

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11024

研究課題名(和文) カロリー制限による老化と癌の制御におけるFMO3遺伝子の役割

研究課題名(英文) Roles of FMO3 in aging and carcinogenesis under calorie restriction

研究代表者

林 洋子 (HAYASHI, Hiroko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：40513221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Fmo3-mRNAはカロリー制限(CR)によって自由摂食群(AL)に対して発現が1000倍レベルで増加する。この効果はNpy遺伝子欠失マウスでは消失した。化学発癌モデルでは、Npy欠失マウスにおいてもCRによって腫瘍の増大が抑制された。この時、Fmo3-mRNAの発現は、CRでは増加したが、Npy欠失マウスで有意に減弱した。よって、CRの腫瘍抑制効果には、Fmo3非依存的経路が存在することが示唆された。Fmo3遺伝子欠失マウスホモ(-/-)、ヘテロ(+/-)、野生型(WT)集団を確立し、自由摂食(AL)条件で飼育を開始した。生後24週までの観察では、AL群の摂食量、体重には有意な差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、FMO3の機能を解析することによって、カロリー制限の効果の分子メカニズムをさらに深く解明することである。Xenobioticsは腸内細菌に修飾された後、肝臓に運ばれ、第1～3相の代謝を受ける。肝臓では、monooxygenase群酵素が、xenobioticsの第1相代謝に主要な役割を果たしている。よって、本研究で作成されるFMO3欠失マウスは、老化や癌の制御における第1相代謝の役割を実証する。腸内細菌と疾病の研究にも応用できる点で重要である。本研究成果は、ヒトの老化や癌の抑制に応用され、健康寿命の延伸に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of Fmo3-mRNA is increased by 1000-fold levels due to calorie restriction (CR) compared to the ad libitum feeding group (AL). This effect disappeared in Npy gene-deficient mice. In a chemical carcinogenesis model, CR also suppressed tumor growth in Npy-deficient mice. At this time, the expression of Fmo3-mRNA was increased in CR, but significantly attenuated in Npy-deficient mice. Therefore, it was suggested that there is an Fmo3-independent pathway for the tumor suppressive effect of CR. Fmo3 gene-deficient mouse homo (-/-), hetero (+/-), and wild-type (WT) populations were established and reared under free feeding (AL) conditions. Observations up to 24 weeks after birth showed no significant difference in food intake and body weight in the AL group.

研究分野：栄養学および健康科学

キーワード：FMO カロリー制限

1. 研究開始当初の背景

代表者らは、これまでに、カロリー制限 (Calorie restriction, CR) の長寿命・癌抑制効果に、視床下部神経ペプチドNeuropeptide (NPY)が必要であることを報告した (Chiba T, Hayashi H, 他、Sci Rep, 2014)。さらに、我々は、CRマウス肝臓では発現が増加するが、NPYを欠失させると発現が低下する遺伝子を同定した。中でも、対照群と比較して、CRマウスで1000倍程度増加するが、Npy欠失マウスでは発現が増加しない遺伝子として Flavin containing monooxygenase 3 (*Fmo3*)に着目した。*Fmo3*がコードするFMO3タンパク質は、肝臓の代謝酵素であり、近年、糖脂質代謝異常や動脈硬化を促進する分子として注目されているが、CR動物や寿命に関する報告は極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FMO3のCR状況下における機能を明らかにすることである。過栄養状態では代謝性疾患を引き起こすFMO3が、CR環境下で発現を大きく増加させる意味は何か、本研究では、FMO3の本来の機能を顕在化させる。本研究では、*Fmo3*遺伝子の肝臓における発現制御機構を明らかにし、次に、*Fmo3*欠失マウスを作成し、その役割を実証する。

3. 研究の方法

(1) CRマウス肝臓における*Fmo3*-mRNA発現制御解析: *Fmo3*遺伝子の転写には、Arh、FoxO1, Nrf2, CREB などの転写因子の関与も指摘されている。我々は、CRの寿命延長効果や抗腫瘍効果に*Foxo3*および*Foxo1*遺伝子が必要であることを報告した (Shimokawa I, Hayashi H, 他、Aging Cell, 2015; Yamaza H, Hayashi H, 他、Aging Cell, 2010)。 *Foxo1*, *Foxo3*遺伝子ノックアウトマウス (*Foxo1*^{-/-}, *Foxo3*^{-/-}) 肝臓から抽出されたmRNAの網羅的発現解析では、*Fmo3*-mRNAが野生型 (WT) に比べて、低下していることが示唆された。よって、我々の研究グループが有する*Foxo1*^{-/-}, *Foxo3*^{-/-}, WTマウスの肝臓組織を用いて、加齢に伴う*Fmo3*-mRNAの発現変化を調べた。

次に、生後12週より自由接触群 (AL) の70%量を給餌したカロリー制限マウス (24週齢) の肝臓を用いてFoxO1抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP)、引き続きqPCR法にて、FoxO1が*Fom3*遺伝子のプロモーター領域に結合することを確認することを試みた。

