

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25年3月9日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650484

研究課題名（和文）分泌型 microRNA を中心とした遠隔臓器間協調的代謝機構の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of circulating-microRNA in metabolic state of between distant organs

研究代表者

森 亮一 (MORI RYOICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：30509310

研究成果の概要（和文）：血液中には、分泌型 microRNAs (circulating miRNA: c-miRNAs) が Argonaute2 (Ago2) と複合体を形成して存在している。本研究では、血液中に存在する老化・代謝関連 Ago2 結合型 c-miRNA の網羅的同定及び機能解析を行った。カロリー制限及び肥満マウスを用いた解析により、種々の c-miRNA は、栄養状態によって変化していることが明らかとなった。本研究により、同定された c-miRNA は、遠隔臓器間代謝機構に関与していると考えられ、更には、生活習慣病等の新規バイオマーカーの探索及び治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Blood contains large numbers of circulating miRNAs (c-miRNAs). However, it is not clear whether obesity- or calorie restriction alter the expression levels of c-miRNAs compared with wild-type mice. To elucidate the physiological significance of c-miRNAs, the expression levels of several c-miRNAs were observed to change, suggesting that these c-miRNAs are involved in aging and metabolic disorders. Thus, identification of c-miRNAs in the blood could be useful for diagnosis and for the identification of therapeutic targets in lifestyle disease patients.

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 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：カロリー制限、分泌型 microRNA、次世代シーケンシング、老化、代謝、肥満、全反射蛍光顕微鏡、生細胞ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

個体における代謝機構は、栄養状態及び加齢に応じて、エネルギー代謝に関わる個々の臓器が協調的に対応し、個体の恒常性を維持している。よって臓器間の代謝ネットワークの破綻は、個体レベルでのエネルギー代謝システムの崩壊をきたし、その結果、生活習慣病・老年病・がんの発症及びリスク上昇を導くと考えられる。逆にカロリー制限のように、個体としてのエネル

ギー消費のバランスが保たれた状態では、細胞、臓器にかかるストレスが軽減されて、結果的に病態発症予防・長寿効果に繋がることが知られているが、その分子基盤は明らかではない (Mori R et al, *Diabetes Frontier*, 2010)。

miRNA は、細胞核内において既存遺伝子と同様に転写され、核外に移行する。その後、細胞質内で様々な修飾を受けて最終的に Argonaute2 (Ago2) 蛋白質と複合体を形成し

て標的 mRNA に作用し、翻訳阻害を導いて蛋白質発現制御に関与する。近年、血液中において分泌型 miRNA (circulating miRNA: c-miRNAs) の存在が認められ、新たな miRNA の機能及び新規バイオマーカーとしての有用性が考えられるようになった (Gilad S et al, *PLoS One*, 2008)。つまり c-miRNA は、脂肪蓄積やエネルギー代謝機構にも重要な役割を担うと推察されるが、生物学的意義は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、血液及び血漿中に存在する既知及び未知の Ago2 結合型 c-miRNA を介して制御される、遠隔臓器間代謝ネットワークの全容解明を目指す。そして、食生活の乱れによって生じる生活習慣病や加齢が原因で惹起される、臓器間代謝ネットワーク制御機構の破綻に起因する疾患の解明、新規検査法及び治療法を確立することを目的とする。具体的には以下である。

(1) c-miRNA による代謝ネットワーク動作原理の解明

(2) c-miRNA を指標とした新規バイオマーカーの探索

c-miRNA は、ホルモン等の生理活性物質と同様の機能を発揮していると推測されているが、未だ生理及び分子機序は明らかではない。本研究成果によって、c-miRNA の機能を解明し、ホルモン等の生理活性物質に続く新規生理活性物質と位置づけることにより、新たな学術的展開を目指す。

3. 研究の方法

(1) モデル実験動物の作成

In vivo における c-miRNA 機能解析を行うため、高脂肪餌 (HFD) を食餌させた肥満マウス及びカロリー制限 (CR) モデルマウスを作成した。HFD マウス作成に関しては、生後 8 週齢の自由摂食群 (AL) マウスに高脂肪餌を、生後 6 ヶ月に至るまで食餌させた。CR マウスについては、生後 8 週齢の AL マウスに、AL マウスと比べて 70% 食餌量を、生後 6 ヶ月に至るまで食餌させた。

