

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05572・20K20479

研究課題名（和文）高カロリー食が惹起する脂肪肝傷害における非コードRNA新機能探索と先制医療の構築

研究課題名（英文）Function of non-coding RNA in the development of fatty liver injury induced by a high-calorie diet

研究代表者

森 亮一（MORI, Ryoichi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：30509310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：miR-142 は加齢に伴う脂質代謝に関与しており、その破綻は寿命に影響することが示唆されているが、その分子メカニズムは明らかでない。収束イオンビーム走査電子顕微鏡を用いて miR-142 KO マウス肝臓由来ミトコンドリアを解析した結果、形態異常を呈していることを発見した。さらに形態異常と相まって、miR-142 KO 肝臓由来ミトコンドリアは、酸化が上昇し（脂質代謝の亢進）、その結果 miR-142 KO マウスは加齢性脂肪肝発症が抑制されることを見いだした。miR-142 KO マウスの寿命短縮の原因は、肝臓における軽度慢性ミトコンドリア機能異常が一因であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア機能異常は様々な病態発症の原因となるため、長らく注目されている細胞内小器官である。本研究は、非コード RNA である miR-142 がミトコンドリア機能に関与し、さらに寿命に影響を与えていることを見いだした。また、生体における miRNA とミトコンドリア機能との関係、さらにその機能破綻による生体へ影響を実験病理学的に示した。今後は、miR-142 を標的とした加齢性脂肪肝発症抑制に資する薬剤の開発を進捗させ、新規治療法開発へと繋げたい。

研究成果の概要（英文）：The microRNA miR-142 is involved in lipid metabolism and is associated with aging. The dysfunction of miR-142 has been suggested to affect lifespan, but the molecular mechanism is unknown. We examined mitochondria derived from miR-142 knockout (KO) mouse liver using a focused ion beam/scanning electron microscope. We found that the KO mice had morphological abnormalities. In addition to these morphological abnormalities, the miR-142 KO liver-derived mitochondria showed an increase in beta-oxidation (hyperactivation of lipid metabolism). As a result, the development of age-related fatty liver was suppressed in miR-142 KO mice. These findings suggest that the cause of the shortened lifespan in miR-142 KO mice is mild chronic mitochondrial dysfunction in the liver.

研究分野：実験病理学

キーワード：microRNA 老化 寿命 脂肪肝 ミトコンドリア 代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、皮膚創傷治癒研究を遂行し、炎症性 microRNA (miRNA) として miR-142 を同定した。そして miR-142 遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、好中球遊走における miR-142 機能を解明した。一方、miR-142 KO マウス表現系解析を行っている過程で miR-142 KO マウスは、加齢性及び高脂肪食餌による脂肪肝発症が抑制されることを発見した。そこで本研究では、種々の miR-142 組織特異的遺伝子改変マウスを作製し更なる分子メカニズム解明を追求するに至った。

一方、脂肪蓄積や線維化は様々な細胞群の相互作用によって進行する。故に、微小環境における個々の細胞 (シングルセル) の個性を、組織位置情報を含めて分子的に解明しなければ、真の分子機序及び治療法開発は困難である。本研究では、老化研究に資するシングルセル解析法を独自に確立し、加齢性脂肪肝発症メカニズムとの関連性解明も目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞並びにクッパー細胞における miR-142 の機能解明である。そして、miR-142 を標的とした脂肪肝発症抑制効果を有する創薬の開発に繋げることである。具体的には下記である。

- (1) 肝細胞特異的 miR-142 KO マウスを用いた脂肪肝発症メカニズムの解明
- (2) ミエロイド系細胞特異的 miR-142 KO マウスを用いた脂肪肝発症メカニズムの解明
- (3) ミトコンドリアにおける脂質代謝の分子メカニズム解明
- (4) 老化研究に資するシングルセル解析並びにマルチオミクス解析プラットフォームの構築

3. 研究の方法

- (1) 組織特異的 miR-142 欠損マウスの作製

① ゲノム編集技術を用いて miR-142 flox マウスを作製した。
② Alb-Cre マウスと miR-142 flox マウスを交配し、肝細胞特異的 miR-142 KO マウスを作製した。
③ LyzM-Cre マウスと miR-142 flox マウスを交配し、ミエロイド系細胞特異的 miR-142 KO マウスを作製した。