(2) *Fmo3*欠失マウスの作製: loxP配列を含む相同組換えベクターを構築し (Thermo社の第3世代CRISPR-Cas9) (図2、3)、FMO3-floxマウスを作製した。組換えES細胞株を樹立し、キメラマウスを作製。野生型マウスと交配後、F1ヘテロマウスを得た。これらをもとに、マウス実験群コロニーを確立した(図4)。

(3) *Fmo3*-mRNAがCRによって発現上昇しない*Npy*欠失マウスを用いた発癌実験：FMO3がCRによる腫瘍抑制に関与することを明らかにするために、*Fmo3*の発現がCRによって上昇しない*Npy*欠失マウスを用いて、化学発癌（肝臓癌）実験を行った。生後15日のオスマウスにdiethylnitrosamineを腹腔内投与し、生後12週から標準の餌を自由摂食させる群（AL）もしくは30%カロリー制限（CR）した。また、高脂肪食(HFD)を投与する群を加えた。28週齢で屠殺し、肝細胞癌の発症を検索した。

4. 研究成果

(1) カロリー制限下の*Fmo3*-mRNA発現制御解析:

生後6ヶ月のWTマウスにおいて、CRによってALに比べ*Fmo3*-mRNAが有意に増加することを確認した（*** $p < 0.0001$; 図1）。CR群において、*Fmo3*-mRNAは加齢によって増加する傾向を示した（2-f ANOVA; Age, $p = 0.0525$ ）が、WT、*Foxo1*^{+/-}、*Foxo3*^{+/-}群で有意な差はなかった。よって、in vivoでは、*Fmo3*-mRNAの発現制御におけるFoxO1、FoxO3転写因子の関与は証明できなかった。現在、クロマチン免疫沈降 (ChIP)、引き続きqPCR法にて、FoxO1を含む他の転写因子の関与を検討している。

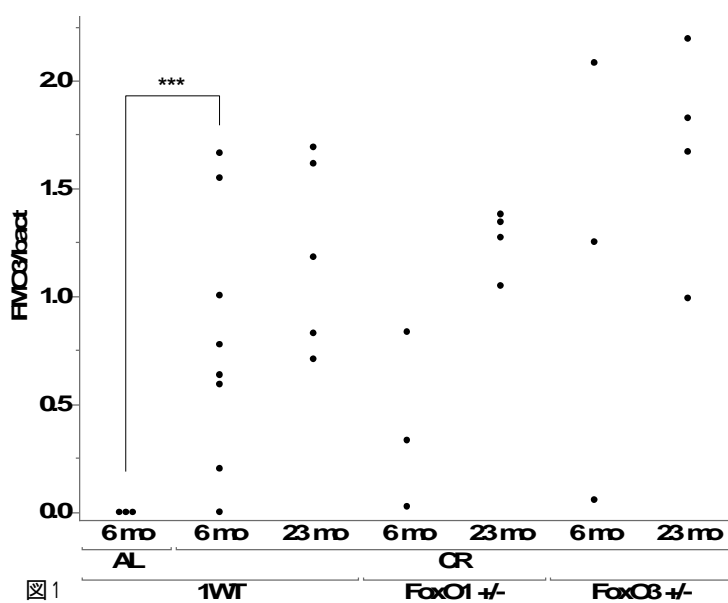


図1

(2) *Fmo3*遺伝子欠失マウスの作出と実験集団：*Fmo3*遺伝子欠失マウスホモ (-/-)、ヘテロ (+/-)、野生型 (WT) 集団を確立し、自由摂食 (AL)、CR条件で飼育を開始した (図4)。現在、実験群は生後6ヶ月を超えているが、*Fmo3*^{-/-}マウスとWTマウスにおいて、摂食量や体重に有意な変化はない。

