

令和元年9月9日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09242

研究課題名(和文) 加齢, メタボリック症候群及び発癌におけるmiR-301aの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of miR-301a in aging, metabolic syndrome and carcinogenesis

研究代表者

藤田 浩二 (Fujita, Koji)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50749421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA-301aの前駆体を野生型のマウスに導入し、Transgenic mouse(Tg)を作成した。Tgは48週齢の時点で、同腹の陰性マウスに比べて、小腸におけるmicroRNA-301aの発現が有意に高かった。当該Tgは、加齢におけるmicroRNA-301aの機能解析のモデル動物となる可能性が示唆されたと考えられる。しかし予算の制約があり、これ以上の解析は困難と判断し、当該Tgによる検討は中止した。当該研究とは別に、研究分担者が、*in vitro*及び*in vivo*において、薬物による腫瘍の増殖抑制効果にmiR-301aが関連していることを検証し、成果を三題発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、加齢・メタボリック症候群・発がんに関連するmicroRNA-301aの遺伝子を導入したマウスを作成した。このマウスが48週齢に達したとき、遺伝子を導入していないマウスに比べて、小腸におけるmicroRNA-301aの発現が高いことが確認された。このマウスが加齢におけるmicroRNA-301aの機能を解析する上でモデル動物となる可能性が示されたと考えられる。しかし予算の制約があり、これ以上の解析は困難と判断し、遺伝子組み換えマウスを用いた研究を終了した。本研究計画と並行して、市販されているがん細胞株及びマウスでの研究を進め、成果を三題の論文として発表済みである。

研究成果の概要(英文)：We constructed a transgenic mouse by introducing a precursor of microRNA-301a into a wild type mouse. MicroRNA expression analysis in three pair of 48-week old mice revealed that transgene positive mice strongly expressed miR-301a with statistical significance in their small intestines than transgene negative mice. The transgenic mouse presented potential to be a model in functional analysis of miR-301a in aging. However, further investigation using the transgenic mouse was halted because of shortness of research funding. In addition to the current study, we worked for *in vitro* and *in vivo* studies to prove whether suppression of tumor growths was correlated to miR-301a expression. As a result, we published three papers on journals.

研究分野：肝臓内科

キーワード：microRNA Transgenic mouse

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢と悪性腫瘍は、ゲノム DNA の異常及び遺伝情報の転写翻訳の過程(epigenetics)の異常を介して密接に関連していることが指摘されている。また、人口の高齢化に加えて、悪性腫瘍のリスク因子であるところのメタボリック症候群も増加している。加齢、メタボリック症候群と両者を背景とする発癌メカニズムの解明が現在の課題となっている。

申請者らはこれまでに遺伝情報の転写翻訳の過程(epigenetics)に焦点を当てて、種々の消化器疾患の病態を解明してきた。特に肝細胞癌、メタボリック症候群の一部である脂肪肝と脂肪性肝炎、そして肝臓の加齢について、microRNA(miRNA)の網羅的解析に重点をおいて、病態進展及び治療効果に關する miRNA を同定し報告してきた。miRNA は蛋白質には翻訳されない RNA の 1 種であり、ヒトでは数千種類の miRNA が既に同定されている。miRNA はその生理機能として、細胞の分化、増殖、アポトーシスに關与している。また miRNA の発現異常が種々の消化器疾患の原因の一つである。

申請者らは 2014 年に、ラット肝臓の加齢と相関する miRNA として miR-301a を同定している。また予備的実験にて、マウスの非アルコール性脂肪性肝炎の発症と miR-301a との相関を示すデータを得た。さらに、外科的に切除されたヒトの消化管間葉系腫瘍(GIST)の腫瘍組織において、miR-301a が正常組織に比べて 10 倍以上もの過剰発現をしていることを示すデータも得ている。

1) Mimura S, et al. Int J Mol Med. 2014;34(4):1065-72.

2. 研究の目的

申請者らは、上述の基礎的データにより、miR-301a が加齢・メタボリック症候群及び悪性腫瘍の病態進展に關与しているものと考え、その病理学的な機構を動物モデルで解明することを計画した。

3. 研究の方法

申請者らは当初、miR-301a の前駆体をコンベンショナルノックアウトしたマウスを作出することを予定した。しかし 2015 年 3 月、海外の研究者が、miR-301a をコンベンショナルにノックアウトしたマウスを作出し、そのマウスを用いた研究論文を発表した¹⁾。この時点で、新規性の観点から、miR-301a 前駆体のコンベンショナルノックアウトマウスを新たに作出する意義は無くなったものと判断した。

そこで申請者らは、従来の研究計画を修正した。すなわち、miR-301a の前駆体を遺伝子導入したマウス(トランスジェニックマウス)を作出し、ノックアウトとは正反対の手法で miR-301a の機能解析に供するモデルマウスの作出を意図した。miR-301a のトランスジェニックマウスの作出をユニテック株式会社に委託した。マウスの系統には C57BL6/J を用いた。導入する遺伝子には、promotor として EF1-alpha を用いた。miR-301a 前駆体を ES 細胞に遺伝子導入し、当該 ES 細胞から生育した Tg を F0、その産仔を F1、F1 の産仔を F2 とした。2018 年 1 月に F2 マウスが本学動物実験施設に納品された。納品されたマウスを SPF 区域にて野生型マウスと交配、継代した。Genotyping により、同腹の遺伝子陽性マウスと陰性マウスを同定した。

