

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07198

研究課題名(和文) 脂質生合成調節因子MLXIPLに作用するマイクロRNAに関する研究

研究課題名(英文) Study of microRNAs to act on a lipid homeostasis transcription factor MLXIPL

研究代表者

柴山 良彦 (SHIBAYAMA, Yoshihiko)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90593822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MLXIPLはトリグリセリド合成を担う遺伝子群を糖質濃度依存的に活性化させる転写因子である。本研究では相補的に結合するマイクロRNA(miR)について分析した。miR-127-5pおよび-129はMLXIPL発現を有意に抑制することを見出した。高脂肪食を50週間自由摂取させたマウス肝臓において、miR-127と-134は上昇し、血漿中でも上昇することが認められた。それらの遺伝子上流にある転写開始領域について分析したところH3K27Acは有意に上昇していた。これらの結果から高脂肪食はエピジェネティックな変化を及ぼし、miR発現が変化することで細胞機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食事環境は生活習慣病の発症に影響する重要な因子であるが、その分子生物学的機序は不明な点が多い。本研究ではトリグリセリド合成や糖質濃度依存的にエピジェネティックな変化を司る転写因子であるMLXIPLと、その相補的なマイクロRNA(miR)に着目して研究を行った。miR-127はMLXIPLを抑制すること、高脂肪食により肝臓と血清での発現量が上昇することを見出した。高脂肪食は生活習慣病の発症に影響するが、本研究の結果はmiR-127とMLXIPLが薬物治療およびバイオマーカーとして応用できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：MLXIPL is a transcription factor which activates genes expression associated triglycerides metabolism in a concentration-dependent manner by carbohydrate concentration. It was not clear that specific microRNAs(miR) binding to MLXIPL mRNA. Complementarily miRs counteracting MLXIPL mRNA were investigated in the present study. MiR-127 and miR-129 were significantly degraded MLXIPL mRNA. Expression levels of miR-127 and miR-134 in the liver was significantly increased in high-fat diet (HFD) fed mice, as well as expression levels in the serum significantly increased. HFD feeding altered histone acetylation. Histone acetylation levels of upstream promoter region of miR-127 gene was significantly increased in HFD fed mice compared with standard diet fed mice. It was reported that MLXIPL have important role in histone acetylation. These results suggested that miR-127 may affect MLXIPL expression level, result in alteration histone acetylation.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高脂肪・糖質食に伴う肝疾患は増加しているが、に非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) があるが、その確立された治療薬や診断法は無く、多くの研究が進められている。本研究では脂質合成の重要な転写因子と、細胞機能を制御する RNA であるマイクロ RNA (miR) に着目し、研究を開始した。糖質の過剰摂取でも脂肪肝が形成されるが、糖質から脂質合成を担う転写因子の 1 つに MLXIPL (MLX Interacting Protein Like、別名 ChREBP) が知られている。miR は細胞内で合成される RNA の 1 つで蛋白質に翻訳はされないが、相補的に結合するメッセンジャー RNA を分解・抑制することで、蛋白質発現レベルを制御する。miR は細胞機能を微調整する Fine-tuner として機能しているが、本研究では MLXIPL と miR に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

脂肪肝の 3 大原因は肥満、2 型糖尿病、アルコール多飲であるが、最近、非飲酒者で肥満、2 型糖尿病、高脂血症、高血圧などいわゆる生活習慣病を有する患者の増加とともに、これらを基盤とする脂肪肝患者が欧州先進国やわが国で増加している。このような脂肪肝は NAFLD と呼称されており、本邦では成人男性の 3~4 割、女性で 1~2 割の成人が罹患する有病率の高い肝疾患である。NAFLD 患者の 1~2 割は、脂肪変性に壊死炎症性変化を伴い、肝硬変や肝細胞がんの原因となる非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) に進行する。ノンコーディング RNA の 1 つ、マイクロ RNA (miR) は蛋白質の発現を抑制し、細胞機能を微調整する Fine-tuner として機能している。しかし高脂肪食が miR 発現に及ぼす影響はあまり知られていない。本研究では高脂肪食が miR 発現に及ぼす効果を in vitro とマウスを用いて分析した。