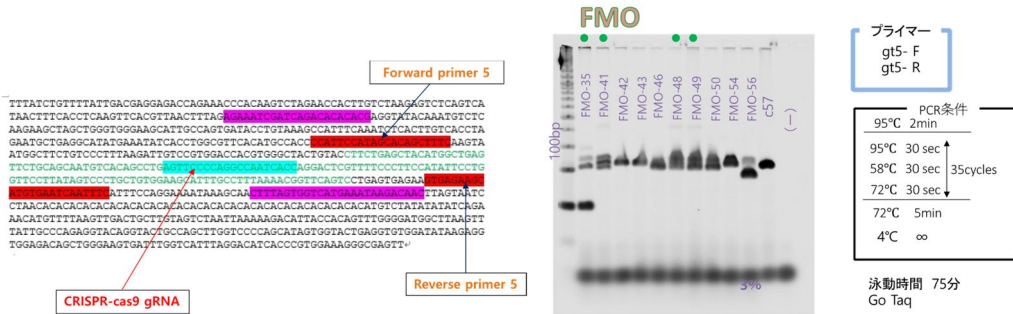


図2 Fmo3遺伝子欠失マウスの遺伝子配列

図3 Fmo3欠失マウスのPCR判定

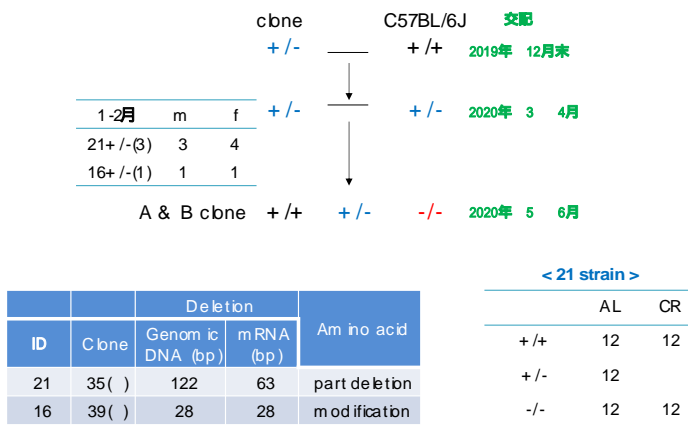


図4 Fmo3 欠失マウス実験群の作製

(3) Fmo3-mRNAがCRによって発現上昇しないNpy欠失(-/-)マウスを用いた発癌実験：化学発癌モデルでは、Npy欠失マウスにおいて、対照 (Ctrl) マウスに対して腫瘍の発生が増加した (図5：Likelihood ratio test; Genotype, p = 0.0413) CRによって腫瘍の発生が抑制された (Likelihood ratio test; Diet, p = 0.0494)。よって、肝臓癌の発症にFmo3が関与していることは示唆されるが、CRの腫瘍抑制効果には、Fmo3非依存的経路が存在することが示唆された(Kinoshita A, Hayashi H他、Acta Medica Nagasakiensia 2019; Komatsu T, Hayashi H他、Nutrients 2019)。

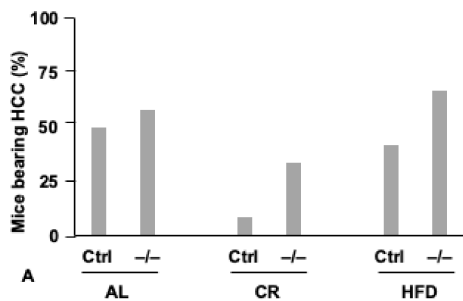


図5 . 肝臓癌 (HCC) を有するマウスの割合 (%) (Kinoshita A, Hayashi H他、Acta Medica Nagasakiensia 2019; Komatsu T, Hayashi H他、Nutrients 2019)

(4) 今後の研究の推進方策:

Fmo3遺伝子欠失マウスの実験集団の作出に時間がかかったため、マウス個体を用いた研究が遅れた。Crisper-Cas9によるゲノム編集が他遺伝子よりも困難であったこと（理由は不明）、産仔数が少ないことによって、実験に必要なマウス数を確保するために時間を要した。

Npy欠失マウスを用いた化学発癌による肝細胞癌モデルにおいては、CRの腫瘍抑制効果におけるFMO3の役割を強く支持する結果は得られなかった。しかしながら、最近、*Fmo3*遺伝子の過剰発現マウスモデルでは、肝臓における細胞老化のマーカーや酸化ストレス、炎症などが低下し、CRと類似した効果を誘導することが報告された（Guo D他、Aging 2020）。In vitroの実験では、FMO3が幹細胞のERストレスを軽減することも報告されている（Liao BM他、Mol Endocrinol 2016）。よって、*Fmo3*欠失マウスとCRを組み合わせた研究は、CRの効果にFMO3が関与していることを直接実証すると予測される。今後は、作出されたマウス集団をさらに拡大し、加齢に伴う細胞老化や酸化ストレス、ERストレス、炎症マーカーを経時的に観察する。最終的には、寿命研究を行い、老化の進展とCRの抑制におけるFMO3の役割を明らかにする。

論文実績：

Mechanisms of Calorie Restriction: A Review of Genes Required for the Life-Extending and Tumor-Inhibiting Effects of Calorie Restriction. Komatsu T, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamaza H, Shimokawa I. *Nutrients*. 2019 Dec 16;11(12):3068. doi: 10.3390/nu11123068.

Kinoshita A., Hayashi H., Kusano N., Inoue S., Komatsu T., Mori R., Park S., Takatsuki M., Eguchi S., Shimokawa I. Neuropeptide Y inhibits hepatocarcinogenesis in overnutrition in mice. *Acta Medica Nagasakiensia*. 2019;41:711–722.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森 亮一 (MORI Ryoichi) (30509310)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	下川 功 (SHIMOKAWA Isao) (70187475)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関