(2) 血液中 Ago2 結合型 c-miRNA の精製

上記モデルマウスより、血液を採取した。血液採取は、絶食無し及び絶食後 16 時間後に行った。その後、EDTA 処理を行い血漿を抽出した。抗 Ago2 抗体 (Wako) を用いて、血漿中に存在する Ago2 結合型 c-miRNA を免疫沈降法によって精製した。

(3) miRNA ライブラリーの作成

免疫沈降法によって精製した c-miRNA サンプルを用いて、small RNA Cloning Kit

(TaKaRa) による miRNA クローニングを行い、次世代シーケンシング用サンプルである miRNA ライブラリーを作製した (図 1)。ライブラリー作製効率については、TA cloning、塩基配列決定、電気泳動を行い、ライブラリー作成が問題なく行われていることを確認した。

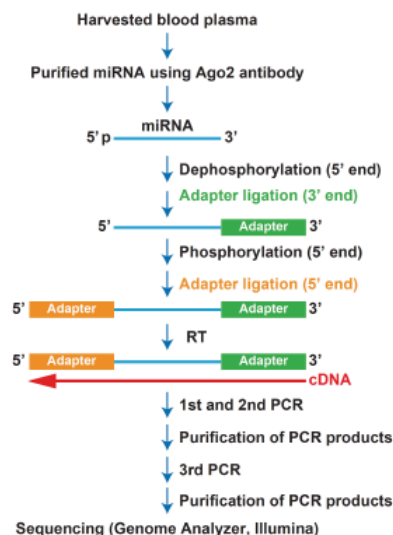


図 1 Ago2 結合型 c-miRNA ライブラリー作成の概要

(4) 次世代シーケンシングを用いた既知 miRNA 及び未知 miRNA 候補群の網羅的同定
次世代シーケンシング (Illumina) を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。その後、配列のフィルタリング、ゲノムへのマッピング、アノテーション作業、配列のグルーピング、二次構造予測を行った。

(5) 全反射蛍光顕微鏡を用いた Ago2 結合型 c-miRNA 分泌機構の解明

クローニングした全長マウス Ago2 を Vivid Colors pcDNA6.2/N-EmGFP-GW/TOPO (Invitrogen) へ組み込み、緑色蛍光蛋白質 (EmGFP) 標識 Ago2 蛋白質発現ベクター (EmGFP-Ago2) を作成した。その後、マウス肝細胞株 (Hepa1-6) に遺伝子導入を行い、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) を用いて生細胞ライブイメージング解析を行った。なお、コントロールベクターは、EmGFP 単独発現ベクターを用いた。

4. 研究成果

(1) miRNA ライブラリー作製

作製した miRNA ライブラリーの品質を、バイオアナライザーを用いて調べた。その結果、すべてのサンプルにおいて目的サイズ (157 bp) を示すライブラリーが作製されていることを確認した (図 2)。

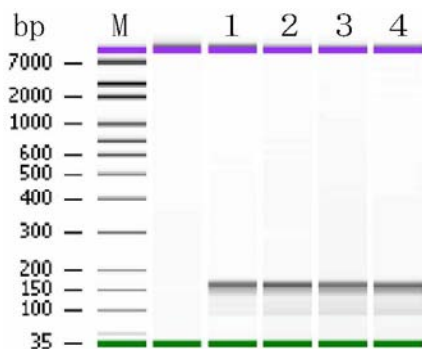


図2 バイオアナライザーを用いた miRNA ライブラリーの品質検定。M: DNA ラダーマーカー、1: AL (絶食無)、2: AL (16時間絶食)、3: CR (16時間絶食)、4: HFD (16時間絶食)

(2) 次世代シーケンシングを用いた既知 miRNA 及び未知 miRNA 候補群の網羅的同定

次世代シーケンシング解析により、マウス血漿中には 300 種類以上の Ago2 結合型 c-miRNA が存在することが明らかとなった。次に、各生理条件によって変動している Ago2 結合型 c-miRNA を分類した (cut off 値 5 倍)。

