

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23651052

研究課題名（和文） マイクロ RNA を介する毒性発現メカニズムを解明する手法の開発と実証に関する研究

研究課題名（英文） Development of a method for the mechanistic investigation of toxicological endpoints modulated by microRNAs

研究代表者

吉岡 亘 (YOSHIOKA WATARU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80425496

研究成果の概要（和文）：マイクロ RNA は幅広い生命現象を司る内在性調節因子であり、有害化学物質の引き起こす毒性現象についても毒性現象に伴うマイクロ RNA 量の変動が発見されている。本研究はオリゴヌクレオチドをマウスに投与することで機能を特異的に亢進する手法を開発することを目的とした。ダイオキシン曝露で減少するマイクロ RNA をマウスに投与することで、肝臓中で機能している miR-101a と miR-122 が増加した。毒性現象に与える影響に関しては各マイクロ RNA の特異的な効果が明瞭には現れず、さらなる検討を要する結果となった。

研究成果の概要（英文）：MicroRNA (miRNA) is a class of small RNA that functions as a negative regulator of gene expression. Human and mouse genomes encode over 1,400 and 700 miRNAs, respectively. Most of the cellular pathways are considered to be modulated by miRNAs, and some miRNAs have been implicated to be involved in the onset of toxic effects of chemicals. In the present study, we developed a method to increase the function of targeted miRNAs; administration of miRNAs could increase the abundance of their functional form.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：毒性学

科研費の分科・細目：環境学・放射線化学物質影響化学

キーワード：毒性発現メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的解析手法を用いた研究により、ゲノム領域の9割がRNAへ転写されており、その大半がタンパク質をコードしない

noncoding RNA と呼ばれる RNA 種であるという、驚くべき事実が明らかになった。さらに生物種間のゲノム比較からは、ゲノム全体に占める noncoding RNA の割合が高いほど、形態の複雑さや神経細胞の数といった「生物学

的複雑さ」が高いという事実も明らかになった。すなわち高等生物の複雑な機能の一翼を noncoding RNA が担っているとの新たな生物学的知見が示されたことになる。

主要な noncoding RNA の 1 種であるマイクロ RNA は、遺伝子発現を調節する働きをもつ。ヒトでは 1,400 種以上のマイクロ RNA が発見されており、あらゆる細胞内パスウェイがマイクロ RNA の調節を受けると推定されている。実際、コレステロール代謝やインスリン分泌などの代謝制御、様々なタイプの癌や心臓の線維化といった疾患など、マイクロ RNA が関与する生命現象の発見が相次いでいる。化学物質が引き起こす毒性の発現メカニズム解明のためにも、マイクロ RNA を介した影響の解明が不可欠となると考えられた。

本研究の代表者は、ダイオキシン曝露マウスで生じる肝障害をモデル実験系として、肝障害に関与するマイクロ RNA の探索を行ってきた。その結果、曝露マウス肝臓で肝障害に先立ってマイクロ RNA の発現量が変動することを見いだしていた。さらに、こうした量の変化するマイクロ RNA の標的遺伝子の機能とダイオキシン曝露による肝障害に関係があることを明らかにした。この次の段階として、マイクロ RNA 量変化が何を引き起こすのか明らかにすることが必要だと考えられた。しかし、20 塩基程度の小分子であるマイクロ RNA は機能阻害することが難しく、マイクロ RNA と個体での現象（毒性、生理反応、疾患）の因果関係の検証が進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

最近の研究によって、マイクロ RNA が、幅広い生命現象を司る非常に重要な調節因子であることが明らかにされてきている。有害化学物質の引き起こす毒性現象についても、

