

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19640

研究課題名(和文)炎症性非コードRNAが司るミトコンドリア機能と脂肪性肝疾患の分子相関性の解明

研究課題名(英文)Unraveling of the molecular correlation between mitochondrial function modulated by inflammatory non-coding RNA and fatty liver diseases

研究代表者

金 湘殷 (KIM, SANGEUN)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・特任研究員

研究者番号：10864762

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)：本研究は脂肪性肝疾患における microRNA-142 (miR-142) の関連性、特に肝臓の脂肪代謝及びミトコンドリア形態変化への影響を探索した。はじめに細胞外フラックスアナライザーを用いて肝臓細胞のエネルギー代謝の分析を実施した。その結果、miR-142 は脂肪酸酸化(酸化)に関与していることが明らかになった。更に、集束イオンビーム走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を用いて、肝細胞内ミトコンドリアの連続断面観察及び3次元構造解析を実施した。その結果、miR-142 はミトコンドリア形態を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪性肝疾患(非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎を含む)は遺伝的素因に加えて生活習慣などのエピジェネティック制御が組み合わさって発症すると考えられているが、未だ分子メカニズムは解明されていない。また、患者数も増加していることから新たな治療薬及び検査マーカーの創出が急務である。本研究により、脂肪性肝疾患における脂肪蓄積のメカニズムに miR-142 が関与していることが明らかとなった。本研究成果は、新たな治療法及び検査マーカーの開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver disease is caused by excessive fat accumulation in the liver. In this study, we have explored the role of microRNA-142 (miR-142) during lipid metabolism in the murine hepatic steatosis model. To identify whether miR-142 is associated with lipid accumulation in the liver, we analyzed cellular metabolic function systemically using an extracellular flux analyzer (XFe96 Analyzer, Agilent). As compared to the wild-type (WT) mice, hepatocyte-specific miR-142 conditional knock-out (Alb-miR-142 cKO) mice have shown that exogenous fatty acid utilization was increasing in primary hepatocytes. It is indicated that miR-142 modulates fatty acid oxidation (FAO) in the liver. Finally, we have determined alteration of mitochondria morphology in three-dimensional (3D) using focused ion beam scanning electron microscope (FIB-SEM) in mouse liver tissue. As a result, we figured out that miR-142 affected mitochondrial morphological regulation.

研究分野：健康科学およびその関連分野

キーワード：microRNA NAFLD NASH Fatty liver Mitochondria

1. 研究開始当初の背景

脂肪性肝疾患は、主に肝細胞に中性脂肪が沈着して肝障害をきたす疾患の総称である。現在、NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) 及び NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) 患者は増加している。そのため、新たな治療薬及び検査マーカーの創出が急務である。近年、炎症関連 miRNA として miR-142 を同定し、更に miR-142 は黄色ブドウ球菌感染創治癒に必須であることを解明した。一方、miR-142 は生命恒常性維持においても重要な機能を有していると考えられるが、未だ機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性非コード RNA である miR-142 が関与する脂肪性肝疾患の全容解明である。具体的には下記である。

- (1) 脂肪代謝経路に関与する miR-142 の機能解明。
- (2) 脂肪適蓄積及びミトコンドリア形態変化の関連性における miR-142 の機能解明

3. 研究の方法

(1) 脂肪性肝疾患モデルマウスの作製

Cre-loxP システムを用いて肝細胞特異的 コンディショナル・ノックアウト (Alb-miR-142 cKO) マウスを作製した。その後、生後 8 週齢のマウスに通常食餌 (Charlies River Formula (CRF) -1) 並びに高脂肪食 (High-fat diet, HFD) を 12~24 週間与え、脂肪肝及び脂肪蓄積を病理学的に検証した。

(2) 肝臓由来の細胞内ミトコンドリア代謝における miR-142 の機能評価

生細胞内ミトコンドリア代謝機能を調べるために、初代肝細胞の培養系を確立した。細胞外フラックスアナライザー (Agilent 社) を用いて生細胞のエネルギー代謝経路の酸素消費速度 (OCR) 及び細胞外酸性化速度 (ECAR) 解析を行った。初代肝細胞を用いてミトコンドリアの機能評価 (XF ミトストレスキット、Agilent) 及び脂肪酸酸化 (Fatty acid oxidation, FAO) 評価 (XF パルミチン酸塩酸化ストレスキット、Agilent) を実施した。基礎呼吸 (Basal respiration) は、OCR 測定値から算出した。ATP 結合 (Coupled respiration)、最大 (Maximal respiration)、ATP 非結合 (Uncoupled respiration) 呼吸は、オリゴマイシン、FCCP、およびロテノン/アンチマイシンの注入とそれに続く OCR 測定値から算出した。生細胞における FAO 活性を分析するために、単離された初代肝細胞を基質限定増殖培地 (0.5 mM のグルコース、0.5 mM の L-カルニチンを含む XF DMEM) 中で 18 時間培養した。培地は、FAO アッセイ開始の 1 時間前にアッセイ培地 (2.0 mM のグルコースおよび 0.5 mM L-カルニチンを含む XF DMEM 培地) に交換した。パルミチン酸 (Palmitate-BSA) およびエトモキシルには、それぞれ長鎖脂肪酸 (Long chain fatty acids, LCFA) 基質および FAO 阻害剤として用いた。

(3) miR-142 による肝臓由来ミトコンドリアの形態変化探索

電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy, TEM) を用いて Alb-miR-142 cKO マウス肝臓由来ミトコンドリアが形態異常を確認した。更に、集束イオンビームを用いた走査型電子顕微鏡 (Focused ion beam-scanning electron microscopy, FIB-SEM) での連続断面観察法を行い、HFD を 4 週間与えた wild type (WT) 及び Alb-miR-142 cKO マウスの肝臓由来ミトコンドリアを 3 次元構築した。

4. 研究成果

(1) 肝臓細胞特異的 cKO マウスを用いた脂肪肝疾患モデルを確立

脂肪肝疾患モデルを確立するために、Alb-miR-142 cKO マウスに CRF-1 または HFD を 12 週間給餌した。次に、Hematoxylin and eosin 染色された肝臓組織による脂肪症、免疫細胞浸潤および肝細胞のバルーンリングを病理学的に評価した。CRF-1 給餌群と比較して、HFD 給餌群は WT および Alb-miR-142 cKO マウスの両方で脂質蓄積を誘導した。

(2) miR-142 cKO による肝臓由来ミトコンドリアの機能評価

① miR-142 cKO によるミトコンドリア最大呼吸能の減少

miR-142 が肝臓のミトコンドリア機能とエネルギー代謝を調節するかを同定するために、初代

肝細胞における OCR および ECAR を測定した。XF 細胞ミトストレステストキットを用いた細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリア呼吸および解糖系の評価として OCR および ECAR をそれぞれリアルタイムで測定した (図 1)。その結果、Alb-miR-142 cKO 由来初代肝細胞では、ミトコンドリア基礎呼吸 (Basal)、ATP 結合呼吸 (Coupled)、非結合呼吸 (Uncoupled) が WT と比較して変化しなかったが、最大ミトコンドリア呼吸 (Maximal) は有意に減少していた。以上の結果より、正常な栄養状態における Alb-miR-142 cKO は、WT よりも急性ストレスまたは重い作業負荷に対する適応が低い可能性があることが示されている。