①AL (絶食有) 及び AL (絶食無) で比較した結果、98 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量の変動が認められた。具体的には、AL (絶食有) において、AL (絶食無) と比較して、20 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は減少していた。AL (絶食有) において、AL (絶食無) と比較して、78 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は、上昇していた。

②AL (絶食有) 及び CR (絶食有) で比較した結果、36 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量の変動が認められた。具体的には、CR (絶食有) において、AL (絶食有) と比較して、16 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は上昇していた。CR (絶食有) において、AL (絶食有) と比較して、20 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は減少していた。

③AL (絶食有) 及び HFD (絶食有) で比較した結果、69 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量の変動が認められた。具体的には、HFD (絶食有) において、AL (絶食有) と比較して、13 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は上昇していた。HFD (絶食有) において、AL (絶食有) と比較して、56 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は減少していた。

④CR (絶食有) 及び HFD (絶食有) で比較した結果、42 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量の変動が認められた。具体的には、38 種類の Ago2 結合型 c-miRNA 発現量は、CR (絶食有) 及び HFD (絶食有) において、AL (絶食有) と比較して上昇していた。miR-741 は CR (絶食有) のみにおいて発現が認められなかった。

(3) Ago2 結合型 c-miRNA 分泌機構の解明

①EmGFP-Ago2 発現 Hepa1-6 細胞の作製

EmGFP-Ago2 ベクターを Hepa1-6 細胞株に遺伝子導入を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果、細胞質内に顆粒状の EmGFP-Ago2 蛋白質が認められた (図3)。

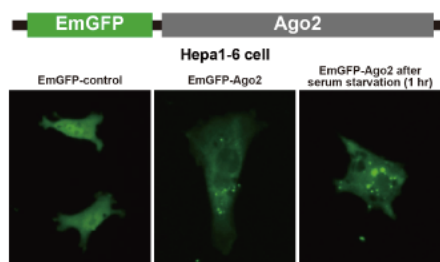


図3 (左) コントロールベクター遺伝子導入細胞では、顆粒状様態の物質は認められない。(中央) 細胞質内に顆粒状の EmGFP-Ago2 が多数認められた。(右) 1 時間栄養飢餓 (低グルコース) 状態した EmGFP-Ago2 発現 Hepa1-6 細胞では顆粒数が変化した。

②TIRF イメージング解析

TIRF は、試料側の厚さ数百ナノメートルのみを照明し (エバネッセント場の形成)、この厚みの範囲でのみ励起された蛍光試料を観察する手法である (図4)。

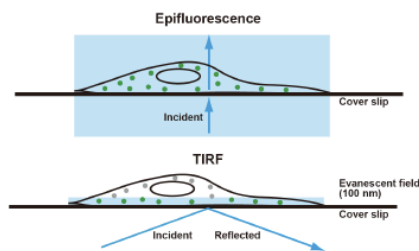


図4 (上) 一般的な蛍光顕微鏡では、細胞内に存在する全蛍光物質が励起される。従って、空間的解析は難しい。(下) TIRF は、細胞膜近傍に存在する蛍光物質のみを励起させるので、分泌機構の可視化解析が可能である。

EmGFP-Ago2 発現 Hepa1-6 細胞株を低グルコース状態にて培養を行い、TIRF イメージング解析を行った。その結果、多数の蛍光顆粒が認められた (図5)。

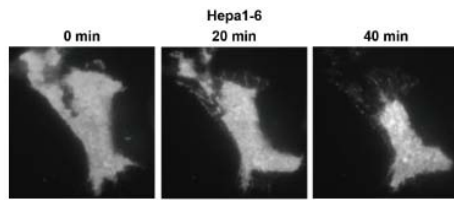


図5 TIRF イメージング解析の結果、低グルコース状態下における EmGFP-Ago2 発現 Hepa1-6 細胞では顆粒数が変化した。Ago2 蛋白質は分泌されている可能性が示唆された。

