

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12342

研究課題名(和文) 分子疫学コホート調査に基づく生活習慣病関連新規情報伝達物質の動作原理

研究課題名(英文) Functional analysis for lifestyle diseases-related molecules based on molecular epidemiologic study

研究代表者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30509310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miRNA)は、蛋白質翻訳制御に関与する非コードRNAである。miRNAは体液中にも存在し、疾患との関連性やバイオマーカーとしての応用が期待されている。しかし、生物学的機能は不明である。本研究では、分子疫学調査で得たデータを用いて、血清中に存在する生活習慣病関連miRNAとしてmiR-22-3pを同定した。また、寿命関連転写因子Foxo3aは、miR-22-3p発現に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs(miRNAs) of the small, non-coding RNA family that regulate translational processing of target mRNAs. miRNAs in fluid might be associated with diseases and application to biomarker. However molecular and cellular mechanisms are largely unknown. In this study, we have identified lifestyle diseases-related miR-22-3p using molecular epidemiologic study. And we clarified that age-related transcription factor Foxo3a regulates expression level of miR-22-3p in serum.

研究分野：炎症学、組織再生学、老化学

キーワード：miRNA Foxo カロリー制限

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は、Ago2 (Argonaute2) 蛋白質と複合体を形成し、標的 mRNA に結合し蛋白質の翻訳抑制に関与する非コード RNA である。これまで miRNA は、細胞内において機能を発揮すると考えられていた。しかし現在は、miRNA は細胞内だけでなく血液や尿などの体液にも存在することが示されている。特に、血液中に存在する miRNA は、癌の診断マーカーとして期待されている。しかし、細胞外に存在する miRNA の生物学的機能や病態進展の関連性は、未だ明らかにされていない。

下等生物(酵母、線虫)から高等生物(マウス、サル、ヒト)に至るまで、摂食カロリーを適度に制限すると、癌や非腫瘍性疾患の発症率が低下し、寿命が延長することが明らかとなっている。これは、カロリー制限(CR: calorie restriction)効果として、ヒトの健康寿命延伸に寄与すると考えられている。これまで私たちは、寿命関連転写因子 Foxo ファミリーは、CR 効果の制御分子として中心的な役割を担っていることを解明してきた。(Yamaza et al, Aging Cell, 2010) (Shimokawa et al, Aging Cell, 2015)。ヒト FOXO3A 遺伝子におけるバリエーションは、ヒト寿命に直接影響を及ぼすことが報告されている(Li et al, Human Molecular Genetics, 2009)。Foxo ファミリーは、種々の miRNA の発現制御に関与していると考えられている。しかし、未だその分子間相互作用は解明されていない。

これまで私たちは、マウスサンプル(主要臓器および血液)を用いて、老化・代謝・CR 効果・生活習慣病などに関与する分子群の同定を行った。さらに、大規模コホート疫学調査から得たヒト血漿サンプルを用いて、マウスから得られた結果を基に、老化や生活習慣病に関連する血液循環 miRNA のスクリーニングを行った。その結果、種々の興味深い分子群を同定した。また、それら miRNA 群は、Foxo mRNA に作用することが、バイオインフォマティクスより推察された。

そこで本研究では、マウスから得られた結果と疫学コホート調査に基づくヒト由来サンプルから得られた結果を統合して、寿命や生活習慣病における、細胞内外の miRNA の機能解析に着手するに至った。

2. 研究の目的

- (1) CR における寿命関連転写因子 Foxo3a が関与する血液中 miRNA 発現動態解析
- (2) 老化過程における炎症性 miRNA の *in vivo* 機能解析

3. 研究の方法

- (1) CR モデルマウスの作製

CR モデルマウス作製は、生後 8 週齢の自由摂食 (AL) マウスと比べて 70% 食餌量を、生後 6 ヶ月に至るまで食餌させることにより作製した。

- (2) BALB/c miRNA 遺伝子欠損 (miR KO) マウスの作製

現在保持している miR KO マウスの系統は、C57BL/6 である。その miR KO マウスの系統を BALB/c へと変更した(いわゆるバッククロス)。具体的には、6 世代にわたりバッククロスを行った。

