

令和元年6月17日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09760

研究課題名(和文) インスリンシグナルを標的とする新規microRNAの同定とその意義の解明

研究課題名(英文) Analysis and identification of microRNA that regulates insulin signal pathway

研究代表者

井形 元維 (IGATA, MOTOYUKI)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：40599099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満・糖尿病モデルとして、過食をもたらすGold thioglucoseを投与後高シヨ糖高脂肪食を与えたマウスを使用した。本マウス肝においてmiR-222の発現増加を認め、in vitroで肝細胞にmiR-222を過剰発現させたところインスリン作用の減弱を認めた。miR-222の標的遺伝子としてインスリンシグナルの主要分子の1つであるIRS-1を見出し、両者の直接結合をルシフェラーゼアッセイにて確認した。実際に本マウス肝においてIRS-1の発現は低下していた。肥満・糖尿病による肝でのmiR-222発現増加がIRS-1の発現抑制を介してインスリンシグナルを負に制御していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦を含め世界中で肥満、糖尿病患者数は増加の一途を辿り、現社会における大きな問題の一つとなっている。肥満、糖尿病を予防・治療していくためには、その病態理解が重要であることは言うまでもない。近年、蛋白に翻訳されないnon-coding RNAが注目されており、我々はインスリン抵抗性とmicro RNAに注目し研究を行い、肝におけるインスリン抵抗性発症の一つの機序を明らかにした。microRNAは今後、疾患のバイオマーカーや治療への応用も期待されており、今後の研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on miR-222, the expression of which was increased in the livers of high fat/high sucrose diet-fed mice injected with gold thioglucose (G+HFHSD). Overexpression of miR-222 in primary mouse hepatocytes attenuated Akt phosphorylation induced by insulin, indicating that miR-222 negatively regulates insulin signaling. As per in silico analysis, miR-222 potentially binds to the 3' untranslated region (3' UTR) of the IRS-1 gene, a key insulin signaling molecule. In fact, IRS-1 protein expression was decreased in the livers of G+HFHSD-fed mice. We further confirmed a direct interaction between miR-222 and the 3' UTR of IRS-1 via luciferase assays. Our findings suggest that up-regulation of miR-222 followed by reduction in IRS-1 expression may be a viable mechanism of insulin resistance in the liver.

研究分野：代謝内科学

キーワード：microRNA インスリンシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は、遺伝子の転写後調節を行う重要な調節因子であり、発生、細胞増殖・分化、アポトーシス等の広範な生物学的プロセスに重要な役割を担っている。miRNA は 19 ~ 23 塩基長の小さな 1 本鎖 non-coding RNA で、自身と相補的配列を示す mRNA を標的とし、その分解を導く、あるいは翻訳を抑制することにより遺伝子発現レベルを調節する。miRNA に関してはこれまでに癌の領域を中心に研究が進んできたが、近年は膵臓やインスリン標的臓器においてインスリンシグナルや糖ホメオスタシスを制御することも明らかになってきている。

2. 研究の目的

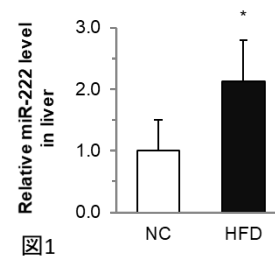
糖尿病領域における miRNA の研究はまだ歴史が浅く、その理解もまだ断片的である。糖尿病の病態には多くの臓器、細胞が複雑に関与しているため、多くの miRNA が糖尿病の病態制御に関わる因子として確認されることが予想される。本研究では、インスリン抵抗性やインスリン作用経路を制御する新たな miRNA を同定し、これまで知られていなかったインスリン抵抗性の病態の理解、糖尿病発症メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

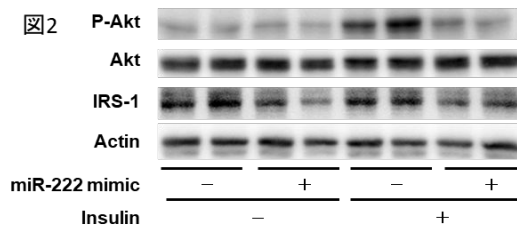
2 種類の肥満・糖尿病モデルマウス肝臓における miRNA マイクロアレイ解析の両方で発現上昇を認められた miR-222 に注目した。肥満・糖尿病マウスの諸臓器 (肝臓、脂肪、骨格筋) における miR-222 の発現を QPCR 法にて検討した。次に miR-222 を過剰発現させた初代培養肝細胞にインスリン刺激を行い、インスリンシグナルを検討した。In silico 解析にて miR-222 の標的遺伝子を検索、インスリンシグナルに関わる遺伝子を選定した。選定した標的遺伝子が真に miR-222 の標的となるのかをルシフェラーゼアッセイにて検討した。

