

主論文の要旨

**MicroRNA-mediated Th2 bias in methimazole-induced
acute liver injury in mice**

〔メチマゾール誘導性マウス肝障害において T helper 2 型免疫応答に
関与する miRNA〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
分子医薬学講座 トキシコゲノミクス分野

(指導：横井 毅 教授)

上松 泰明

【緒言】

メチマゾール (MTZ) は抗甲状腺薬として広く用いられ、ヒトで稀に肝障害を起こすことが報告されている。我々は L-buthionin-(S,R)-sulfoximine (BSO) 投与によりグルタチオン (GSH) を枯渇させた野生型マウスに MTZ を投与すると肝障害が惹起され、その発症に T helper (Th) 2 型免疫応答が関与することを既に明らかにしている。本研究では当該動物モデルを用いて、Th2 型免疫応答に関与する miRNA について検討した。

【方法】

雌性 Balb/c マウスに絶食下で BSO 700 mg/kg を腹腔内投与した 1 時間後に MTZ 25 mg/kg を経口投与し、BSO 投与後 0、1.5、2、4 及び 7 時間に血漿及び肝臓を採取した。肝障害の経時変化を確認するため、各採材時点の血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 濃度及び肝臓中 GSH 量を測定し、病理組織学的検査を実施した。また、免疫応答の経時変化を確認するため、各採材時点で肝臓中 Th2 関連因子の mRNA 及び蛋白発現定量をそれぞれ real-time RT-PCR 法及び Western blotting 法で、血漿中 interleukin (IL) -4 濃度の測定を ELISA 法で実施した。さらに、Th2 型免疫応答に関与する miRNA を探索するため、肝臓中の網羅的 miRNA 発現データを TaqMan miRNA array を用いて取得し、BSO/MTZ 併用群特異的な変動を示した miRNA の発現定量を real-time RT-PCR 法により行った。

【結果】

BSO/MTZ 併用群において BSO 投与後 4 時間以降で血漿中 ALT 値の上昇を伴う小葉中心性肝細胞壊死を主徴とした重篤な肝障害が認められた (Fig. 1)。BSO/溶媒 (生理食塩水) 群及び溶媒/MTZ 群では BSO 投与後 7 時間まで肝障害は認められなかった。肝臓中 GSH 量は BSO/溶媒群及び BSO/MTZ 併用群で BSO 投与後 1.5 時間より低値を示した (Fig. 2)、酸化ストレスの指標である還元型 GSH/酸化型 GSH (GSSG) 比の低下が BSO/MTZ 併用群で最も顕著に認められた時点は、血漿中 ALT 値上昇ピーク時点と一致した (Fig. 2)。Th2 促進因子である GATA binding protein 3 (GATA3)、Eotaxin-1 及び IL-4 の肝臓中 mRNA 発現及び血漿中 IL-4 値は肝障害発症時点である BSO 投与後 4 時間以降で顕著に上昇した (Fig. 3)。一方、Th2 抑制因子について、SRY-related HMG-box 4 (SOX4) 及び Myc-induced nuclear antigen (MINA) は肝障害発症前より発現量の低下がみられ、Lymphoid enhancer factor-1 (LEF1) は肝障害発症時点で発現上昇がみられた (Fig. 3)。

肝障害発症前 (BSO 投与後 1.5 及び 2 時間) における肝臓中の網羅的 miRNA 発現データから、BSO/MTZ 併用群特異的に変動がみられた 17 miRNA を抽出した (Fig. 4 及び Table 1)。

miRWalk2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>) を用いて、これらの miRNA が上述の Th2 関連因子を標的とするかを予測し、標的に対する負の

制御により Th2 型免疫応答の亢進に寄与している可能性のある miR-29b-1-5p、miR-449a-5p 及び miR-410-3p を見出した (Table 2)。肝臓中の miRNA 発現定量の結果、肝障害発症前から miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p の発現上昇が認められた (Fig. 5)。Th2 型免疫応答に抑制的に働く転写因子である SOX4 及び LEF1 の蛋白発現定量を行ったところ、肝障害発症前より発現量の低下が認められた (Fig. 6)。なお、肝臓中の miR-410-3p 及び MINA 蛋白発現量は検出限界以下であった (データ示さず)。

【考察】

薬剤性肝障害発症時の Th2 型免疫応答に関与する miRNA は明らかになっていない。我々は MTZ 誘導性マウス肝障害モデルを用い、Th2 型免疫応答に関与する miRNA とその作用点を探索した。経時的な mRNA 発現定量の結果から、BSO/MTZ 併用群では GATA3 などの Th2 促進因子の発現が肝障害発症時点で上昇したのに対して、Th2 抑制因子の発現は肝障害発症時点より前から低下する傾向にあり、Th2 抑制因子の変動が Th2 型免疫応答の初期変化として重要であることが示唆された。

網羅的 miRNA 発現解析と標的予測の結果から見出された miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p は BSO/MTZ 併用群の肝障害発症前から発現上昇がみられ、これらの miRNA の標的と考えられた SOX4 及び LEF1 の蛋白発現は肝障害発症前から低下した。SOX4 mRNA の 3'UTR 領域には、miR-29b-1-5p の seed 配列との相補結合サイトが複数予測され (Fig. 7)、miR-29b-1-5p の翻訳阻害による SOX4 の負の制御が示唆された。また、SOX4 の上流制御因子である Transforming growth factor (TGF) - β 1 の発現は一過性の低下が認められたものの、SMAD family member 3 (SMAD3) の発現低下は認められなかった (Fig. 8) ことから、miR-29b-1-5p は本病態における SOX4 の dominant regulator であることが示唆された。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞及びヒト神経芽腫細胞株において miR-449a-5p は LEF1 を標的とし、その発現を負に制御することが報告されている。今回、LEF1 mRNA 発現が肝障害発症時に上昇したのに対して、LEF1 蛋白発現が肝障害発症前から低下したことは、miR-449a-5p の翻訳後修飾を示唆するものであるが、LEF1 の mRNA 及び蛋白発現が逆相関を示したことについては、今後詳細な制御メカニズムを検討する必要がある。

SOX4 及び LEF1 はいずれも High-Mobility Group protein として知られ、Th2 型免疫応答のマスターレギュレーターである GATA3 に直接作用し、Th2 抑制的に働くことが知られている。従って、肝障害発症前から認められた miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p が発現上昇は、SOX4 及び LEF1 の発現を負に制御し、GATA3 活性化による MTZ 誘導性肝障害の Th2 型免疫応答亢進に寄与していると考えられた (Fig. 9)。

【結語】

MTZ 誘導性肝障害における miRNA を介した新たな Th2 型免疫応答制御メカニズムを解明した。また、その経時変化から、miR-29b-1-5p/SOX4 及び miR-449a-5p/LEF1 の変動が Th2 型免疫介在性肝障害の特異的な予測マーカーとなる可能性が示された。