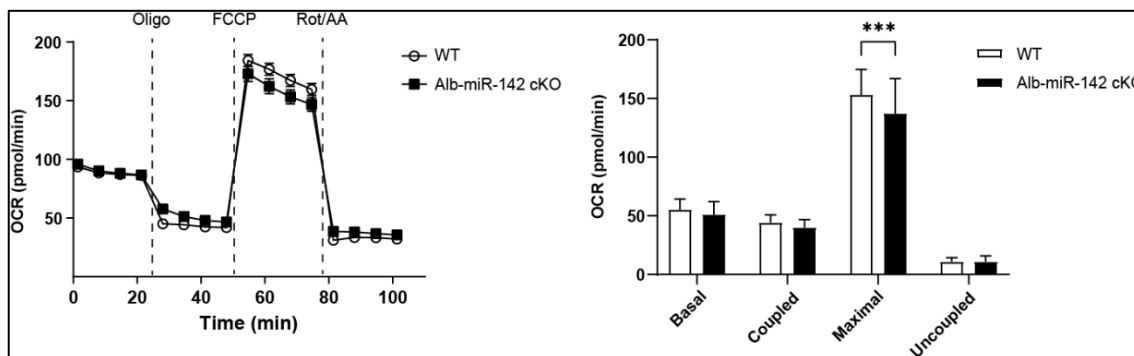


図 1. Mitochondria respiration in normal nutritional condition

② Alb-miR-142 cKO によるミトコンドリア脂肪酸酸化能の増強

ミトコンドリアにおける FAO は肝臓組織における脂肪の蓄積の重要な調節因子であるため、本研究では XF パルミチン酸酸化ストレスキットを用いて初代肝細胞における FAO を測定した (図 2)。パルミチン酸塩は外因性 LCFA としてミトコンドリア中に入り、カルニチンパリティルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) によって処理された後、FAO によって Acetyl-co A に分解されエネルギー代謝に利用される。そこで、CPT1 阻害剤 (エトモキシル) の存在下または非存在下のパルミチン酸との OCR を測定し、内因性脂肪酸による FAO を評価した。また、パルミチン酸の有無による OCR の測定値から外因性 LCFA による FAO を算出した。その結果 Alb-miR-142 cKO は、WT と比較して外因性 LCFA に応答して FAO 活性が増強した。本研究成果は、肝細胞における miR-142 の機能は、FAO 活性の増加を通じて脂質リッチ条件下での適応能力が増強されていることが示唆された。

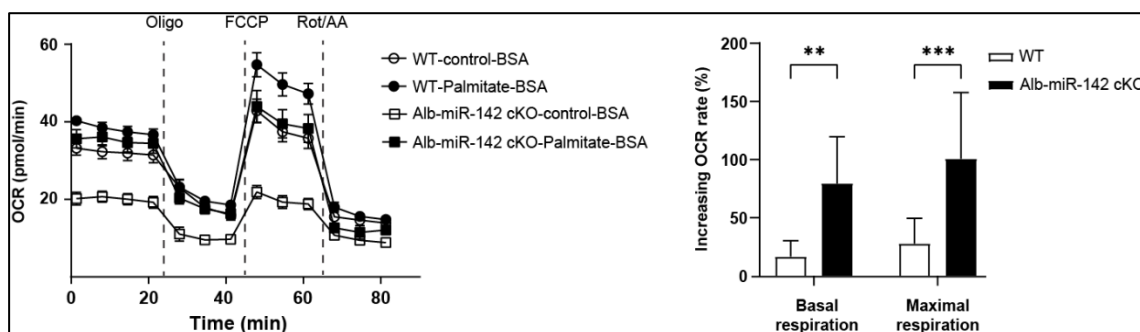


図 2. Mitochondria respiration by exogenous long chain fatty acids (LCFA)

(3) miR-142 は肝臓ミトコンドリア形態変化に関与する

ミトコンドリア機能障害は脂質代謝に影響し、更にミトコンドリアの形態変化はミトコンドリア機能に関与していると考えられているが、その分子メカニズムは明らかではない。そこで本研究では、肝臓組織でのミトコンドリア形態に及ぼす miR-142 の影響を調べるため、HFD を 4 週間与えたマウスから肝臓組織を単離し、FIB-SEM を用いて 3 次元構造におけるミトコンドリア形態の変化を評価した。その結果、miR-142 KO マウス肝臓由来ミトコンドリアの形態変化が明らかとなった (図 3)。以上の結果より、miR-142 はミトコンドリア機能及び脂質代謝に関与していることが示唆された。今後は、形態変化に伴う代謝への影響を調べたいと考えている。

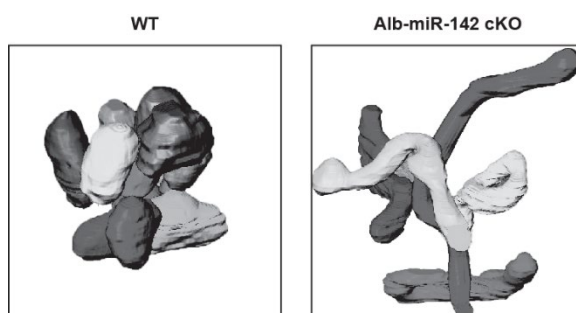


図 3. 3D Morphology of liver mitochondria

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim Sang-Eun, Mori Ryoichi, Shimokawa Isao	4. 巻 12
2. 論文標題 Does Calorie Restriction Modulate Inflammation via FoxO Transcription Factors?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1959 ~ 1959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12071959	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金 湘殷、森 亮一
2. 発表標題 空間的トランスクリプトーム解析を用いた皮膚創傷治癒過程の機能解析
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021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
---------	---------