溶液 (pH 7.8)

塩化ナトリウム 8.0 g、塩化カリウム 0.4 g、リン酸二ナトリウム十二水和物 0.121g、リン酸二水素カリウム 0.06 g、炭酸水素ナトリウム 0.35 g、グルコース 1.0 g、HEPES 2.383 g、EGTA 0.19 g

Hanks 溶液 (pH 7.6)

塩化ナトリウム 80.0 g、塩化カリウム 4.0 g、リン酸二ナトリウム十二水和物 1.21 g、リン酸二水素カリウム 0.6 g、炭酸水素ナトリウム 3.5 g、グルコース 10.0 g

コラーゲナーゼ溶液 (pH 7.8)

硫酸マグネシウム七水和物 0.04 g、塩化カルシウム二水和物 0.147 g、コラーゲナーゼ (IV) 0.1 g、Hanks 溶液 20 mL に精製水を加え、全量を 200 mL とした。

Percoll 溶液 (pH 7.6)

Percoll 450 mL、Hanks 溶液 50 mL

NP-40 lysis buffer (pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL、塩化ナトリウム 1.75 g、Nonidet P-40 (NP-40) 2 mL、EDTA 75 mg に精製水を加え全量を 200 mL とした。

II-2-2 マウスへの CCl₄ および AMO34a MEND の投与と採血ならびに肝臓の採取

動物実験は、金沢大学動物実験指針に従って行った。C57BL/6J マウス (雄性、8 週齢 22~25g; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育した後、オリーブ油で 5 倍希釈した CCl₄ 1 mL/kg を週 2 回、1、2、4、8 週間、腹腔内投与した (n=4)。コントロール群 (n=3) には同じ容量のオリーブ油を腹腔内投与した。最終投与より 72 時間後に下行大静脈より採血を行い、肝臓を採取した。採血にはヘパリナイズしたシリンジを用いた。

MEND への AMO miR-34a の封入は、北海道大学大学院 薬学研究院薬剤分子設計学研究室の佐藤悠介博士に依頼した。肝線維化の発症への影響を調べる検討では、PBS で希釈した MEND 化 AMO miR-34a (AMO34a MEND) (1 mg/kg、容量は 10 mL/kg) または AMO miR-34a を封入していない empty MEND (10 mL/kg) をマウスに静脈投与し、24 時間後より II-2-2 に準じて CCl₄ の投与を 1 週間行った。CCl₄ 最終投与より 72 時間後に下行大静脈より採血を行い、肝臓を採取した。肝線維化の進行への影響を調べる検討では、II-2-2 に準じてマウスへの CCl₄ の投与を 4 週間行い、CCl₄ 投与開始から 21 日目に AMO34a MEND (1 mg/kg、容量は 10 mL/kg) または empty MEND (10 mL/kg) を静脈投与した (Fig. 13)。CCl₄ 最終投与より 24 時間後に尾静脈より採血を行い、72 時間後に肝臓を採取した。

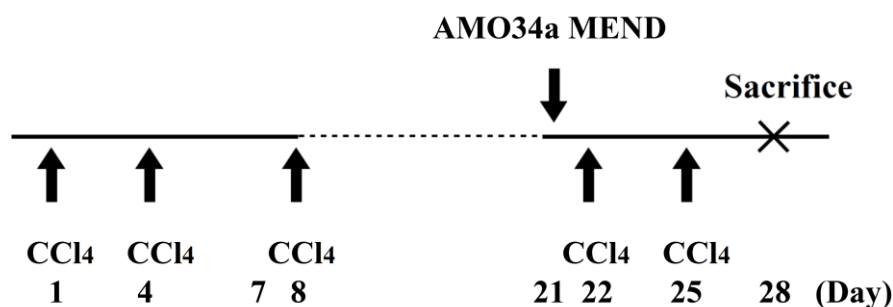


Fig. 13. Timeline of *in vivo* experiments to determine the effects of AMO34a MEND administration on the progress of liver fibrosis. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 4 weeks. On 21th day after the first administration of CCl₄, AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered in a single dose.

II-2-3 血漿の分離および ALT 値の測定

II-2-2 で採血した血液を 12,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離し、血漿を回収した。その後、血漿 10 μ L をスライドにアプライし、DRI-CHEM 4000V (富士フィルム) を用いて ALT 値を測定した。

II-2-4 HE 染色および PSR 染色

O.C.T. compound で封入した肝組織をマイクローム社のクリオスタット HM505E (Walldorf, Germany) を用いて 10 μ m の厚さにスライスし、スライドに貼り付け組織切片を作製した。室温で 1 時間風乾後、30 秒間水に浸して洗浄した。HE 染色では、マイヤーヘマトキシリン溶液に 1 分間浸し、水洗した後、エオジン溶液に 1 分間浸した。PSR 染色では、PSR 溶液に 30 分間浸した。水洗した後、70%エタノール、90%エタノール、99.5%エタノール、100%エタノール、キシレンの順に 5 分間浸して脱水し、風乾後に Mount-quick を用いて封入した。

II-2-5 マウス肝サンプルにおける mature miR-34a および mRNA 発現量の測定

マウス肝約 1 mg に RNAiso を 1 mL 加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズした後、1.5 mL チューブに回収した。I-2-11 に準じて total RNA を調製し、I-2-17 に準じて mature miR-34a 発現量を測定した。

I-2-11 に準じて cDNA への逆転写反応を行い、Table 5 に示したプライマーを用いて I-2-12 に準じて real-time RT-PCR を行った。Alb、 α SMA および Col1a1 はホールド反応を 95°C で 30 秒間行った後、解離反応を 94°C で 20 秒間、アニーリングと伸長反応を 64°C で 20 秒間とし、40 サイクル行った。Tgf β 1 はホールド反応を 95°C で 30 秒間行った後、解離反応を 94°C で 20 秒間、アニーリングを 60°C で 30 秒間、伸長反応を 72°C で 20 秒間とし、40 サイクル行った。 β -actin はホールド反応を 94°C で 30 秒間行った後、解離反応を 94°C で 20 秒間、アニーリングと伸長反応を 68°C

で 20 秒間とし、40 サイクル行った。

Table 5. Sequence of primers used for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence
Alb forward	5'-AAGACGTGTGTTGCCGATGAG-3'
Alb reverse	5'-AGCCTCTGGCCTTTCAAATGG-3'
α SMA forward	5'-AAC ACG GCA TCA TCA CCA AC-3'
α SMA reverse	5'-ATA CAT GGC GGG GAC ATT GA-3'
Tgf β 1 forward	5'-ACC GCA ACA ACG CCA TCT ATG-3'
Tgf β 1 reverse	5'-CGT CAA AAG ACA GCC ACT CAG-3'
Colla1 forward	5'-GCC AAG AAG ACA TCC CTG AAG-3'
Colla1 reverse	5'-CCT CGA CTC CTA CAT CTT CTG-3'
β -actin forward ^a	5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG G-3'
β -actin reverse ^a	5'-CTA GGA GCC AGA GCA GTA ATC TC-3'

^aKobayashi et al (2009).