- (3) 表現系解析

miR KO マウスの食餌量(4週間毎)、体重(4週間毎)、寿命を測定した。途中で死に至ったマウスは、主要臓器を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。固定後、パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的検査を行った。

- (4) 遺伝子発現定量解析

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 (和光純薬工業)を用いて、マウス血漿サンプル中に含まれる Ago2 結合 miRNA を精製した。その後、cDNA を合成し (Exiqon)、定量 PCR (qPCR) を行った。

4. 研究成果

(1) CR における寿命関連転写因子 Foxo3a が関与する血液中 miRNA 発現動態解析
私たちは、大規模コホート疫学調査から得たヒト血漿サンプルを用いて、miR-22-3p は、健常者群と比較して、高血圧群および肥満群において有意に減少していること、動脈硬化群については、変化が認められなかったことを見いだした。

一方、本研究着目分子である miR-22-3p は、Foxo ファミリーによって相互作用していると推察されているが、その作用機序は明らかではない。そこで CR を施した Foxo3a ヘテロ欠損 (Foxo3a^{+/-}-CR) マウスを用いて、血中 Ago2 結合型 miR-22-3p 発現を解析した。その結果、Foxo3^{+/-}-CR マウスにおいて、miR-22-3p 発現は上昇していた(図1)。この結果は、Foxo3a は CR において miR-22-3p 発現調節を担っていることを示唆する。

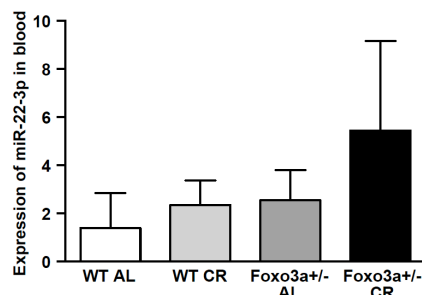


図1. miR-22-3p の発現動態
 (2)miR KO マウス (C57BL/6) の寿命解析
 miR KO マウス (C57BL/6) の長期寿命解析を行った。その結果、雄マウスの生存期間中央値は 54 週であることが明らかとなった。(図 2)

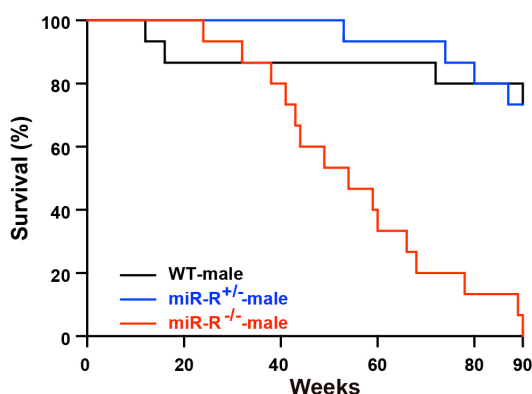


図 2. miR KO (雄) の寿命曲線

一方、雌マウスの生存期間中央値は 60 週であることが明らかとなった (図 3)。

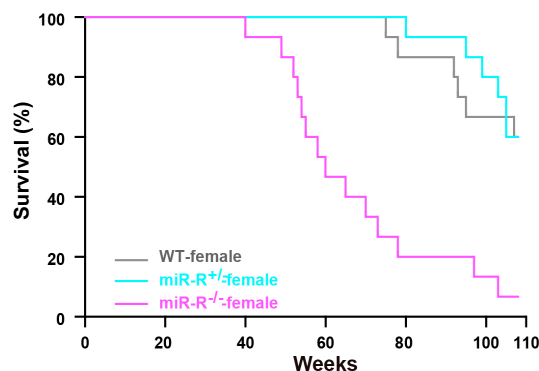


図 3. miR KO (雌) の寿命曲線

体重測定に関しては、コントロールに比べ miR KO マウスは、体重の上昇率が有意に低下した。しかしながら、両マウスにおける摂食量は、変化がなかった。

(3)系統変化による生存率変化の解析
 miR KO マウス (C57BL/6) は、生まれてまもなく死亡する。その原因として、系統が影響していることも珍しくない。そこで、BALB/c へのバッククロスを行い、解析を行った。その結果、miR KO (BALB/c) においても、生まれてまもなく死亡することが確認された。