以上、本研究計画により、マウス血漿中に存在する c-miRNA の網羅的同定及び Ago2 分泌機構の可視化解析に成功した。本研究で見出されたいくつもの c-miRNA は、生活習慣病及び老化に関与するだけでなく、局所における炎症及び組織修復にも密接に関与していることが推察される。今後は、c-miRNA が司る包括的ネットワークを解明することにより、miRNA の役割を詳細に解明し、新規学術領域の創出を目指したい。

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4件)

(1) Chiba T, Tsuchiya T, Mori R, Shimokawa I, Reporter bioassay systems for the phenotypic screening of candidate drugs, *Sensors*, 査読有, 12, 2012, 1648-1656
DOI : doi:10.3390/s120201648

(2) Mori R, Ikematsu K, Kitaguchi T, Kim SE, Okamoto M, Chiba T, Miyawaki A, Shimokawa I, Tsuboi T, Release of tumor necrosis factor- α from macrophages is mediated by small GTPase Rab37, *European Journal of Immunology*, 査読有, 41, 2011, 3230-3239
DOI : doi: 10.1002/eji.201141640

(3) 森 亮一, 間所 俊介, Kim Sang Eun, 小松 利光, 千葉 卓哉, 坪井 貴司, 下川 功, マクロファージからのサイトカイン分泌に関与する低分子量 G タンパク質 Rab ファミリーの機能解析, *Biomedical Gerontology*, 査読無, 35, 2011, 33-36
DOI : 無し

(4) Komatsu T, Trindade LS, Chiba T, Hayashi H, Henmi T, Ushiroda Y, Mori R, Shimokawa I, Acute stress response modified by modest inhibition of growth

hormone axis: a potential machinery of the anti-aging effect of calorie restriction, *Mechanisms of Ageing and Development*, 査読有, 132, 2011, 103-109
DOI : doi:10.1016/j.mad.2011.01.002

[学会発表] (計12件)

① 森 亮一, 次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)

② 森 亮一, 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定及び機能解析, 第 42 回日本創傷治癒学会, 2012 年 12 月 2 日~4 日, かでる 2.7 (北海道)

③ Ryoichi Mori, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, The 4th EMBO meeting, 22~25 September, 2012, Nice (France)

④ 森 亮一, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, 第 4 回日本 RNAi 研究会, 2012 年 8 月 30 日~9 月 1 日, グランドプリンスホテル広島 (広島県)

⑤ Ryoichi Mori, Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka - Biology of Aging and Disorders-, 24 ~ 26 August, 2012, Tsukushi Kaikan (Fukuoka)

⑥ 森 亮一, 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定及び機能解析, 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 26 日~28 日, 京王プラザホテル (東京都)

⑦ Ryoichi Mori, Identification of differentially expressed circulating microRNA-complexed with argonute2 in blood plasma of calorie restriction and high fat diet-induced obese mice by next generation sequencing, The 2nd Pusan-Nagasaki Joint Seminar on Aging Research, 6 February, 2012, Pusan (Korea)

⑧ 森 亮一, 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑨ 森 亮一, 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定, 第 3 回日本 RNAi 研究会, 2011 年 8 月 26 日~27 日, グランドプリンスホテル広島 (広島県)

⑩森 亮一、マクロファージのサイトカイン分泌に關与する低分子量 G 蛋白質 Rab family の機能解析、第 34 回日本基礎老化学会、2011 年 6 月 17 日～18 日、京王プラザホテル（東京都）

⑪Ryoichi Mori, Molecular mechanisms for TNF α secretion from macrophages, Gordon Research Conferences -Tissue Repair & Regeneration, 2011 年 6 月 5 日～10 日, New Hampshire (USA)

⑫森 亮一、マクロファージにおける tumor necrosis factor- α の分泌は低分子量 G 蛋白質 Rab37 によって制御される、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜（神奈川）

〔図書〕（計 1 件）

(1)下川 功、千葉 卓哉、森 亮一、シーエムシー出版、レスベラトロールの基礎と応用 第 7 章 サーチュインと老化、寿命、2012、pp. 66-75

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
無し

○取得状況（計 0 件）
無し

〔その他〕

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 亮一 (MORI RYOICHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師
研究者番号：30509310

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し