II-2-6 マウス肝実質細胞および非実質細胞における Alb mRNA および mature miR-34a 発現量の測定

II-2-2 に準じてマウスへの CCl₄ の投与を 1 週間行った。最終投与より 72 時間後にペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し、開腹した。門脈下に縫合糸をくぐらせ、門脈下方から挿入したベニユーラ静脈留置針を縛り、門脈内に固定した。ペリスタポンプを用いて EGTA 液を放出し、ただちに下行大静脈を切断して 5 分間灌流した。コラーゲナーゼ液を 15 分間灌流した後に肝臓を採取した。10% FBS、4.5 g/L グルコース、10 mM HEPES を含む DMEM を 20 mL 添加した 10 cm シャーレ上で肝臓を細切し、金網で濾過した後、試験管に分注して 500 rpm、4°C で 3 分間遠心分離した。沈殿を 10% FBS、4.5 g/L グルコース、10 mM HEPES を含む DMEM 5 mL に懸濁し、Percoll 液を 5 mL を添加して 500 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。沈殿は肝実質細胞として回収し、RNAiso を 1 mL 添加し、10 分間室温に放置した後、1.5 mL チューブに移した。中間層を別の試験管に移し、2,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。沈殿は非実質細胞 (non-parenchymal cells, NPCs) とし

て回収し、RNAiso を 1 mL 添加し、10 分間室温に放置した後、1.5 mL チューブに移した。I-2-11 に準じて total RNA の調製および cDNA への逆転写反応を行い、II-2-5 に準じて Alb mRNA 発現量を測定した。また、I-2-17 に準じて mature miR-34a 発現量を測定した。

II-2-7 Whole cell lysate の調製とタンパク質定量

マウス肝約 20 mg に最終濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APMSF、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニンになるように添加した NP-40 lysis buffer を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、氷上で 1 時間インキュベートした。その際、15 分間に 1 回激しく攪拌した。13,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で、15 分間遠心分離後、上清を回収し whole cell lysate を得た。タンパク質濃度は I-2-9 に準じて測定した。

II-2-8 SDS-PAGE とウェスタブロットティング

II-2-7 で得られた whole cell lysate を用いて、I-2-10 に準じて SDS-PAGE およびウェスタブロットティングを行った。15%ポリアクリルアミドゲルに whole cell lysate を 20 μg アプライした。1 次抗体として、マウスモノクローナル cytochrome c 抗体 (500 倍希釈) を用い、室温で一晩反応させた。2 次抗体として IRDye680LT 標識ヤギ抗マウス IgG (PBST で 10,000 倍希釈) を用い、室温で 1 時間反応させた。

II-2-9 統計解析

二群間の比較は Student's *t*-test により、多群間の比較は One-way ANOVA と Tukey's test により解析した。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意とした。

第3節 実験結果

II-3-1 肝線維化モデルの評価

CCl₄反復投与後1、2、4、8週目に採取した血漿を用いてALT値を測定した (Fig. 14)。CCl₄投与1週目からオリーブ油群と比べて高値を示す傾向が認められ、8週目では有意に高値を示した。

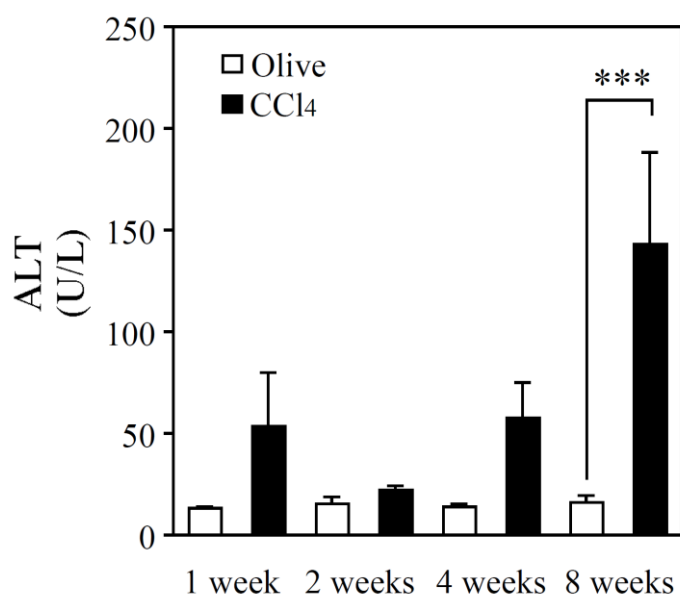
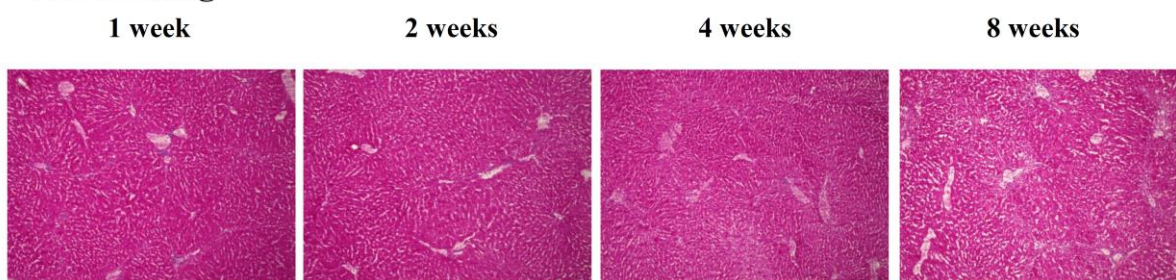


Fig. 14. Plasma ALT levels in mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1, 2, 4, or 8 weeks. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, plasma specimens were collected and ALT levels were measured. Data are the means \pm SD (Olive, n = 3; CCl₄, n = 4). **P* < 0.05 by Student's t-test.

HE染色において、投与1週目から炎症細胞の浸潤および細胞死が認められ、その程度は投与期間依存的に増大した (Fig. 15)。また、投与1週目では一部の門脈域周辺に線維化も認められ、その範囲は投与期間依存的に拡大し、投与4週目、8週目では隣接する門脈域の間に線維性架橋の形成が認められた。PSR染色では、投与1週目からコラーゲンの沈着が認められ、投与4週目、8週目ではコラーゲン蓄積量の増大および架橋の形成が認められた。以上より、CCl₄の反復投与により線維化モデルが作製されたことを確認した。

<HE staining>



<PSR staining>

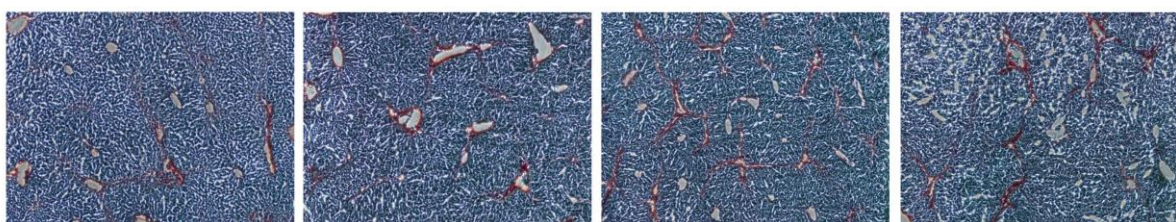


Fig. 15. Histopathological changes of liver in mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl_4 . CCl_4 (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1, 2, 4, or 8 weeks. Seventy-two hr after the last administration CCl_4 , Liver sections were collected and stained with HE and PSR (original magnification $\times 40$).

