

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16523

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質による抗線維化・抗炎症性miRNAの新たな産生阻害機構の解明

研究課題名(英文) The effect of RNA binding proteins on regulatory mechanisms of anti-fibrotic and anti-inflammatory miRNA biogenesis

研究代表者

樋口 琢磨(Higuchi, Takuma)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：10754567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質複合体であるNF90-NF45は、複数のmiRNAの生合成を抑制する。非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスの肝臓においてNF90とNF45の発現増加が認められたため、我々はNASHにおけるNF90-NF45の影響の検討を試みた。その結果、NASHモデルマウス肝臓において発現増加したNF90-NF45はmiR-483-5pの産生を阻害し、当該miRNAの標的であるコラーゲン分解阻害因子Timp2の発現を増加させることで、肝線維化に寄与する可能性を見出した。加えて、肝臓特異的NF90欠損マウスの作製にも成功したため、今後、当該マウスを用いた解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性の脂肪肝疾患の一つであるNASHは、肝硬変や肝細胞がんへと進行することから予後不良であるが、現時点でNASHに対する治療法は十分に確立されていない。加えて、NASHの発症・増悪化を司る肝炎・肝線維化進展の制御メカニズムについても不明な点が多く残されている。本研究結果から、NASHモデルマウス肝臓におけるNF90-NF45の発現増加がmiRNAの産生抑制を介して肝臓の線維化を制御する可能性が見出された。本研究成果はNASHに対する新規治療法開発の礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：NF90-NF45, a complex of RNA binding proteins (RBPs), suppresses multiple miRNA biogenesis. We found that expression levels of NF90-NF45 were elevated in the liver of Non-alcoholic state hepatitis (NASH) model mice. However, the influence of NF90-NF45 on fibrosis and inflammation of the liver under NASH is still unclear. In this study, we found the possibility that NF90-NF45 induced suppression of anti-fibrotic miRNA (miR-483-5p) production, leading to up-regulation of Timp2, which is a metalloproteinase inhibitor and direct target of miR-483-5p, resulting in liver fibrosis. Moreover, we generated liver-specific NF90 deficient mice. To confirm the RBPs-miRNA-fibrosis axis, we are attempting to analyze the fibrosis and inflammation of the liver in this mouse by immunohistochemistry, biochemical blood test, and glucose tolerance test.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：miRNA RNA結合タンパク質 NF90 NASH 線維化 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

機能性小分子 RNA であるマイクロ RNA(miRNA)は、相補的または一部相補的な mRNA に結合することで翻訳抑制および mRNA 分解を引き起こし、標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA の異常な発現変動は、がんを始めとする様々な疾患の発症に関与することが知られている。特にがん組織においては、がん抑制的な作用を有する miRNA の産生低下が報告されており、当該 miRNA は正常組織において発がん抑制に寄与する。したがって、疾患病態における miRNA の発現変動の機序解明は、様々な疾患の発症・増悪化のメカニズムを解明する上で非常に重要である。

我々はこれまで、二本鎖 RNA 結合タンパク質 Nuclear Factor 90(NF90)が結合パートナーである NF45 と複合体 (NF90-NF45) を形成し、miRNA の初期転写産物に結合することで、複数の miRNA の生合成を阻害することを *in vitro*, *in vivo* の両系で見出してきた (Sakamoto, Higuchi [3rd] *et al.*, MCB, 2009)(Todaka, Higuchi [2nd] *et al.*, MCB, 2015)。さらに我々は、肝細胞がん患者の手術検体における解析から、NF90-NF45 の発現が正常組織と比較しがん組織において顕著に増加していることを見出した。加えて、発現増加した NF90-NF45 はがん抑制 miRNA である miR-7 の産生を阻害することで細胞増殖促進的に作用することを報告してきた (Higuchi *et al.*, JBC, 2016)。

これらの知見は、NF90-NF45 の発現増加が miRNA の生合成抑制を介して発がん・がん悪性化に寄与することを示唆しているが、NF90-NF45 が発がんに至るどの段階に寄与しているのかは不明であった。我々は、肝細胞がん組織の悪性度の進行と NF90-NF45 の発現量に相関傾向が見られるとともに、一部の非がん組織のなかでも慢性肝炎・肝硬変を示す組織では NF90-NF45 の発現が検出できることを見出し、「発がんへと至る前がん状態において NF90-NF45 の発現は増加し、発がんおよびがんの増悪化を強く促すのではないかと想定した。