各臓器における miR-301a の発現を real-time qPCR で解析した。microRNA 解析用の total RNA の抽出においては、Qiazol と miRNeasy mini Kit を用いた。miR-301a を定量する際の内因性コントロールとして、snRNA-202 及び snoRNA-135 を用いた。miR-301a 及び内因性コントロールの定量には、Taqman probe を用いた。

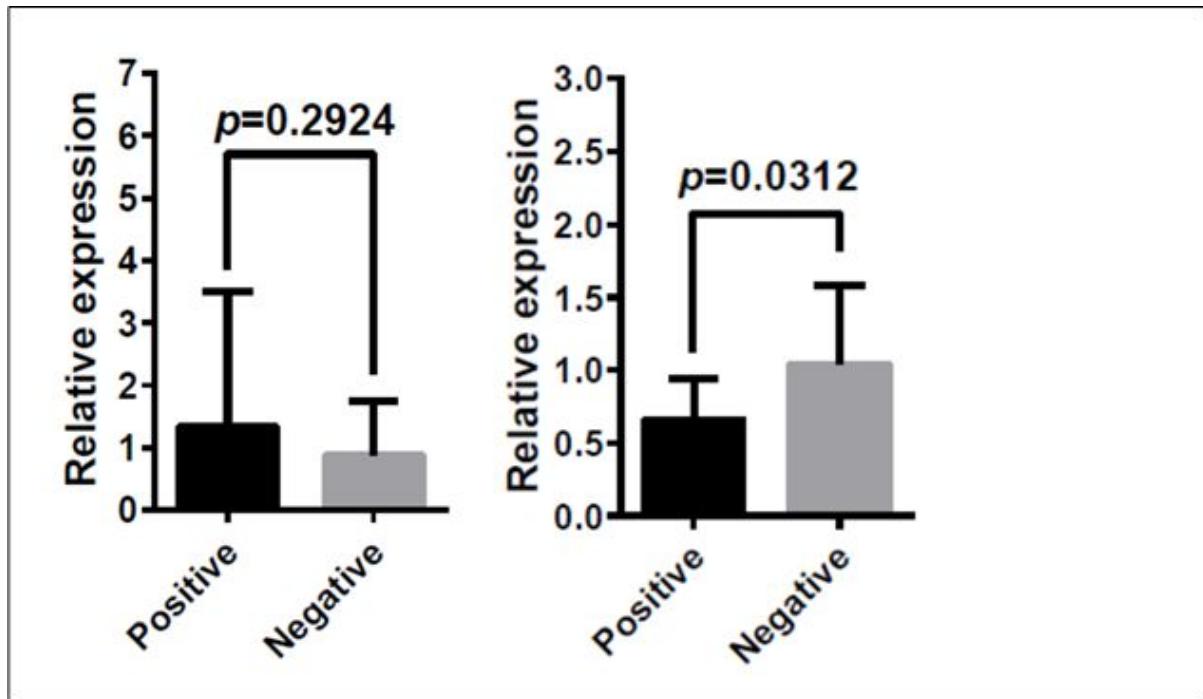
miR-301a の標的遺伝子の発現を解析することを目的として、messenger RNA の発現解析も行った。Messenger RNA を定量する際は、Qiazol と RNeasy mini Kit を用いて total RNA を抽出した。内因性コントロールとして、Beta-actin と GAPDH を用いた。miR-301a の標的遺伝子である NKRF、MDM3、PTEN、RUNX3、ESR1 及び内因性コントロールの定量には、Taqman probe を用いた。