II-3-2 Mature miR-34a の発現変動解析

miR-34a が肝線維化のどの段階で発現変動しているか調べるため、mature miR-34a 発現量を測定した (Fig. 16)。 CCl_4 投与 1 週目からオリーブ油群と比べて mature miR-34a 発現量が有意に高値を示し、その上昇の程度は線維化の度合いに関わらず一定であった (5~8 倍)。

続いて miR-34a の発現上昇がどの細胞で起こっているか調べるため、 CCl_4 を 1 週間投与後に肝実質細胞および NPCs における mature miR-34a 発現量を測定した。肝実質細胞のマーカーである Alb mRNA 発現量を測定したところ、オリーブ油、 CCl_4 投与のいずれの場合においても、NPCs では肝実質細胞に比べて顕著に低い値 (10%、13%) を示し、各細胞の分離ができていることが確認された (Fig. 17A)。オリーブ油投与マウスにおいて、NPCs では mature miR-34a 発現量が顕著に低い値 (肝実質細胞の 13%) を示したことから、正常マウス肝の NPCs では miR-34a はほとんど発現し

ていないことが示された。しかし、 CCl_4 投与によりオリーブ油群と比べてどちらの細胞においても mature miR-34a 発現量の上昇 (3.2 倍、9.0 倍) が認められたことから (Fig. 17B)、miR-34a は肝線維化の初期段階から肝実質細胞および NPCs で発現上昇していることが示された。

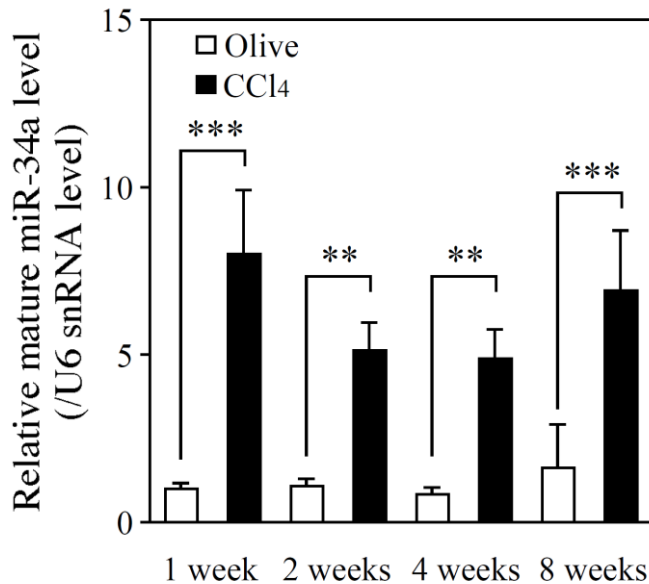


Fig. 16. Expression levels of mature miR-34a in liver of mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl_4 . CCl_4 (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1, 2, 4, or 8 weeks. Seventy-two hr after the last administration CCl_4 , liver samples were collected and mature miR-34a levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with the U6 snRNA levels. Data are the means \pm SD (Olive, $n = 3$; CCl_4 , $n = 4$). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ by Student's t-test.

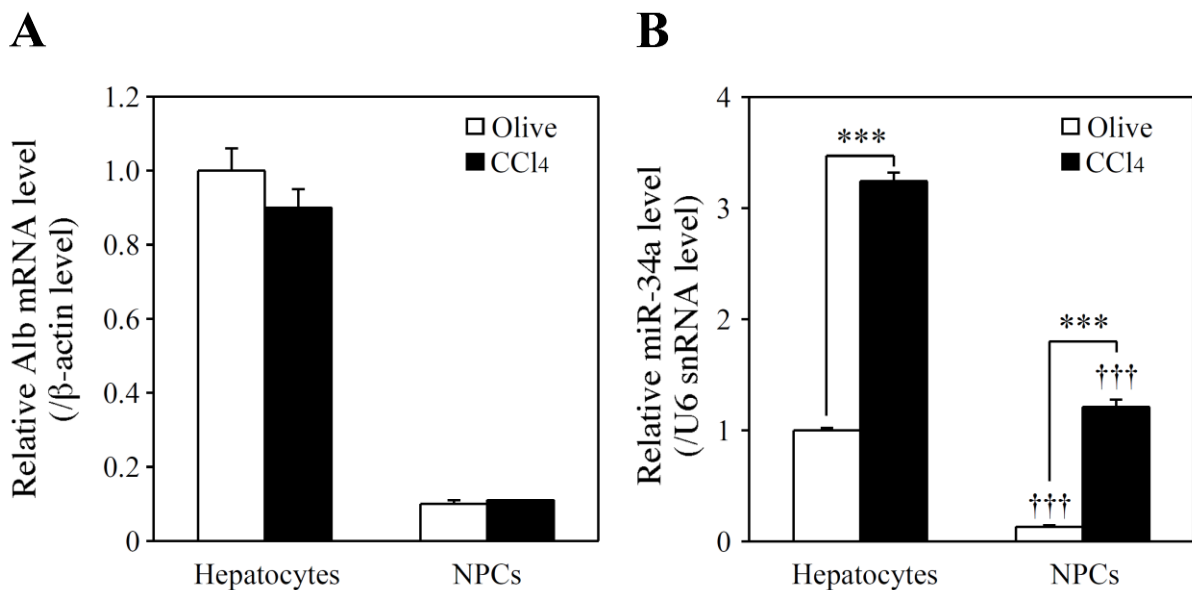


Fig. 17. Expression levels of mature miR-34a in hepatocytes and NPCs isolated from liver of mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl_4 . CCl_4 (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1 week. Seventy-two hr after the last administration CCl_4 , hepatocytes and NPCs were isolated. (A) The Alb mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with the β -actin mRNA levels. (B) The mature miR-34a levels were determined by real-time RT-PCR and normalized with the U6 snRNA levels. Data are the means \pm SD of three independent experiments. *** $P < 0.001$. ††† $P < 0.001$, compared with hepatocytes.

II-3-3 肝線維化発症への AMO34a MEND 前投与による miR-34a ノックダウンの影響

miR-34a ノックダウンによる肝線維化の発症への影響を調べるために、CCl₄ 投与前に AMO34a MEND を投与し、翌日より CCl₄ を 1 週間反復投与して検討した。Mature miR-34a 発現量は、オリーブ油を投与した場合には、AMO34a MEND 投与により empty MEND 投与に比べて顕著に低い値を示した (Fig. 18A)。また、CCl₄ 投与により認められた mature miR-34a 発現量の上昇も AMO34a MEND 投与により有意に抑制されたことから、AMO miR-34a が肝臓内で機能的に働いていることが示された。ALT 値は、CCl₄ 投与により empty MEND 群で顕著に高い値を示す個体が 1 匹存在したが、CCl₄ 投与により認められた ALT 値の上昇への AMO34a MEND 投与の影響は認められなかった (Fig. 18B)。

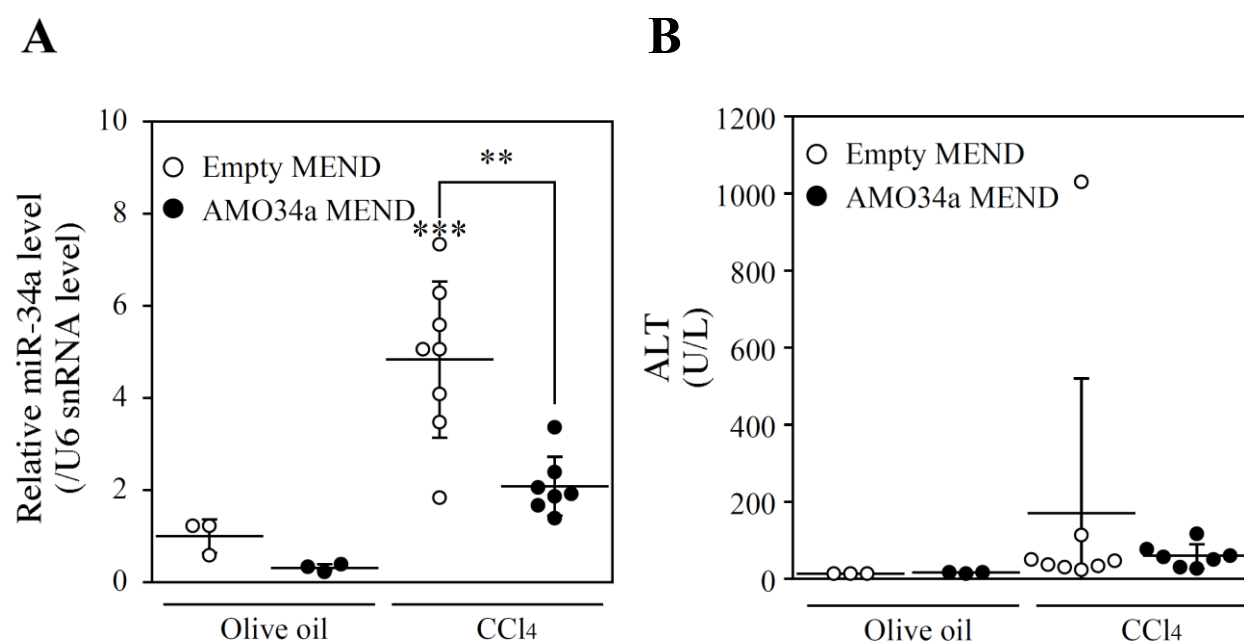
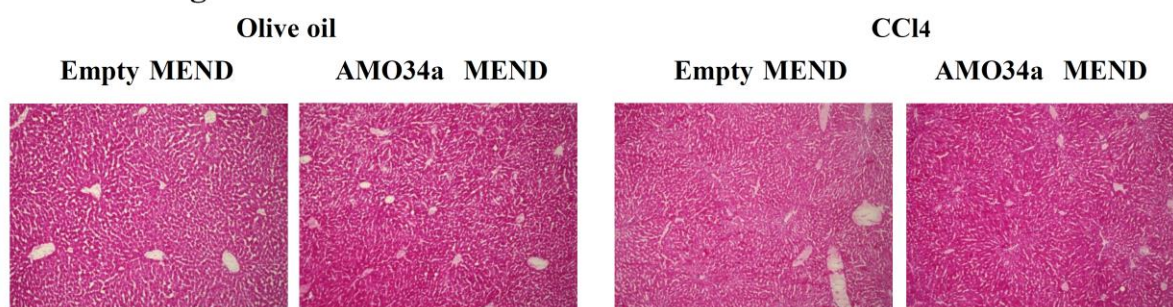