上記仮説の検証のため我々は、肝細胞がんの前がん状態の一つである非アルコール性脂肪肝炎 (Non-Alcoholic State Hepatitis: NASH) に着目した。NASH は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんへと進行する予後不良の慢性肝疾患である。興味深いことに、NASH 患者の肝臓組織においても、がん抑制 miRNA および線維化抑制または炎症抑制作用を有する miRNA の発現が顕著に低下することが報告されており、miRNA の産生低下が NASH 発症に関与することが示唆されている。そこで、NASH モデルマウスの肝臓における NF90-NF45 の発現量の測定を行ったところ、野生型マウスの肝臓と比較し、NF90 および NF45 の発現が顕著に増加していた。一方で、糖尿病および単純性脂肪肝モデルである高脂肪食給餌マウスの肝臓では NF90、NF45 の発現増加は認められなかった。

上記の結果から、我々は「肝臓における NF90-NF45 の発現増加は、抗線維化、抗炎症、がん抑制の機能を有する miRNA の産生を阻害し、NASH の発症・増悪化を誘発することで、肝硬変および肝細胞がんへの進展を促す」という作業仮説の着想に至った(図 1)。本系は、不明な点が多く残されている NASH の発症機序および NASH からの肝硬変・肝細胞がんへと進展する分子メカニズムの解明につながる可能性がある。

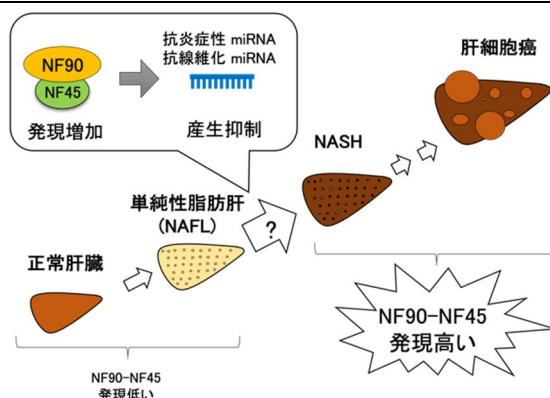


図1 NF90-NF45 の発現増加と肝疾患進展モデル

## 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞がんへ進展の可能性がある NASH における肝線維化・炎症の進行に対して、RNA 結合タンパク質複合体 NF90-NF45 による miRNA 産生阻害機構が影響を与えるか否かを検証する。

## 3. 研究の方法

NF90-NF45 による miRNA 生合成阻害が NASH 病態に与える影響を検証するため、下記の 2 つの項目を中心に解析を進めた。

### 肝臓において NF90-NF45 が産生制御する抗線維・抗炎症 miRNA および標的遺伝子因子の同定

野生型マウス (C57BL6) に対してコリン・メチオニン欠乏飼料 (MCD 食) を給餌することで、当該マウスの肝臓では NASH の症状である線維化・炎症が誘導される。また当該モデルマウスの肝臓では通常食給餌マウスの肝臓と比較し NF90 および NF45 の発現が顕著に増加していることから複数の miRNA の発現変動が予測される。そこで、NASH 病態における miRNA および肝線維化・炎症関連遺伝子の発現を検討するため、MCD 食給餌マウスの肝臓から total RNA を抽出して全転写

物アレイ(1)および miRNA アレイ(2)という二種のマイクロアレイを実施した。さらに肝細胞がん由来の培養細胞を用いて NF90 をノックダウンした際に発現変動する miRNA を miRNA アレイ(3)にて検討した。上記3種のマイクロアレイの解析結果を組み合わせ、「NASH モデルマウス肝臓において発現増加した NF90-NF45 が制御する抗線維化・抗炎症 miRNA」および「当該 miRNA の標的遺伝子」の絞り込みを試みた。