(4)考察

本研究で着目している miR-22-3p は、寿命関連転写因子 Foxo3a との関連性が示唆された。今後は、血液中への miR-22-3p の放出機構、血液中における機能および病態発症への関与を明らかにしたい。

寿命などを主体とした一般的な miR KO マウスの表現系解析をまとめることができた。私たちが知る限り、単独の miRNA 欠損によって早死傾向が認められる報告はない。今後

は、本モデルマウスを用いて、生命恒常性維持機構の解明を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Doi H, Kitajima Y, Luo L, Yan C, Tateishi S, Ono Y, Urata Y, Goto S, Mori R, Masuzaki H, Shimokawa I, Hirano A, Li TS, Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Scientific Reports*, 査読有り, 6, 18844, 2016.
- ② Nunan R, Campbell J, Mori R, Pitulescu ME, Jiang WG, Harding KG, Adams HG, Nobes CD, Martin P, Ephrin-Bs drive junctional downregulation and actin stress fiber disassembly to enable wound re-epithelialisation. *Cell Reports*, 査読有り, 13, 1380-1395, 2015.
- ③ Kim SE, Mori R, Komatsu T, Chiba T, Hayashi H, Park S, Sugawa MD, Dencher NA, Shimokawa I, Upregulation of cytochrome c oxidase subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction. *Age (Dordr)*, 査読有り, 37, 9787, 2015.
- ④ Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, Kim SE, Kawata T, Park S, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Mori R, The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*, 査読有り, 14, 707-709, 2015.
- ⑤ Kamohara R, Yamaza H, Tsuchiya T, Komatsu T, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Otabe S, Yamada K, Nagayasu T, Shimokawa I, Overexpression of the adiponectin gene mimics the metabolic and stress resistance effects of calorie restriction, but not the anti-tumor effect. *Experimental Gerontology*, 査読有り, 64, 46-54, 2015.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 森 亮一、創傷治癒における microRNA の新機能、第 46 回日本創傷治癒学会、2016 年 12 月 9 日~10 日、東京大学伊東国際学術研究センター (東京都文京区)
- ② 森 亮一、下川 功、MiR-142 は皮膚創部

における黄色ブドウ球菌感染防御に必須である、第 62 回日本病理学会秋期特別総会、2016 年 11 月 10 日～11 日、金沢市文化ホール（石川県金沢市）

(4) 研究協力者
無し

- ③ Mori R, Identification of wound inflammation-related miRNAs: *miR-223*-deficient neutrophil improve *Staphylococcus aureus*-infected skin wound sites, EMBO conferences: The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair, 17-21 September 2016, Salerno (Italy).
- ④ 森 亮一、皮膚癒痕形成の分子メカニズム解明および核酸医薬開発への応用、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日～14 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）
- ⑤ 森 亮一、皮膚創傷治癒過程における *miR-223* の機能解析、第 45 回日本創傷治癒学会、2015 年 11 月 30 日～12 月 1 日、JP タワーホール&カンファレンス（東京都千代田区）
- ⑥ 森 亮一、田中 克弥、下川 功、組織修復及び炎症制御に関与する microRNA の病態生理学的解析、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔図書〕（計 1 件）

- ① Mori R, Park S, Shimokawa I, Springer, Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging (Editors: Nozomu Mori, Inhee Mook-Jung), Role of the forkhead box O family and neuropeptide Y in calorie restriction, 2015, pp. 199-208.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
無し

○取得状況（計 0 件）
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・
准教授
研究者番号：2 3 6 5 0 4 8 4

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し