Fig. 18. Effects of AMO34a MEND administration on mature miR-34a in liver and plasma ALT levels. AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered 24 hr before the first administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1 week. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, (A) mature miR-34a and (B) ALT levels were measured. The bars indicate the means of each group. Data are the means \pm SD (empty MEND+olive oil and AMO34a MEND+olive oil, n = 3; empty MEND+CCl₄, n = 8; AMO34a MEND+CCl₄, n = 7). ***P < 0.001, compared with empty MEND+olive oil. **P < 0.01.

続いて、AMO34a MEND 投与により肝線維化の程度が変化するか調べる目的で HE 染色および PSR 染色による病理組織学的評価を行った (Fig. 19)。CCl₄ 投与により認められた細胞死 (HE 染色)、および一部のコラーゲン沈着 (PSR 染色) が、AMO34a MEND 投与により減弱していた。従って、miR-34a は肝線維化の発症に関与しており、AMO miR-34a は肝線維化に対して予防作用があることが示された。

<HE staining>



<PSR staining>

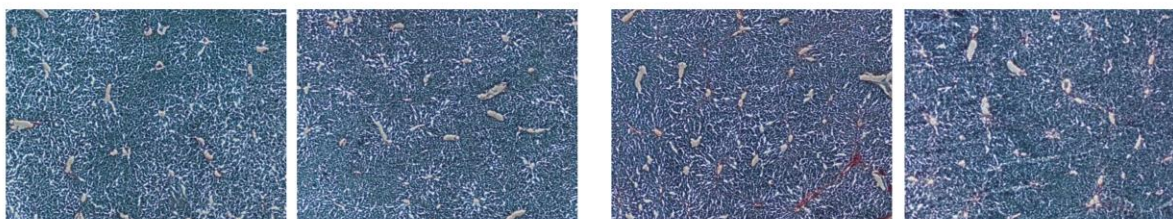


Fig. 19. Effects of AMO34a MEND administration on histopathological changes of liver in mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered 24 hr before the first administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1 week. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, liver sections were stained with HE and PSR (original magnification ×40).

II-3-4 肝線維化マーカー mRNA 発現変動解析による miR-34a ノックダウンの肝線維化発症への影響評価

AMO34a MEND 投与による肝線維化への予防作用をより詳細に調べるため、肝線維化マーカーの mRNA 発現量を測定した。αSMA mRNA 発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められた (Fig. 20A)。αSMA は活性化した肝星細胞に高発現している遺伝子であることから、AMO miR-34a は肝星細胞の活性化、増殖を抑制している可能性が考えられた。一方、肝

星細胞が産生する細胞外マトリックスである Col1a1 および肝星細胞の活性化因子である Tgfβ1 mRNA 発現量に関しては AMO34a MEND 投与による影響は認められなかった (Fig. 20B, C)。

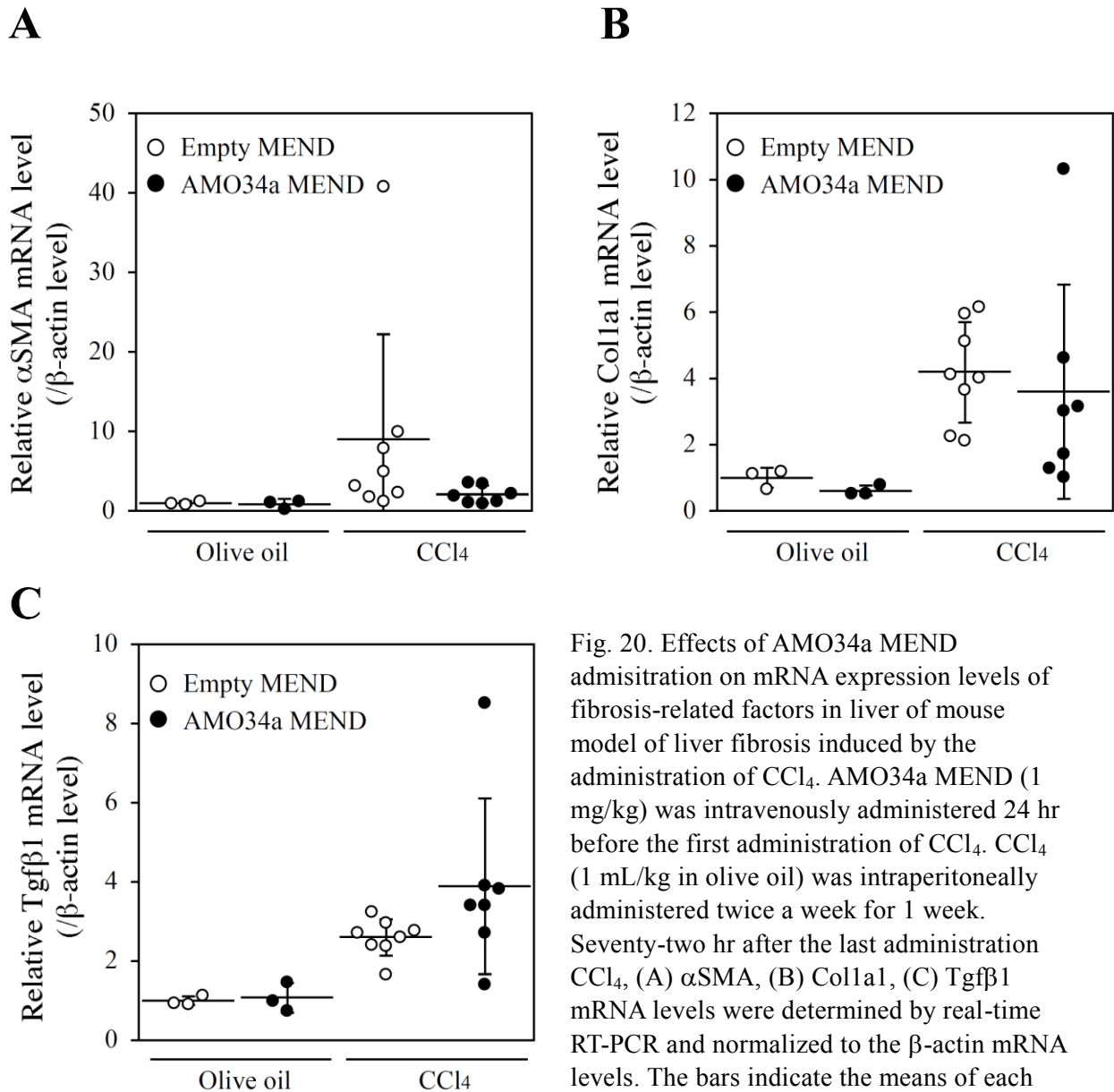


Fig. 20. Effects of AMO34a MEND administration on mRNA expression levels of fibrosis-related factors in liver of mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered 24 hr before the first administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 1 week. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, (A) α SMA, (B) Col1a1, (C) Tgfβ1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the β -actin mRNA levels. The bars indicate the means of each group. Data are the means \pm SD (empty MEND+olive oil and AMO34a MEND+olive oil, n = 3; empty MEND+CCl₄, n = 8; AMO34a MEND+CCl₄, n = 7).