### 肝臓特異的ノックアウトマウスの作製と NASH 病態の評価

NF90 および NF45 はこれまで成体のマウスの胸腺、精巣、卵巣、脳において高く発現している一方で、肝臓での発現が低く、肝臓における NF90-NF45 の機能については十分に解析されていなかった。前述の通り我々は、MCD 食を給餌することで作製した NASH モデルマウスの肝臓において NF90、NF45 の発現が顕著に増加することを見出した。この「肝臓における NF90、NF45 の発現増加」は単純性脂肪肝モデルである高脂肪食給餌マウスの肝臓では見られないため、発現増加した NF90-NF45 が NASH 病態を誘発し、肝硬変、肝細胞がんへと進行する可能性が想定される。この仮説を検証するためには「NF90 ノックアウトマウス」の作製が必須である。しかしながら、NF90 の全身性ノックアウトマウスは周産期致死となることが報告されているため肝臓特異的ノックアウトマウスを作製する必要がある。今回、CRISPR/Cas9 系を用いてマウス NF90 遺伝子の第4エクソンの前後に loxP 配列を挿入した NF90<sup>lox</sup> マウスを作製し、loxP 配列で挟まれた領域を組み替える Cre-recombinase を肝臓特異的に発現させるマウス(Alb-Cre マウス)と交配することで、肝臓特異的 NF90 欠損マウスを得る。得られた当該マウスに対し MCD 食を給餌し、NASH 発症・病態の進行と NF90-NF45 との関連性の解明を試みた。

### 4. 研究成果

#### 肝臓において NF90-NF45 が産生制御する抗線維化・抗炎症 miRNA および標的遺伝子因子の同定

通常食給餌マウスおよび MCD 食を給餌して作製した NASH モデルマウスの肝臓から totalRNA を抽出し、全転写物アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した(図2-(1))。その結果、通常食給餌マウスと比較し MCD 食給餌マウスの肝臓において、発現が2倍以上に増加した遺伝子が1048個、発現が1/2以下に低下した遺伝子が462個見出された。特に発現増加する遺伝子には肝線維化のマーカージンである SMA や Col1a2 が含まれており、MCD 食給餌マウスは NASH 病態を示すことが確認された。さらに、miRNA の網羅的発現解析を実施した結果、コントロールマウスと比較し NASH モデルマウス肝臓で発現が半減した miRNA は47個検出された(図2-(2))。一方で、これらの miRNA は NF90-NF45 以外の因子の影響を受けて産生低下している可能性も考えられる。上記の候補 miRNA の中から NF90-NF45 によって産生制御される miRNA を絞り込むため、ヒト肝細胞がん細胞株において NF90 をノックダウンした細胞における miRNA の発現変動についても miRNA アレイにより解析した(図2-(3))。NF90 のノックダウンにより産生増加する miRNA と NASH モデルマウスで産生低下する miRNA を比較し、両アレイに共通する miRNA を探索した。その結果、miR-483-5p を見出した(図2)。

miR-483-5p は HCC 患者の検体においては発現低下が報告されている miRNA であり、マウスにおいては線維化制御に関与するコラーゲン分解阻害遺伝子 Timp2 を直接の標的とすることが報告されている。さらに注目すべきことに、図2-(1)で示した MCD 食給餌マウス肝臓における網羅的遺伝子発現解析において発現