- (2) 脂肪肝モデルマウスの作製

生後 8 週齢マウスに高脂肪餌 (HFD) を 12~24 週間食餌させた。その後、HE 染色にて脂肪肝発症を観察した。

- (3) ヒト由来肝臓検体の収集

病理解剖にて脂肪肝及び非アルコール性脂肪性肝炎と診断された肝臓を収集した。その後、HE 染色を実施し、病態像を観察した。一部サンプルは凍結保存し、分子生物学的解析に用いる予定である。

- (4) イメージング解析

① 肝臓をコラゲナーゼ等の酵素を用いてシングルセル化し、初代培養肝細胞を作製した。
② 共焦点顕微鏡などを用いて生細胞ライブイメージング法を主体として解析を行った。

- (5) ミトコンドリアの機能解析

① フラックスアナライザー (Agilent 社) を用いてミトコンドリアの生化学的解析を行った。
② FIB (Focused Ion Beam: 集束イオンビーム) /SEM (Scanning Electron Microscope: 走査型電子顕微鏡) を用いたミトコンドリア形態のイメージング解析を行った。

- (6) 老化モデルマウス

B6J Aged マウス (日本チャールス・リバー) を用いた。

- (7) シングルセル解析

① 肝臓をコラゲナーゼ等の酵素を用いてシングルセル化を実施した。
② Chromium controller (10x Genomics 社) を用いてシングルセルレベルにおける次世代シーケンス (NGS) 用ライブラリーの作製を行い、NGS 解析を行った。
③ アプリケーションを用いて情報解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 肝細胞特異的 miR-142 KO マウスは脂肪肝発症が抑制される。

脂肪肝発症には、肝細胞並びにミエロイド系細胞由来であるクッパー細胞が関与していると考えられている。はじめに、肝細胞並びにミエロイド系細胞特異的 miR-142 KO マウスを用い

て、HFD 食餌における脂肪肝発症の病理学的解析を行った。その結果、肝細胞特異的 miR-142 KO マウスは、野生型 (WT) マウスと比較して、顕著に脂肪肝発症が遅延していた。一方、ミエロイド系細胞特異的 miR-142 KO マウスは変化を認めなかった。

以上の結果より、肝臓における miR-142 は脂肪肝発症に関与していることが示唆された。今後はヒトサンプルを用いて miR-142 発現解析を実施する予定である。ヒトの脂肪肝発症においても miR-142 の関連性が認められた場合、さらに詳細に解析し治療法の開発を目指すことを考えている。

(2) miR-142 はミトコンドリア形態変化を制御する。

脂質代謝は脂肪肝発症に密接に関与している。またミトコンドリアは脂質代謝に重要な細胞小器官として知られている。そこで肝細胞特異的 miR-142 KO マウス由来初代培養肝細胞を用いて、ミトコンドリアのイメージング解析を行った。その結果、肝細胞特異的 miR-142 KO マウス由来初代培養肝細胞において、ミトコンドリアの形態変化を認めた。

ミトコンドリアの形態変化を詳細に解析するためには電子顕微鏡解析が必須である。そこで FIB/SEM 解析を行った。その結果、肝細胞特異的 miR-142 KO マウスにおける肝臓由来ミトコンドリアの形態は、不規則な長方形様を呈していた。一方、WT マウス由来ミトコンドリアの形態は、一様な円形構造を呈していた。