II-3-6 アポトーシスへの miR-34a ノックダウンの影響

肝線維化は肝細胞が障害され、それに対する創傷治癒の結果、コラーゲンなどの細胞外マトリクスが過剰に蓄積した状態である。miR-34a は Bcl-2 や Sirtuin 1 (SIRT1) などの抗アポトーシス遺伝子を発現抑制することでアポトーシスを誘導することが知られている (Li et al., 2013)。そこで、アポトーシスのマーカーである cytochrome c タンパク質発現量を調べた (Fig. 21)。Cytochrome c タンパク質発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により有意に抑制された。以上より、AMO miR-34a はアポトーシスを減弱させることによっても肝線維化の発症を抑制している可能性が示された。

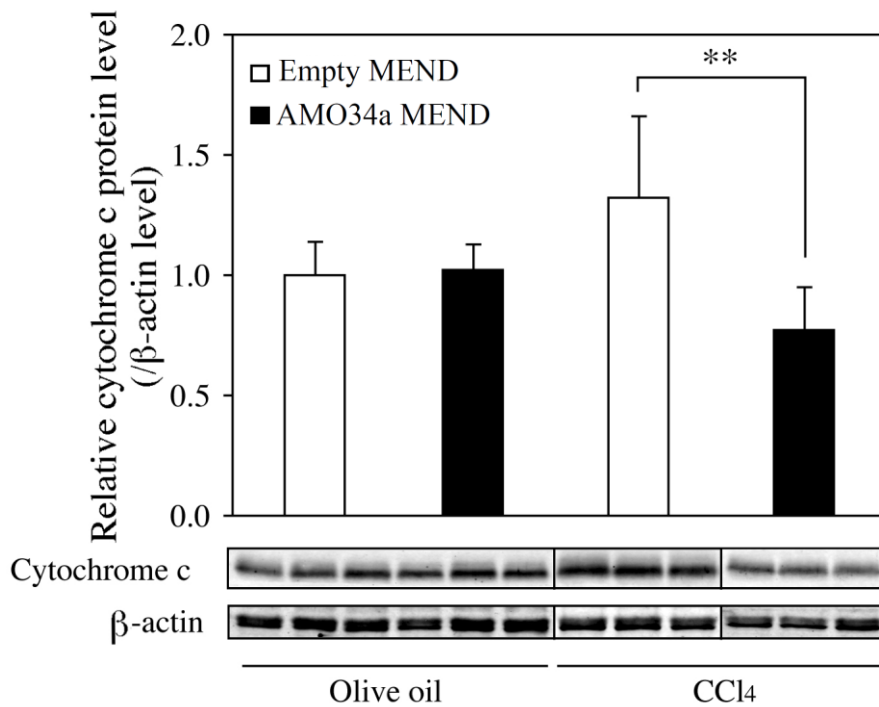


Fig. 21. Effects of MEND of AMO34a MEND administration on apoptosis in liver of mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered 24 hr before the first administration of CCl₄. CCl₄ was (1 mL/kg in olive oil) intraperitoneally administered twice a week for 1 week. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, cytochrome c protein levels were determined by Western blot analysis and normalized to the β-actin protein levels. Values are the means ± SD (empty MEND+olive oil and AMO34a MEND+olive oil, n = 3; empty MEND+CCl₄, n = 8; AMO34a MEND+CCl₄, n = 7). ***P* < 0.01 by One-way ANOVA and Tukey's test.

II-3-6 肝線維化進行への AMO34a MEND 投与による miR-34a ノックダウンの影響

miR-34a ノックダウンにより肝線維化の進行に対しても抑制作用が認められるか調べるために、4 週間 CCl₄ を反復投与して肝線維化を進行させている条件下、CCl₄ 投与開始から 21 日目に AMO34a MEND を単回投与し、肝線維化に対する修復能を検討した。Mature miR-34a 発現量 (Fig. 22A) および ALT 値 (Fig. 22B) は、CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められた。

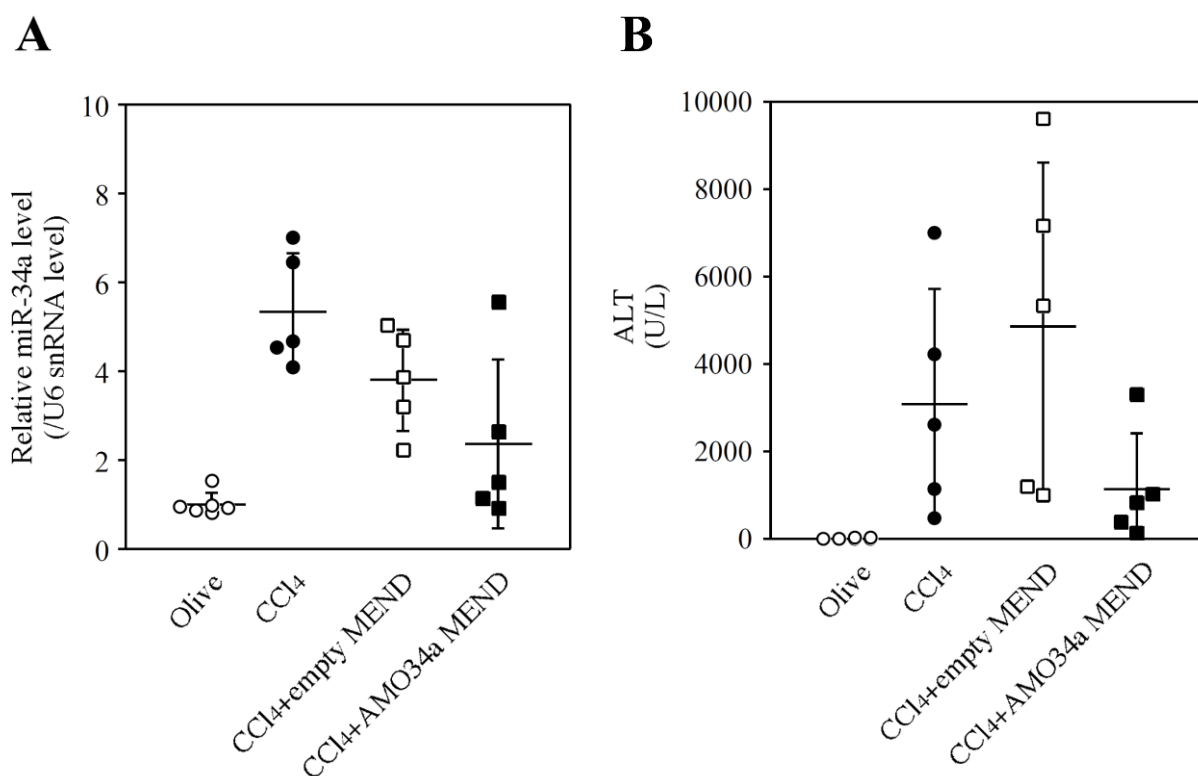


Fig. 22. Effects of AMO34a MEND administration on mature miR-34a in liver and plasma ALT levels in late-stage fibrosis. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 4 weeks. On 21th day after the first administration of CCl₄, AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered in a single dose. (A) Seventy-two hr after the last administration CCl₄, mature miR-34a levels in liver were measured. (B) Twenty-four hr after the last administration CCl₄, Plasma ALT levels were measured. The bars indicate the means of each group. Data are the means \pm SD (olive oil, n = 6; CCl₄, CCl₄+empty MEND and CCl₄+AMO34a MEND, n = 5).