4. 研究成果

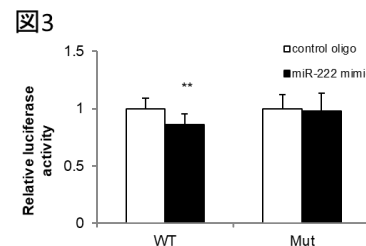
6 週齢の C57BL6 マウスに視床下部に作用し過食をもたらす Gold thioglucose を投与し、その後 24 週間高ショ糖・高脂肪食で飼育したマウスを肥満・糖尿病モデル (G+HFHSD) として使用した。本マウスの肝臓において miR-222 が約 2 倍に増加していることを Real-time PCR 法で確認した (図 1)。骨格筋においては miR-222 の発現増加を認めず、また白色脂肪組織においては miR-222 の発現増加傾向を認めたが有意ではなかった。



次にマウス初代培養肝細胞に microRNA mimic を用いて miR-222 を過剰発現させインスリン刺激を行ったところ、インスリン作用の指標となる Akt のリン酸化低下およびその下流分子である FoxO1 のリン酸化低下を認めた (図 2)。また肝糖新生系酵素である Pck1, G6Pase mRNA の発現増加を認め、肝でのインスリン作用減弱を確認することができた。



In silico 解析にて miR-222 の標的遺伝子を検索したところ、インスリン作用伝達経路の主要分子の一つである IRS-1 (insulin receptor substrate-1) がその候補であることがわかった。実際に前述の miR-222 過剰発現細胞において IRS-1 のタンパク発現は低下していた (図 2)。次に IRS-1 の 3'末端非翻訳領域 (3'UTR) を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを作成し培養細胞に miR-222 と共発現させたところ、ルシフェラーゼ活性の有意な低下を認め、これは miR-222 と IRS-1 の直接的な結合を示唆した (図 3)。



さらに IRS-1 3'UTR の miR-222 結合部位に変異を導入したレポーターベクターを作成し同様の実験を行ったところ、ルシフェラーゼ活性の低下を認めず、この結果からも miR-222 と IRS-1 の直接結合を証明することができた。我々の G+HFHSD 投与マウスの肝においても実際に IRS-1 タンパクの発現は減少、その一方で IRS-1 mRNA の発現はコントロールと比べて変化を認めなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Goto R, Senokuchi T, Kawashima J, Furukawa N, Motoshima H, Araki E: Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. *PLoS One* 13:e0191553, 2018.

(査読あり)

Kitano S, Kondo T, Matsuyama R, Ono K, Goto R, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E: The impact of hepatic HSP72 on insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018. (査読あり)

Kondo T, Goto R, Ono K, Kitano S, Suico MA, Sato M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E: Activation of heat shock response to treat obese subjects with type 2 diabetes: a prospective, frequency-escalating, randomized, open-label, triple-arm trial. *Sci Rep* 6:35690, 2016. (査読あり)

Igata M, Tsuruzoe K, Kawashima J, Kukidome D, Kondo T, Motoshima H, Shimoda S, Furukawa N, Nishikawa T, Miyamura N, Araki E: Coexistence of resistance to thyroid hormone (RTH β) and papillary thyroid carcinoma. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism* 2016:16-0003, 2016. (査読あり)

Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. *J Clin Biochem Nutr* 59(3):207-214, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, Goto R, Senokuchi T, Kawashima J, Furukawa N, Motoshima H, Araki E: Obesity-induced microRNA-222 impairs insulin signaling through the repression of IRS-1 expression in hepatocytes. 53th EASD Annual Meeting, 2017/9/11-2017/9/15, Feira Internacional de Lisboa, Lisbon, Portugal.

小野薫, 井形元維, 近藤龍也, 高木優樹, 北野さやか, 後藤理英子, 瀬ノ口隆文, 河島淳司, 荒木栄一: 肝臓においてIRS-1発現抑制を介してインスリンシグナルを制御するmicroRNAの同定. 第60回日本糖尿病学会総会. 2017/5/18-2017/5/20, 名古屋.

小野薫, 井形元維, 近藤龍也, 高木優樹, 北野さやか, 後藤理英子, 瀬ノ口隆文, 河島淳司, 荒木栄一: miR-222は肝臓においてIRS-1発現抑制を介してインスリンシグナルを制御する. 第55回日本糖尿病学会九州地方会. 2017/10/13-2017/10/14, 宮崎

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：荒木 栄一
ローマ字氏名：ARAKI, eiichi
所属研究機関名：熊本大学
部局名：大学院生命科学研究部
職名：教授
研究者番号（8桁）：10253733

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。