以上の結果より、miR-142 はミトコンドリアの形態制御に関与することが示唆された。

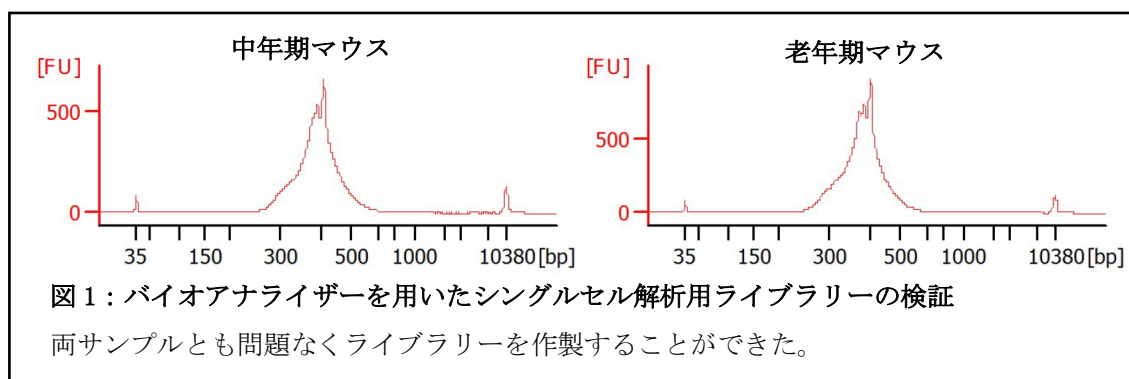
(3) miR-142 はミトコンドリアを介した脂質代謝に関与する。

ミトコンドリアは形態を変化させながら脂質代謝やエネルギー産生を行うと考えられているが、その関連性は不明点が多い。そこで本研究では、フラックスアナライザーを用いて肝細胞内ミトコンドリア代謝機能を解析した。その結果、肝細胞特異的 miR-142 KO マウス由来初代培養肝細胞におけるミトコンドリアは、WT マウスと比較して、脂質代謝が有意に亢進していた。今後は、脂質代謝と形態変化における miR-142 関連性の解明を行う予定である。

(4) シングルセル解析を用いた老化関連遺伝子の包括的同定。

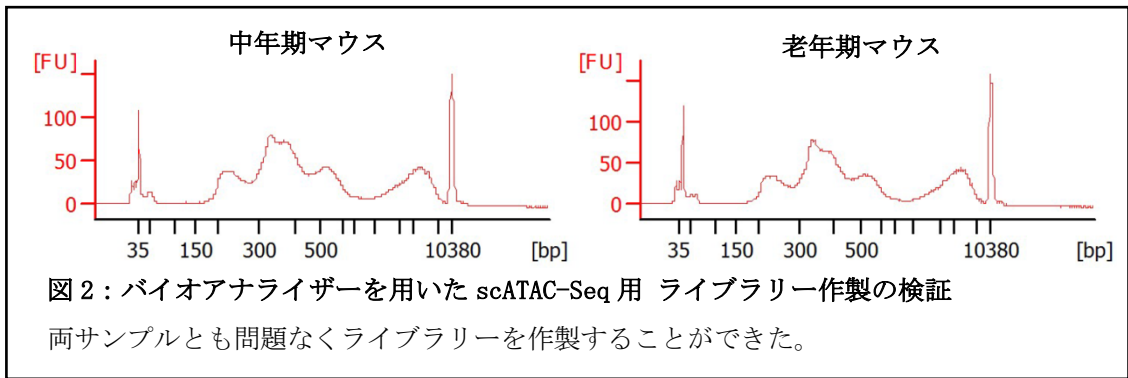
マウス老化過程は、若年期 (3~6 月齢)、中年期 (10~14 月齢)、老年期 (18 月齢以降) と考えられている。本研究成果により miR-142 は加齢性脂肪肝発症に関与していると考えられるが、加齢に伴った miR-142 標的遺伝子の発現変化の関連性は明らかでない。

はじめに、中年期及び老年期由来肝臓を用いたシングルセル解析法の確立に着手した。その結果、シングルセル解析用の NGS ライブラリー作製並びにデータ収集など、基本的なシングルセル解析に必要な実験手技並びにデータ解析法を確立することができた (図 1)。現在、様々な研究グループ及び企業よりシングルセル解析用アプリケーションが開発・公開されている。今後は、各種アプリケーションの特徴を活用して解析を進捗させる。