1) Ma X, et al. Cell Discov 2015;1:15005

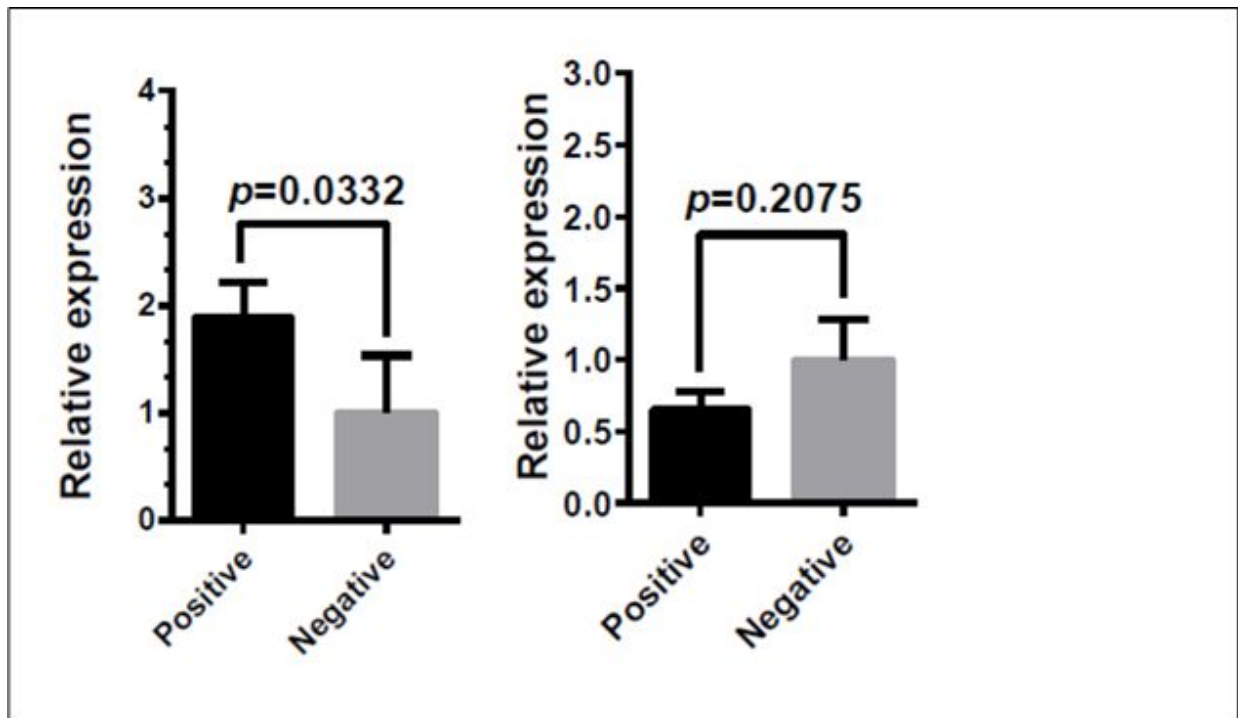
4. 研究成果

8 週齢に達した F3 マウス及び F4 マウスを用いて、組み換え遺伝子陽性マウスとその同腹の陰性マウスを比較する形で、miR-301a の発現を解析した。10 ペアのマウスで胃の miR-301a の発現を解析し、陽性マウスで発現の高い傾向はあったが、有意な差ではなかった(p=0.2924, 下図・左)。同様に 7 ペアのマウスを用いて、肝臓における miR-301a の発現を解析したが、陽性マウス・陰性マウスの間に発現の有意な差は無かった(p=0.5052)。小腸においては、5 ペアのマウスで発現解析し、やはり有意な差は無かった(p=0.3272)。

miR-301a の標的遺伝子の発現解析においては、胃における NKRF の発現が、陽性マウスにおいて陰性マウスに比べて有意に抑制されていた(p=0.0312, 下図・右)。しかし、胃における miR-301a の発現に差が無いので、例え標的遺伝子の発現が抑制されていても、モデル動物としては実用に耐えない水準と判断した。



若年マウスでの発現解析を見る限りでは、モデル動物として機能していないと判断し、高齢マウスでの発現解析に方針を切り替えた。48週齢に達したF3マウスのうち、陽性マウス3匹とその同腹の陰性マウス3匹について、11種類の臓器(肝臓, 胃, 脾, 膵, 腎, 小腸, 心臓, 肺, 脳, 顎下腺, 骨格筋)におけるmiR-301aの発現解析をおこなった。その結果、陽性マウスの小腸において、陰性マウスに比べて、miR-301aの発現が有意に高かった(p=0.0332, 下図・左)。しかし小腸以外の臓器では、miR-301aの発現に有意な差は無かった。また、小腸におけるmiR-301aの標的遺伝子の発現解析を行ったが、5種類の標的遺伝子のいずれにおいても、陽性マウスと陰性マウスの間に有意な発現の差は無かった(p=0.2075, 下図・右)。



2018年3月、以上の結果を検討した後、1) 予算の制約があり研究のこれ以上の継続が困難であること、2) 海外の研究者が作出したmiR-301aノックアウトマウスと同等以上のマウスモデルを確立できる可能性が乏しいこと、の2点を考慮した結果、本研究を中止することとした。

なお、本研究計画と並行して、市販されているがん細胞株及びマウスでの研究を進め、miR-301aに関する成果を三題の論文として発表済みである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. The angiotensin II type 1 receptor antagonist telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of esophageal adenocarcinoma via the AMPK /mTOR pathway in vitro and in vivo. Fujihara S, Morishita A, Masaki T, et al. Oncotarget. 2017 Jan 31;8(5):8536-8549.
2. MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. Okura R, Fujihara S, Masaki T, et al. Oncol Lett. 2018 Jan;15(1):407-414.
3. Angiotensin receptor blocker telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of cholangiocarcinoma through cell cycle arrest. Samukawa E, Fujihara S, Masaki T, et al. Int J Oncol. 2017 Dec;51(6):1674-1684.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 該当なし。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：正木 勉

ローマ字氏名：Masaki Tsutomu

所属研究機関名：香川大学医学部

部局名：消化器神経内科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30335848

研究分担者氏名：森下 朝洋

ローマ字氏名：Morishita Asahiro

所属研究機関名：香川大学医学部

部局名：消化器神経内科

職名：講師

研究者番号(8桁)：60423430

(2)研究協力者 該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。