続いて、AMO34a MEND 投与により肝線維化が抑制されるか調べるため、HE 染色および PSR 染色を行った (Fig. 23)。HE 染色では、CCl₄ 投与による肝組織障害に対する AMO34a MEND 投与の影響は認められなかった。一方 PSR 染色では、AMO34a MEND 投与により 5 匹中 2 匹で CCl₄ 投与によるコラーゲンの沈着の減弱が認められた。従って、miR-34a は肝線維化の進行にも関与しており、AMO miR-34a は肝線維化の修復も期待できることが示された。

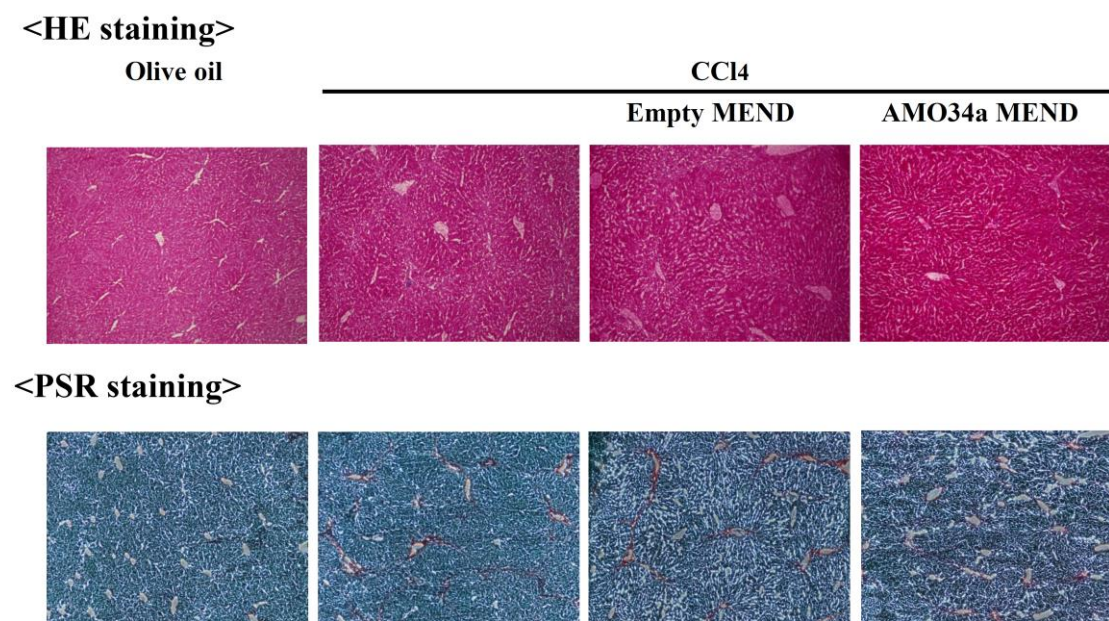


Fig. 23. Effects of AMO34a MEND administration on histopathological changes of liver in mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 4 weeks. On 21th day after the first administration of CCl₄, AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered in a single dose. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, liver sections were stained with HE and PSR (original magnification ×40).

II-3-8 肝線維化マーカー mRNA 発現変動解析による miR-34a ノックダウンの肝線維化進行への影響評価

AMO34a MEND 投与による肝線維化進行への抑制作用をより詳細に調べるため、肝線維化マーカーの mRNA 発現量を測定した。αSMA mRNA 発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められ (Fig.

24A)、AMO miR-34a は線維化の進行段階においても肝星細胞の活性化、増殖を抑制している可能性が考えられた。一方、Colla1 および Tgf β 1 mRNA 発現量に関しては AMO34a MEND 投与による影響は認められなかった (Fig. 24B, C)。

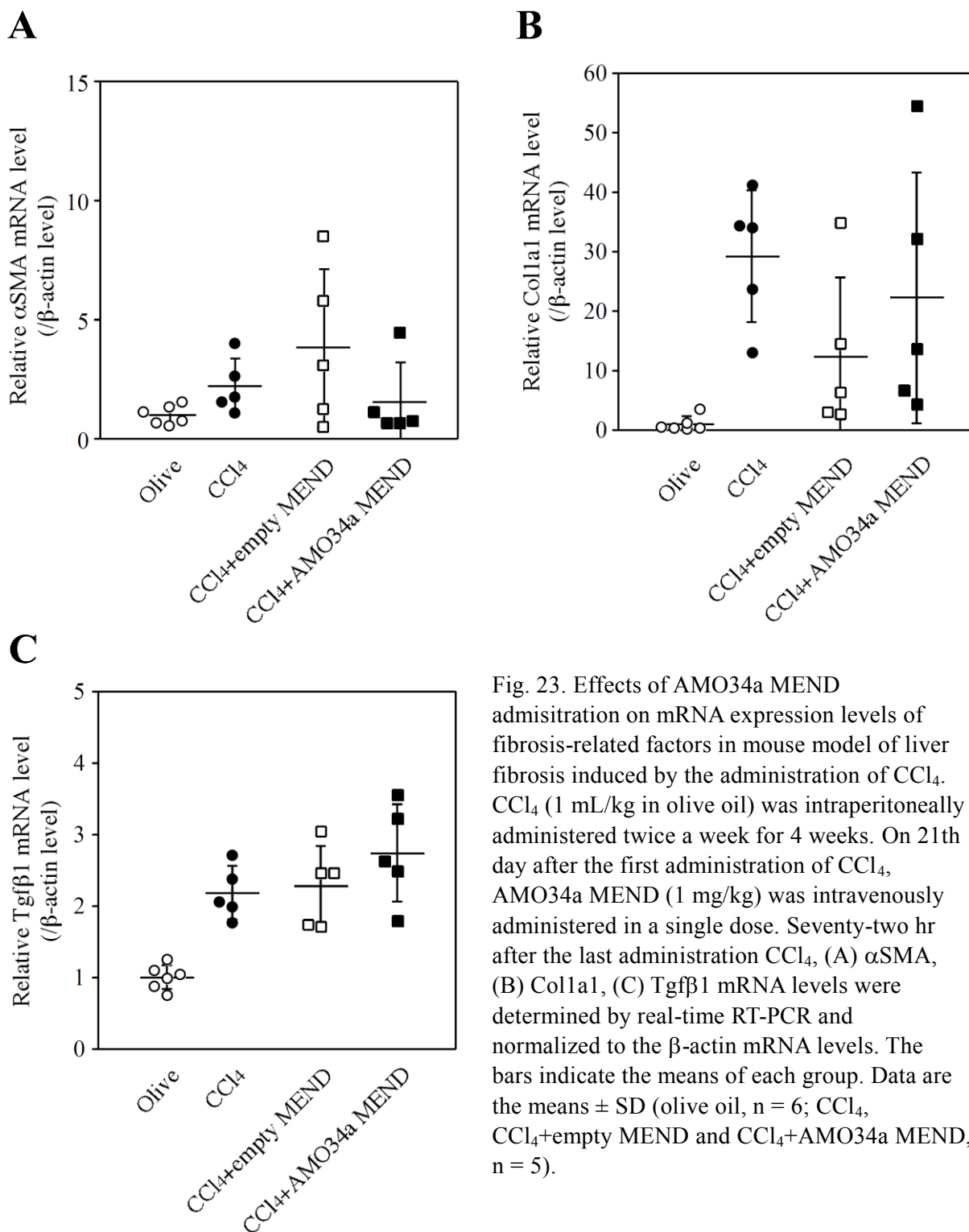


Fig. 23. Effects of AMO34a MEND administration on mRNA expression levels of fibrosis-related factors in mouse model of liver fibrosis induced by the administration of CCl₄. CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) was intraperitoneally administered twice a week for 4 weeks. On 21th day after the first administration of CCl₄, AMO34a MEND (1 mg/kg) was intravenously administered in a single dose. Seventy-two hr after the last administration CCl₄, (A) α SMA, (B) Colla1, (C) Tgf β 1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to the β -actin mRNA levels. The bars indicate the means of each group. Data are the means \pm SD (olive oil, n = 6; CCl₄, CCl₄+empty MEND and CCl₄+AMO34a MEND, n = 5).