(5) マルチオミクス解析法の開発

一般的なシングルセル解析によって得られる情報は、遺伝子発現もしくは転写活性領域 (scATAC-Seq) のみである。現在は、シングルセルレベルにおいて遺伝子発現並びに転写活性領域情報を同時に取得することが重要であると考えられているが (マルチオミクス解析)、未だ個体臓器を用いた解析の報告はごくわずかである。そこで本研究では、老化研究に資するマルチオミクス解析の開発に着手した。その結果、①scATAC-Seq 用ライブラリー作製に成功した (図 2)、②シングルセルレベルにおいて遺伝子発現並びに転写活性領域情報を同時に取得することができた。しかしながら一般的なシングルセル解析と比較して、特に遺伝子発現に関する情報量の取得が減少していた。今後は、サンプル調製の改善並びに統合解析法を含めた情報解析の改良を行い、安定したマルチオミクス解析法の確立並びに他分野への応用を試みたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Park Seongjoon, Komatsu Toshimitsu, Hayashi Hiroko, Mori Ryoichi, Shimokawa Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 The Role of Neuropeptide Y in Adipocyte-Macrophage Crosstalk during High Fat Diet-Induced Adipose Inflammation and Liver Steatosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9111739	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 Inamasu Eiko, Tsuchiya Tomoshi, Yamauchi Motohiro, Nishi Kodai, Matsuda Katsuya, Sugawara Fumio, Sakaguchi Kengo, Mori Ryoichi, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Hatachi Go, Doi Ryoichiro, Watanabe Hironosuke, Tomoshige Koichi, Matsuda Naoki, Higami Yoshikazu, Shimokawa Isao, Nakashima Masahiro, Nagayasu Takeshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Anticancer agent -sulfoquinovosyl-acylpropanediol enhances the radiosensitivity of human malignant mesothelioma in nude mouse models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 19 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab090	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 Ishii Mitsutoshi, Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Morofuji Yoichi, Fujimoto Takashi, Muto Hideki, Suematsu Takashi, Mori Ryoichi, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Tomoshige Koichi, Watanabe Hironosuke, Iwatake Mayumi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased In Vitro Intercellular Barrier Function of Lung Epithelial Cells Using Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081264	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 Sumiyoshi Remi, Koga Tomohiro, Furukawa Kaori, Umeda Masataka, Yamamoto Kazuko, Mori Ryoichi, Kawakami Atsushi	4. 巻 233
2. 論文標題 A case of tocilizumab-refractory idiopathic multicentric Castleman's disease successfully treated with sirolimus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108887 ~ 108887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2021.108887	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 Kim Sang-Eun, Mori Ryoichi, Shimokawa Isao	4. 巻 12
2. 論文標題 Does Calorie Restriction Modulate Inflammaging 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 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 Wang Z, Komatsu T, Ohata Y, Watanabe Y, Yuan Y, Yoshii Y, Park S, Mori R, Satou M, Kondo Y, Shimokawa I, Chiba T	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of rikkunshito supplementation on mice: analysis of oxidative stress resistance and lifespan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geriatrics and Gerontology International	6. 最初と最後の頁 238-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13848	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 森亮一, 下川功	4. 巻 272
2. 論文標題 老化の分子シグナル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 619-624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森 亮一
2. 発表標題 miR-142欠損マウスの肝臓における代謝及びミトコンドリア形態変化の機能解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 亮一
2. 発表標題 皮膚創傷治癒における miRNA 機能と核酸医薬への応用
3. 学会等名 第50回 日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森亮一, 朴盛浚, 林洋子, 下川功
2. 発表標題 寿命及び代謝制御における炎症関連 miR-142 ファミリーの機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori R
2. 発表標題 Attenuation of age-related fatty liver pathogenesis in miR-142-deficient mice
3. 学会等名 Gordon Research Conferences-Tissue Repair & Regeneration (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森亮一, 小松利光, 朴盛浚, 林洋子, 下川功
2. 発表標題 組織特異的 miR-142 ノックアウトマウスを用いた生命恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	金 湘殷 (KIM Sang Eun)		
研究協力者	佐藤 保則 (SATO Yasunori)		
研究協力者	水野 聖哉 (MIZUNO Seiya)		
研究協力者	奥崎 大介 (OKUZAKI Daisuke)		
研究協力者	瀬尾 茂人 (SENO Shigeto)		

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