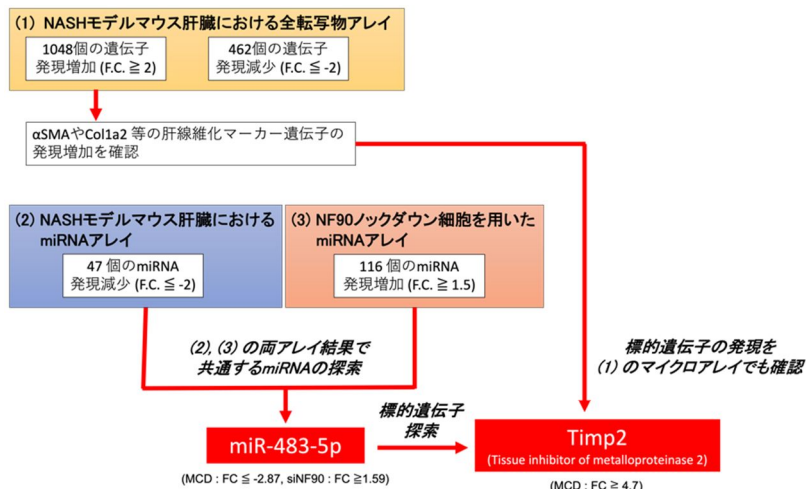


図2 NASHモデルマウス肝臓およびNF90ノックダウン細胞を用いたマイクロアレイ解析の概略図

### Hypothesis model

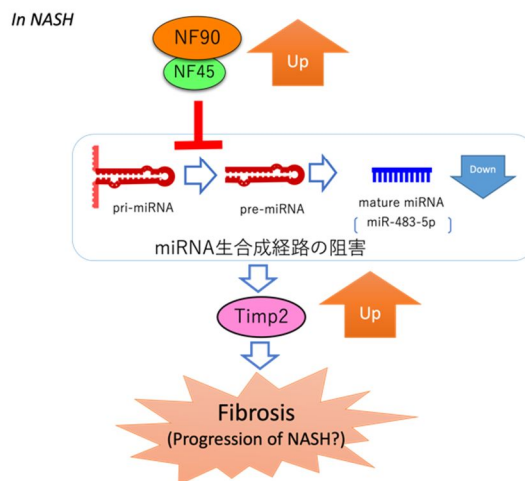


図3 NF90-NF45発現増加によるNASH肝線維化進展の仮説モデル

さらに注目すべきことに、図2-(1)で示した MCD 食給餌マウス肝臓における網羅的遺伝子発現解析において発現

が2倍以上に増加した遺伝子群に Timp2 は含まれている (図 2)。NASH モデルマウス肝臓における Timp2 の発現変動を qRT-PCR および Western Blotting によってさらに検討したところ、通常食給餌マウスと比較し MCD 食給餌マウスの肝臓において Timp2 の発現は RNA レベルでは約 6 倍、タンパク質レベルでは約 2 倍に増加していた。以上の結果から「NASH モデルマウス肝臓で発現増加した NF90-NF45 は、miR-483-5p の産生阻害を介して Timp2 の発現を増加させ、NASH 病態である肝線維化進展に寄与する」という仮説モデルを示すことができた(図 3)。

#### 肝臓特異的ノックアウトマウスの作製と NASH 病態の評価

C57BL6 マウスの受精卵に Cas9 タンパク質、ガイド RNA (gRNA)、一本鎖 DNA (ssDNA、loxP 配列を含む) をエレクトロポレーションにより受精卵に導入し、マウスの作製を行った。当初、NF90 遺伝子の第 4 エクソンの前後 (第 3 イントロンおよび第 4 イントロン) に loxP を挿入するため、長鎖 ssDNA を用いて二箇所の loxP 配列を同時に挿入する手法を試みていたが、得られた遺伝子改変マウスで loxP 配列の部分欠損や変異挿入が多発し、目的の NF90<sup>fllox</sup> マウスの作製は難航した。そこで、短鎖 ssDNA を用いて第 4 イントロンに loxP を導入したマウスを作製し、生まれた産仔を繁殖させた後に第 3 イントロンに loxP を再導入するという「二段階導入方式」を試みた。その結果、目的とする NF90<sup>fllox</sup> マウスの作製に成功した。作製した NF90<sup>fllox</sup> マウスを Alb-Cre マウスと交配し、肝臓特異的 NF90 欠損マウスを作製できた。得られたマウスにおける NF90 の発現を Western Blotting により検討したところ、コントロールマウスと比較し肝臓において NF90 の発現量の著しい減少が認められた (図 4)。一方で、他の臓器である胸腺等においては NF90 の発現変動は見られなかった。今回、当該マウスを用いた NASH 病態の解析までは至らなかったが、当該マウスの産子数を増やし MCD 食を給餌する準備を進めている。当該マウスに対する MCD 食給餌実験を通して、NASH の発症・病態の進展における NF90-NF45 の影響を検討していく予定である。