第4節 考察

本章では CCl₄ を用いて肝線維化モデルマウスを作製し、肝線維化における miR-34a の役割について検討した。CCl₄ を投与したところ、1 週目から mature miR-34a 発現量が有意に高値を示し、その上昇の程度は線維化の度合いに関わらず一定であった (Fig. 16)。このことは、第 I 章においてヒト肝サンプルの線維化の度合いと mature miR-34a 発現量との間に有意な関係が認められなかったことと一致する結果であった。CCl₄ はマウス肝臓において Cyp2e1 によって CCl₃ ラジカルに代謝され、このラジカルが脂質過酸化を誘発し、炎症や細胞死を引き起こす。miR-34a は DNA 損傷や酸化ストレスなどにより p53 の活性化を介して発現が誘導されることから (Raver-Shapira et al., 2007)、CCl₄ 暴露による細胞ストレスが miR-34a の発現誘導に関与していると考えられる。CCl₄ を 1 週間反復投与後のマウス肝実質細胞および NPCs における mature miR-34a 発現量を測定したところ、オリーブ油群と比べてどちらの細胞においても mature miR-34a 発現量の上昇が認められたことから (Fig. 17B)、miR-34a は肝線維化の初期段階から肝実質細胞および NPCs で発現上昇し、肝線維化の発症、進行に関与していることが示唆された。

miR-34a ノックダウンによる肝線維化発症への抑制作用を検討するため、CCl₄ 投与前に AMO34a MEND を投与し、翌日より CCl₄ を 1 週間反復投与して検討したところ、CCl₄ 投与で認められた細胞死およびコラーゲン沈着が減弱した (Fig. 19)。この時、CCl₄ 投与で認められた α SMA mRNA 発現量の上昇も AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められたことから (Fig. 20A)、AMO miR-34a は肝星細胞の活性化、増殖を抑制している可能性が考えられた。一方、Colla1 と Tgf β 1 mRNA 発現量は AMO34a MEND 投与による影響が認められず (Fig. 20B, C)、PSR 染色の結果とは矛盾するものであった。この原因として、AMO miR-34a が Colla1 の翻訳もしくは沈着を抑制した可能性が考えられる。コラーゲン沈着に関与する因子としては、コラーゲンを分解する matrix metalloproteinases (MMPs) や MMPs を抑制する tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) が知られている。実際に、ヒト舌扁平上皮癌細胞株に miR-34a を過剰発現させた時、MMP9 および MMP14 の発現が

低下することが報告されている (Jia et al., 2014)。また、CCl₄ 投与で認められた cytochrome c タンパク質発現量の上昇も AMO34a MEND 投与により有意に抑制された (Fig. 21)。AMO34a MEND 投与により CCl₄ 投与によるアポトーシスが抑制されることで、その後のコラーゲンの蓄積が起こりにくくなった可能性が考えられる。

線維化が進行している肝臓では、広範囲に渡り肝細胞障害、コラーゲンの沈着が起きており、肝細胞障害を抑制するだけでは既に沈着しているコラーゲンを除去することはできず修復は期待できないと思われる。本検討で、4 週間 CCl₄ を反復投与して肝線維化を進行させている条件下、CCl₄ 投与開始から 21 日目に AMO34a MEND を単回投与しても、CCl₄ 投与によるコラーゲンの沈着の減弱が確認された個体が存在したことから (Fig. 23)、miR-34a をノックダウンすることで線維化の修復も期待できることが示された。MMPs などコラーゲンの分解に関与する因子が活性化された可能性があり、AMO miR-34a は線維化の進行に関わる様々な過程に抑制的に作用することで修復を促進したと考えられる。

これまでに肝線維化に関わる miRNAs がいくつか報告されている。miR-16 は、ラットにおいて肝星細胞の活性化に伴って発現量が低下することが報告されており (Guo et al., 2009)、レンチウイルスを用いて miR-16 を過剰発現させた肝星細胞ではアポトーシスが亢進することが示されている。miR-29 ファミリーも肝星細胞の活性化に伴って発現量が低下する miRNAs であり、Coll1a1 mRNA の 3'-UTR に結合し発現抑制することで肝線維化を抑制すると考えられている (Roderburg et al., 2011)。一方、miR-27a/b は肝星細胞の活性化に伴って発現量が上昇することがラット肝星細胞で示されており、miR-27a/b のアンチセンスオリゴを導入することで肝星細胞が不活化することが報告されている (Ji et al., 2009)。今回の検討により miR-34a も肝星細胞の活性化や増殖、コラーゲン沈着に関与することを新たに明らかにした。これらの現象に関わる因子と miR-34a との関連を解明することは肝線維化の発症、進行メカニズムの解明のみならず、新たな治療法の開発につながると考えられる。

第 III 章 総括

本研究では肝臓における miR-34a の役割を明らかにすることを目的とし、ヒト RXR α 発現に与える miR-34a の影響を解析し、その生理学的、病理学的意義について肝線維化に着目し検討した。続いて、肝線維化モデルマウスを作製し、肝線維化における miR-34a の寄与についてさらに検討した。

第 I 章では、miR-34a が結合する可能性が *in silico* で予想されたヒト RXR α について、その発現量およびその機能に与える影響を検討した。ヒト RXR α mRNA に見出された 2 つの MRE のうち、どちらの 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。その結果、3'-UTR に存在する MRE1 は機能的ではなく、翻訳領域に存在する MRE2 が miR-34a 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された。Pre-miR-34a の導入により、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において内因性の RXR α タンパク質および mRNA 発現量が有意に低下することを見出した。その際、RXR α の転写能の低下は認められず RXR α mRNA の半減期が短縮したことから、miR-34a は mRNA 分解の亢進により RXR α の発現を負に制御することが示された。さらに pre-miR-34a の導入により、RXR α の下流遺伝子である CYP26 mRNA の誘導および CYP3A4 の転写活性化が消失したことから、miR-34a は RXR α の下流遺伝子にも影響することが示された。また、miR-34a による RXR α の発現制御の生理学的および病理学的意義を肝線維化との関連から検討した。p53 活性化能を有するエトポシドを HepG2 細胞 (野生型 p53 発現細胞株) に処置した時、mature miR-34a 発現量の有意な上昇が認められ、RXR α タンパク質発現量は有意に低下した。一方、変異型 p53 発現細胞株である HuH7 細胞ではこのような現象は認められなかったことから、p53 の活性化を介した miR-34a の発現誘導が RXR α タンパク質発現量の低下に関与していることが示唆された。線維化の認められるヒト肝組織では正常肝組織と比べて mature miR-34a は高値を示す傾向が認められた。一方、RXR α タンパク質発現量は有意に低い値を示したことから、miR-34a による発現抑制が肝線維化に伴う RXR α の発現低下に関与していることが示唆された。以上より、miR-34a が RXR α の発現を mRNA 分解の亢進を介して負に制御していることを示し、癌抑制遺