3. 研究の方法

(1) 試薬 miRNeasy Mini Kit は Qiagen (Valencia, CA, USA) hsa-miR-127-5p mimic は Bioneer (Daejeon, Republic of Korea) MLXIPL の siRNA は Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, EHU094041) PCR プライマーはファスマック (厚木市) ScreenFect siRNA および他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪市) から購入した。血液生化学検査値はオリエンタル酵母工業株式会社 (長浜市) に依頼して測定した。

(2) 動物実験 動物実験は北海道医療大学動物実験委員会の承認 (第 026 号) を得て実施した。10 週齢の C57BL6J 雄性マウスに自由摂食させ、60 週間飼育した。飼料には脂肪・ショ糖添加量を増加させた Quick Fat あるいは標準飼料 CE-2、0.6% (w/v) (日本クレア) を使用し、Quick Fat 投与群 (HFD) 標準飼料投与群 (Standard diet) の 2 群について体重と摂食量を調べた。肝臓および血清を採取し、mRNA、miR の発現量についてマイクロアレイ法により miR の発現変化を分析した (Affymetrix, Contract analysis, Filgen Inc.)

(3) マイクロアレイ分析 miRNeasy Mini Kit を用いて miR を分離し、分析は GeneChip miRNA Array 受託解析サービスに委託して行った (Filgen, Inc. Nagoya)

4. 研究成果

(1) 摂食量、体重、血中脂質濃度、肝臓における Histone acetyltransferase 活性 SD 群と比較すると、SD、HFD 群では 4 週後以降は有意に体重が上昇した。2 週おきに飼料の減少量を測定し、1 匹当たりの摂食量を測定した。摂食量 (g) に有意差は認められなかったが、摂取カロリーは SD 群と比較すると、HFD 群で有意に高かった。肝臓の質量は HFD 群で有意に上昇し、脂肪肝が認められた。血漿コレステロール、ChE コリンエステラーゼ値は HFD 群で有意に上昇した。

(2) miR および mRNA 発現

マイクロアレイ解析において、発現が log₂ 比で 3 以上 (8 倍以上あるいは 0.125 倍以下) の変化を表 2 に示す。発現が上昇した miR のほとんどは染色体 12 の qF1 から qF2 領域に集中していた (図 1)。一方、X 染色体の qA7.1 にある miR は発現が低下した。

(3) miR 発現

血漿中 miR 発現を分析したところ、マイクロアレイ解析において発現上昇が認められた miR-370-3p、miR-485-5p は上昇し、miR-134-5p は低下する傾向が認められた。(表 1)

(4) hsa-miR-127-5p のノックダウン効果

hsa-miR-127-5p 前駆体を WiDr あるいは COLO201 細胞に導入し、MLXIPL に対するノックダウン効果を調べたところ、有意に発現が低下した (表 2)

(5) Chip アッセイ

図 1 に示した miR クラスター上流にある DNA の、ヒストン修飾部分について Chip アッセイでの評価を行った。HFD により H3K27 のアセチル化が有意に上昇していた (SD 群: 1.00 ± 0.22 , HFD 群: 3.21 ± 0.54 平均値 \pm 標準偏差を示す)。図 3 に示した miR 上流では HFD により H4K4 のメチル化が有意に上昇していた (SD 群: 1.00 ± 0.54 , HFD 群: 10.80 ± 0.54 平均値 \pm 標準偏差を示す)。

図 1 HFD により発現が有意に亢進した miR

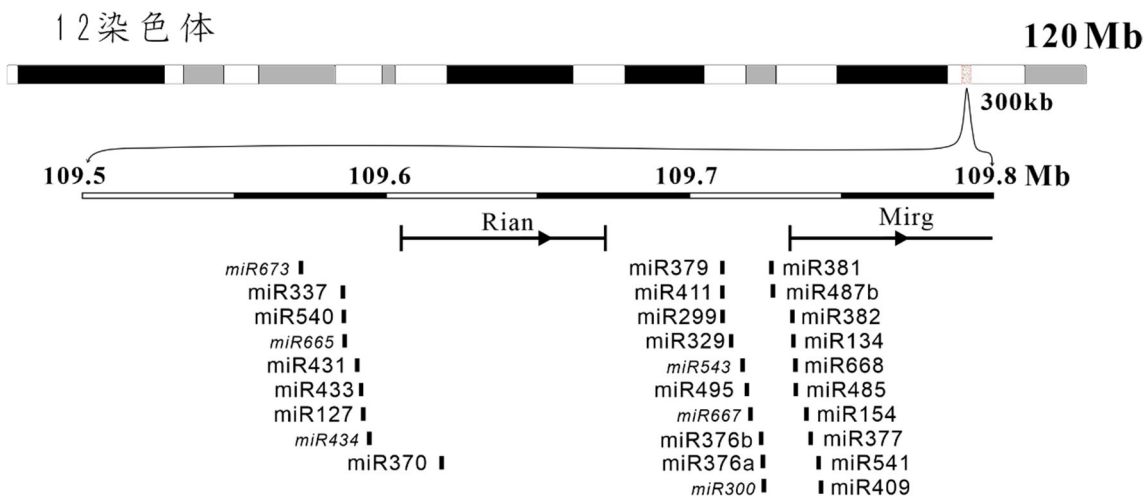


表 1 第 12 染色体における HFD により発現量が変化した miR

	Liver (Array)		Serum	
	SD	HFD	SD	HFD
<i>mmu-miR-127-5p</i>	1.19 \pm 0.20	34.28 \pm 23.94	1.04 \pm 0.14	48.37 \pm 10.14**
<i>mmu-miR-129-5p</i>	2.37 \pm 0.49	5.36 \pm 2.30	1.13 \pm 0.47	2.20 \pm 1.60
<i>mmu-miR-134-5p</i>	5.03 \pm 3.41	278.7 \pm 169.9	1.12 \pm 0.25	0.21 \pm 0.07**
<i>mmu-miR-370-3p</i>	1.62 \pm 0.23	22.04 \pm 15.98	1.03 \pm 0.14	10.62 \pm 4.34
<i>mmu-miR-337-5p</i>	1.10 \pm 0.05	4.53 \pm 2.35	1.13 \pm 0.34	40.30 \pm 31.94
<i>mmu-miR-376b-3p</i>	1.78 \pm 0.09	426.0 \pm 273.4	1.15 \pm 0.32	11.47 \pm 8.96
<i>mmu-miR-379-5p</i>	18.2 \pm 13.7	2,037.8 \pm 1176.5	0.97 \pm 0.22	3.80 \pm 1.12
<i>mmu-miR-409-3p</i>	2.17 \pm 0.12	449.6 \pm 259.6	1.12 \pm 0.33	0.94 \pm 0.32
<i>mmu-miR-485-5p</i>	1.33 \pm 0.15	106.4 \pm 61.4	1.09 \pm 0.24	20.88 \pm 8.80
<i>mmu-miR-543-3p</i>	1.25 \pm 0.18	67.1 \pm 43.2	0.91 \pm 0.26	0.89 \pm 0.29

平均値 \pm 標準誤差を示す。compared with SD group. Student-t test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

表 2 miR127-5p による MLXIPL へのノックダウン

mRNA	NC	siRNA	hsa-miR-127-5p mimic
WiDr	1.00 \pm 0.13	0.21 \pm 0.08**	0.24 \pm 0.10**
COL0201	1.00 \pm 0.13	0.14 \pm 0.05**	0.11 \pm 0.04**

平均値 \pm 標準誤差を示す。NC: negative control との比較 ** $p < 0.01$, Tukey-kumer test

今回、HFD が miR 発現に及ぼす影響を網羅的に分析した結果、高度に変化する miR クラスターがあることが示唆され、HFD は miR 発現を変化させることで遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。発現が高度に上昇した miR-127 は、インフォマティクス解析により MLXIPL への高度な相補的結合を示すことが示唆されたため、in vitro 実験で検証したところ、有意なノックダウン効果が認められた。miR-127 は肝臓だけでなく、血清中でも有意に上昇することが認められたため、NAFLD のバイオマーカーとして応用できる可能性も考えられた。HFD はヒストン修飾の変化を介して miR の発現を変化させ、細胞機能に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、さらなる検討が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴山良彦、中川勉、久保義忠
2. 発表標題 高脂肪食の長期摂取がマイクロRNA発現に及ぼすマウスにおける影響
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------