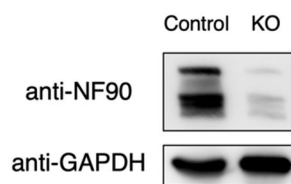


図4 作製した肝臓特異的NF90欠損マウス(KO)の肝臓におけるNF90の発現量の解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sylvia Lai, Takuma Higuchi, Masayuki Tsuda, Yasunori Sugiyama, Keiko Morisawa, Taketoshi Taniguchi, Shuji Sakamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 NF90-NF45 is essential for cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12600-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi Takuma, Kiernan Rosemary, Sakamoto Shuji	4. 巻 65
2. 論文標題 Characteristic analysis of a secondary structure of primary microRNA bound to a double-strand RNA-binding protein, NF90	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 13～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/electroph.65.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawamura Kaz, Higuchi Takuma, Fujiwara Shigeki	4. 巻 41
2. 論文標題 YAF2-Mediated YY1-Sirtuin6 Interactions Responsible for Mitochondrial Downregulation in Aging Tunicates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00047-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mcb.00047-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Grasso Giuseppa, Higuchi Takuma, Mac Victor, Barbier Jerome, Helmoortel Marion, Lorenzi Claudio, Sanchez Gabriel, Bello Maxime, Ritchie William, Sakamoto Shuji, Kiernan Rosemary	4. 巻 48
2. 論文標題 NF90 modulates processing of a subset of human pri-miRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6874～6888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakane Tatsuto, Ido Aya, Higuchi Takuma, Todaka Hiroshi, Morisawa Keiko, Nagamine Tadashi, Fukunaga Kensaku, Sakamoto Shuji, Murao Koji, Sugiyama Yasunori	4. 巻 512
2. 論文標題 Candidate plasticity gene 16 mediates suppression of insulin gene expression in rat insulinoma INS-1 cells under glucotoxic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 189 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂本 修士、樋口 琢磨、古株 彰一郎、藤田 浩志、池 恩燮、森澤 啓子、絹川 勝晶、戸高 寛、松川 和嗣、杉山 康憲、津田 雅之
2. 発表標題 二本鎖RNA結合タンパク質(RBP)による筋分化制御因子MyoDの転写活性化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 琢磨、坂本 修士
2. 発表標題 二本鎖RNA結合タンパク質が結合するマイクロRNA初期転写産物の構造的特徴の解析
3. 学会等名 第70回日本電気泳動学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田 浩志、樋口 琢磨、森澤 啓子、Sylvia Lai, 山口 輝, 坂本 修士
2. 発表標題 RNA結合タンパク質による腫瘍血管新生の新規分子メカニズムの探索
3. 学会等名 第61回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 修士、山口 輝、森澤 啓子、樋口 琢磨、Lai Sylvia、池 恩燮、藤田 浩志、杉山 康憲、松川 和嗣、津田 雅之
2. 発表標題 マイクロRNAの機構を介した骨格筋の細胞融合及び成熟化の新規制御機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口琢磨, 宗景玄祐, 矢生健一, 森澤啓子, Sylvia Lai, 山口輝, 藤田浩志, 津田雅之, 小野正文, 坂本修士
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの肝臓において発現増加する二本鎖RNA結合タンパク質NF90の機能解析
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修士, 山口輝, 樋口琢磨, 森澤啓子, Sylvia Lai, 戸高寛, 池恩燮, 藤田浩志, 杉山康憲, 津田雅之
2. 発表標題 筋分化過程の筋芽細胞における二本鎖RNA結合タンパク質の関与
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修士, 山口輝, 森澤啓子, 樋口琢磨, 戸高寛, Sylvia Lai, 池恩燮, 藤田浩志, 杉山康憲, 松川和嗣, 津田雅之
2. 発表標題 骨格筋の細胞融合及び成熟化におけるRNA結合タンパク質の役割の解明
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修士, 山口輝, 樋口琢磨, 森澤啓子, 戸高寛, Sylvia Lai, 池恩燮, 藤田浩志, 杉山康憲, 松川和嗣, 津田雅之
2. 発表標題 骨格筋の分化・成熟化における細胞融合促進因子の新たな発現制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肝がん細胞の増殖に關与する新たなRBP / miRNAパスウェイの解明
2. 発表標題 Sylvia Lai, 樋口琢磨, 森澤啓子, 片岡佐誉, 藤田浩志, 山口輝, 坂本修士
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高知大学 総合研究センター 生命・機能物質部門 生体機能解析分野 分子生物学教室 ホームページ <a href="http://www.kochi-ms.ac.jp/~ct_mrc/academic/index.html">http://www.kochi-ms.ac.jp/~ct_mrc/academic/index.html</a>
--

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
研究協力者	坂本 修士  (Sakamoto Shuji)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授  (16401)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	津田 雅之  (Tsuda Masayuki)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授    (16401)	

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