伝子として研究されてきた miR-34a が薬物代謝や肝線維化の発症、進行にも関与することを明らかにした。

第 II 章では、肝線維化を引き起こす化学物質として頻用されている CCl₄ を用いて肝線維化モデルマウスを作製し、miR-34a に対するアンチセンスオリゴを封入した MEND を投与して miR-34a をノックダウンし、肝線維化の程度が変化するか検討した。CCl₄ 投与により、1 週目から mature miR-34a 発現量が有意に高値を示し、CCl₄ を 1 週間投与後のマウス肝実質細胞および NPCs においても mature miR-34a 発現量の上昇が認められたことから、miR-34a は肝線維化の初期段階から肝実質細胞および NPCs で発現上昇し、肝線維化の発症、進行に関与していることが示唆された。マウス肝における miR-34a の発現上昇の程度は線維化の度合いに関わらず一定であった。このことは、ヒト肝サンプルの線維化の度合いと mature miR-34a 発現量との間に有意な関係が認められなかったことと一致する結果であった。AMO34a MEND 投与により、miR-34a の発現がノックダウンされ、CCl₄ 投与で認められた細胞死およびコラーゲン沈着が減弱した。この時、αSMA mRNA および cytochrome c タンパク質発現量の上昇の抑制も認められた。また、CCl₄ を反復投与して肝線維化を進行させている条件下においても、AMO34a MEND 投与により、CCl₄ 投与で認められたコラーゲン沈着が減弱した個体が存在し、今回の検討により miR-34a が肝星細胞の活性化や増殖、コラーゲン沈着、アポトーシスを亢進することで肝線維化の発症、進行に寄与することを新たに明らかにした。

以上、本研究では肝臓において miR-34a が代謝酵素の発現抑制や肝線維化の発症、進行に関与することを明らかにした。これまで miR-34a に関する研究は癌領域を中心に行われてきたが、今回の検討により肝臓においても重要な働きを担うことが示され、肝線維化の治療効果の向上や副作用の軽減に向けて有用な情報を提供することができた。

参考文献

- Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Reczko M and Hatzigeorgiou AG (2009) Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* **25**: 3049-3055.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR and Fearon ER (2007) p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* **17**: 1298-1307.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2999-3004.
- Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C and Agami R (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* **14**: 872-877.
- Ebert MS and Sharp PA (2010) MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**: 2043-2050.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105.
- Guo CJ, Pan Q, Jiang B, Chen GY and Li DG. (2009) Effects of upregulated expression of microRNA-16 on biological properties of culture-activated hepatic stellate cells. *Apoptosis* **14**: 1331-1340.

- Ji J, Zhang J, Huang G, Qian J, Wang X and Mei S (2009) Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS Lett* **583**: 759-766.
- Jia LF, Wei SB, Mitchelson K, Gao Y, Zheng YF, Meng Z, Gan YH and Yu GY (2014) miR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14. *PLoS One* **9**: e108435.
- Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T and Yokoi T (2011) PPAR α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm Res* **28**: 2467-2476.
- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Rev Mol Cell Biol* **6**: 376-385.
- Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M and Hayashi N (2011) Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* **121**: 3343-3356.
- 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.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol Sci* **111**: 302-310.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S and Ørum H (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**: 198-201.
- Lattuada D, Viganó P, Mangioni S, Sassone J, Di Francesco S, Vignali M and Di Blasio AM (2007) Accumulation of retinoid X receptor- α in uterine leiomyomas is associated

- with a delayed ligand-dependent proteasome-mediated degradation and an alteration of its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* **21**: 602-612.
- 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.
- 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.
- Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J and Xie X (2013) MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Exp Med* **13**: 109-117.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D and Tang DG (2011) The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* **17**: 211-215.
- Liu C and Tang DG (2011) MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res* **71**: 5950-5954.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J and Hermeking H (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* **7**: 2591-2600.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A and Evans RM (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes Dev* **6**: 329-344.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E and Chabot GG (2003) Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* **4**: 1-10.
- Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y and Yokoi T (2010) Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol* **79**: 1045-1052.
- Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S and Yokoi T (2009) MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer* **125**: 1328-1333.

- Oda Y, Nakajima M, Mohri T, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T and Yokoi T (2012) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. *Toxicol Appl Pharmacol* **260**: 222-231.
- Ott CE, Grünhagen J, Jäger M, Horbelt D, Schwill S, Kallenbach K, Guo G, Manke T, Knaus P, Mundlos S and Robinson PN (2011) MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. *PLoS One* **6**: e16250.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW and Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300-305.
- Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z and Oren M (2007) Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* **26**: 731-743.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C and Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**: 209-218.
- Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ and Ranganathan R (2004) Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **116**: 417-429.
- Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T and Yokoi T (2010) MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4 α modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J Biol Chem* **285**: 4415-4422.
- Takagi S, Nakajima M, Mohri T and Yokoi T (2008) Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* **283**: 9674-9680.
- Takahashi K, Oda Y, Toyoda Y, Fukami T, Yokoi T and Nakajima M (2014) Regulation of cytochrome *b*₅ expression by miR-223 in human liver: effects on cytochrome P450 activities. *Pharm Res* **31**: 780-794.
- Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M,

- Kelnar K, Bader AG, Brown D and Ochiya T (2010) Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* **18**: 181-187.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B and Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**: 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.
- Tsao WC, Wu HM, Chi KH, Chang YH and Lin WW (2005) Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferator-activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway. *Exp Cell Res* **304**: 234-243.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M and Yokoi T (2004) Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* **64**: 3119-3125.
- 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.
- Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ and Sucov HM (2000) Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor α as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* **20**: 4436-4444.
- Wang Z, Xu J, Zheng Y, Chen W, Sun Y, Wu Z and Luo M (2011) Effect of the regulation of retinoid X receptor- α gene expression on rat hepatic fibrosis. *Hepatol Res* **41**: 475-483.
- White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G and Petkovich M (1997) cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* **272**: 18538-18541.
- 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.

Wu L, Fan J and Belasco JG (2004) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4034-4039.

Xia W, Cao G and Shao N (2009) Progress in miRNA target prediction and identification. *Sci China C Life Sci* **52**:1123-1130.

論文目録

主論文

本学位論文の内容は、下記の発表論文を基礎とする。

Oda Y, Nakajima M, Tsuneyama K, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T and Yokoi T (2014) Retinoid X receptor α in human liver is regulated by miR-34a. *Biochem Pharmacol* **90**: 179-187.

副論文

Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T and Yokoi T (2011) PPAR α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm Res* **28**: 2467-2476.

Oda Y, Nakajima M, Mohri T, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T and Yokoi T (2012) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. *Toxicol Appl Pharmacol* **260**: 222-231.

Takahashi K, Oda Y, Toyoda Y, Fukami T, Yokoi T and Nakajima M (2014) Regulation of cytochrome *b*₅ expression by miR-223 in human liver: effects on cytochrome P450 activities. *Pharm Res* **31**: 780-794.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物代謝安全性学研究室 教授 中島 美紀博士、助教 深見 達基博士、現名古屋大学大学院医学系研究科 教授 横井 毅博士に深甚なる謝意を表します。ヒト肝サンプルを御供与下さいました岩手医科大学 医学部法医学講座 教授 青木 康博博士、講師 高宮 正隆博士、富山大学大学院 医学薬学研究部病理診断学准教授 常山 幸一博士ならびに MEND へ AMO miR-34a を封入下さいました北海道大学大学院 薬学研究院薬剤分子設計学研究室 特任助教 佐藤悠介博士、教授 原島秀吉博士に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたり多くの御助言、御協力頂きました薬物代謝安全性学研究室の皆様深く感謝致します。