毒性現象に伴うマイクロ RNA 量の変動が発見されている。しかしながら、マイクロ RNA がどのように有害化学物質の毒性発現の制御に関わるのかは研究が進展しておらず、不明のままであった。その理由として、動物個体でのマイクロ RNA 機能解析の有用な方法が確立していないことが挙げられる。マイクロ RNA や蛋白質のようにゲノム上に遺伝子として存在する内在性の生体分子については、遺伝子欠損動物を作出することで標的とした生体分子の役割を解析する手法が存在する。この手法は、しかしながら、作成に多大な費用・時間が必要である。この問題を解決するために、オリゴヌクレオチドをマウスに投与することで機能を特異的に阻害または亢進できる手法を開発すれば、マイクロ RNA 研究の進展を著しく効率化できると考えられた。そこで、そのようなこの手法として、オリゴヌクレオチド投与によるマイクロ RNA 機能解析手法を開発することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

毒性発現メカニズムを *in vivo* で解明するためには、標的分子の機能の特異的阻害法あるいは亢進法が必須であり、そのような方法の中でも、投与することで実行可能な方法が特に有益であると考えられる。マイクロ RNA の機能阻害のためには、アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用した相補鎖結合に因る機能阻害が、マイクロ RNA の機能更新のためにはマイクロ RNA あるいはマイクロ RNA 前駆体の投与による標的マイクロ RNA の増加による機能更新が有効ではないかと考えられた。前者のアプローチの場合、投与したアンチセンスオリゴヌクレオチドが生体内で分解抵抗性を持つことが阻害効果発揮の為に重要

だと考えられたことから、修飾オリゴヌクレオチド利用が有効だと考えられた。これに比して、後者のアプローチでは、生体内で機能するマイクロ RNA 量を増加させるために、オリゴ RNA を用いるのが妥当だと考えられた。本研究では投与するオリゴヌクレオチドの入手の容易さから後者のアプローチを選択し、miR-101a および miR-122 を C57BL/6J 系統マウスに腹腔内投与した。2, 3, 7, 8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) 投与したマウス肝臓中で発現するマイクロ RNA は、PAP-RT-qPCR 方法で定量した。また、肝障害の程度の指標としては、血中 ALT レベルを用いた。また、TCDD 曝露による肝障害とマイクロ RNA 量の変化に伴って起こる分子レベルの変化を明らかにすることがマイクロ RNA の関与する曝露影響を解明する手がかりになると考えられたことから、TCDD 曝露による肝障害に関与することが示唆されていた炎症性サイトカインである IL-1 ファミリーについて RT-qPCR 方で定量した。

#### 4. 研究成果

50 µg/kg 体重の TCDD を腹腔内投与することで、投与 8 日目に有意に血中 ALT の増加、肝重量比の増加、肝臓中での miR-101a の減少が生じた。TCDD による肝障害に伴って起こる変化として、miR-101a の標的遺伝子である *ptgs2* の増加が起こった。また、炎症性サイトカインが増加する可能性がある受容体欠損マウスを用いた研究から指摘されていたことから、IL1a, IL1b, TNFa, TNFb の mRNA の定量を行い、TNFa は *ptgs2* に伴って早期に増加することが明らかになった。これらのことから、TCDD によって引き起こされる肝障害について、miR-101a/*ptgs2* の変化は、炎症性サイトカイン TNFa の作用で副次的に起こる

のではない可能性が高いと考えられた。マイクロ RNA 投与による肝臓中での発現量は miR-101a では見られたが miR-122 では大きな増加はなく、後者が肝臓中で非常に高い発現レベルにあることを反映している可能性が考えられた。ALT レベルに与える明確な影響はみられなかった。外来のマイクロ RNA によって臓器中の特定のマイクロ RNA の機能レベルを操作できる可能性を示すことができたという結果は得られたことから、より高い効率で変化を引き起こす条件を明らかにすることで、下流で起こる現象に与える影響を検証できるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yoshioka W, Peterson RE, Tohyama C. “Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes.” *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127:96-101, 2011. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Yoshioka W, Higashiyama W, Tohyama C. 「ダイオキシン曝露が引き起こすマイクロ RNA 調節の攪乱と肝障害」 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011 年 7 月 11 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 亘 (YOSHIOKA WATARU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80425496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし