

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590888

研究課題名(和文)長期飢餓ストレスが及ぼすエピジェネティック変化メカニズムの解明と臨床応用への展開

研究課題名(英文)Epigenetic mechanism under chronic starvation stress

研究代表者

高倉 修 (Shu, Takakura)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40532859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用い、40%食餌制限であれば死亡率は低く、十分な体重減少が得られた。通常慢性ストレスを10日間施行したマウスも作成した。マイクロアレイ法を用い、長期飢餓ストレスにより海馬において複数のmiRNAの発現が変化する事を見いだした。リアルタイムPCR法においては通常ストレス群と比較し、飢餓ストレス特異的miRNAが同定された。特定のmiRNAの標的は脳神経の発育に重要な蛋白である可能性が示唆された。飢餓ストレスで発現変化するmiRNAの機能が推定され、神経性食欲不振症等の飢餓ストレス状態におけるエピジェネティックメカニズムの解明やバイオマーカーの開発という観点からも重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using mice, sufficient decrease of body weight was observed under 40% food restriction and mortality rate was almost 0%. Also we made usual chronic stress mice using 10-days water avoidance stress test. We found several miRNAs whose expressions were altered under chronic starvation stress using miRNA microarray. We found chronic starvation stress specific miRNAs by realtime RT-PCR compared with RNAs from usual chronic stress mouse hippocampus. The target of the specific miRNA might be a protein which is important for the neurological development. We could estimate one end of mechanisms of miRNAs altered by epigenetical regulation. Those important findings were obtained from the point of view that the elucidation of the pathophysiological mechanisms under chronic starvation stress condition such as anorexia nervosa and the development of the biomarkers of such condition.

研究分野：心身医学

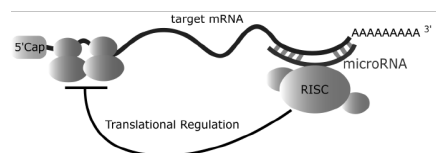
キーワード：マイクロRNA 長期飢餓ストレス 神経性食欲不振症 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

研究担当者は、甲状腺未分化癌細胞において、甲状腺未分化癌に特異的に高発現する miRNA クラスターを同定し、それらが RB1 などの腫瘍抑制タンパクを抑制制御することにより癌の増殖に寄与している可能性を示し (Takakura S et al, 2008, Ujifuku K, Takakura S et al, 2010)、一貫して miRNA に関する研究を行ってきたという背景がある。また、長期飢餓ストレス下のマウス海馬において、マイクロ RNA (miRNA) の発現を網羅的に解析し、発現変化する miRNA は多数存在する事を見いだした。

■ miRNA とは

miRNA 遺伝子は、染色体上の不安定領域に多くは存在すると言われている。miRNA は 20 塩基程度の小さな RNA であり、メッセンジャー RNA に相補的に結合する事により、その翻訳を抑制あるいは阻害する事により、タンパク発現を制御している。即ち、セントラルドグマ以外で、細胞の振る舞いを



を規定する新たな物質である。1990 年に線虫において報告されて以来、これまでに 500 種類以上の miRNA が報告されており、驚くべき事にその多くが種を超えて配列が保存されている。おそらくヒトにおいては約 1000 もの miRNA が存在し、様々なストレスにより miRNA の発現異常が出現することが近年多数報告されてきている (Marsit CJ et al, 2006, Uchida S et al, 2008)。また、脳腫瘍の薬剤の感受性に影響を与える因子としての miRNA の役割についても研究担当者のグループが報告した (Ujifuku K, Takakura S et al, 2010)。最近になり、血液中の分泌型 miRNA が癌の新たなバイオマーカーとして注目されている。

■ エピジェネティクスとは

塩基配列によらない遺伝情報の発現制御、体細胞ではその記憶が伝えられると定義されている。エピジェネティックな変化

は遺伝子活性を制御する生理的なプロセスであり、それ故に環境因子に反応して変化が生じる。中でも DNA メチル化が最も早く発見されたエピジェネティクス要因である。近年ではうつ病における Brain derived neurotrophic factor (BDNF) のメチル化異常がうつ病診断に有用なバイオマーカーとなり得るとの報告がなされている (Fuchikami M et al, 2011)。

発現変化する miRNA は多数存在する事が判明したが、文献的にもその機能は明らかではない。加えて、如何なるメカニズムで発現変化が生じるかについては手つかずのままである。また、AN の診断はアメリカ精神医学会による The diagnostic and Stastial Manual of Mental Disorders を用いているが、その症状評価に有用なバイオマーカーは皆無と言っても過言ではない。

2. 研究の目的

研究担当者らは長期飢餓ストレスにより、マウス海馬における多数のマイクロ RNA (miRNA) が後天的に発現変化する事を見いだしている。本研究では長期飢餓ストレス下のマウス海馬で発現変化するマイクロ RNA (miRNA) に着目し、長期飢餓ストレスで変化する複数の miRNA の機能を明らかとすること、また神経性食欲不振症 (AN) の新たなバイオマーカーの開発につなげることを目的とする。さらに、miRNA がなぜ変化するのかを DNA のメチル化に着目し解明する。この研究により、AN による様々な異常の病態生理の一端が、エピジェネティクスの観点から明らかとなり、AN 診断における新たな客観的指標の開発に繋がる有用な発見が得られる事が期待される。

3. 研究の方法

飢餓モデルマウス (Food restriction 法) (1)6 週齢雌 BALB/c マウスを購入し、1 匹/1 ケージで飼育する。(2)9 週齢 (思春期頃) になったら 1 日食餌量を算出し、コントロール群 (食餌制限なし)、40% 食餌制限群および慢性通常ストレス群に振り分け、飼育する。(3)約 20 日間にわたり食餌を制限する。慢性ストレス群に関してはウォーターアボイダンスストレステスト 10 日間施行。(4)食餌制限 2 週を超えるとマウスの体重は最大体重の -32% となりプラトーに達する。(5)プラトーに達した食餌制限 3 週目 (12 週齢) にマウスの海馬を摘出し RNA およびタンパクを抽出する。抽出には mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて total RNA を抽出し -80°C 保存する。

TaqMan microRNA assays を用いた miRNA の定量: 統計学的に有意に発現変化した miRNA す

べて (約 20 個の miRNA) について TaqMan microRNA assays キットを用い、リアルタイム RT-PCR 法を施行する。

ターゲットの特定と機能解析: miRNA は配列特異的にターゲットメッセンジャーRNA の 3'-UTR 領域に結合し、タンパクへの翻訳を阻害することが知られている。同定したすべての miRNA のターゲット mRNA を Target scan を用いて予測することが可能である。DNA メチル化異常の検討: miRNA をコードする領域におけるメチル化/非メチル化をメチル化特異的 PCR 法を用いて検討する。マウス海馬より QIAamp DNA Mini kit を用いて抽出する。DNA を EpiTect Bisulfite kit を用いてバイサルファイト処理し、メチル化/非メチル化プライマーを用いて PCR プロダクトを作成する。プライマーの設計は Methyl Primer Express などのソフトウェアを用いる。

4. 研究成果

マウスを用い、40%食餌制限であれば死亡率は低く、十分な体重減少が得られた。通常慢性ストレスを 10 日間施行したマウスも作成し、死亡率は 0%で、体重減少は認めなかった (図 1、図 2)。

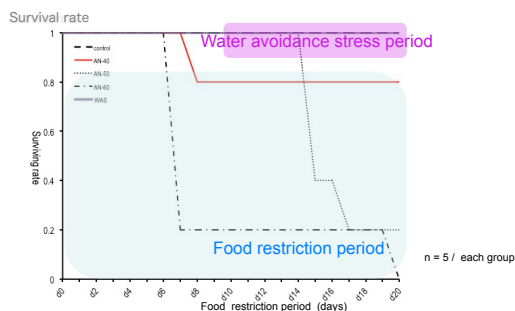


図 1

マイクロアレイ法を用い、長期飢餓ストレスにより海馬において複数の miRNA の発現が変化する事を見いだした。リアルタイム PCR 法においては通常ストレス群と比較することで、飢餓ストレス特異的 miRNA が同定された (miR-X, miR-Y) (図 3) miRNA の発現を制御する DNA メチル化異常については現在もお検討中である。

特定の miRNA の標的は脳神の発育に重要な蛋白である可能性が示唆された。飢餓ストレスで発現変化する miRNA の機能が推定され、神経性食欲不振症等の飢餓ストレス状態におけるエピジェネティックメカニズムの解

明やバイオマーカーの開発という観点からも重要な知見が得られ、現在論文執筆中である。

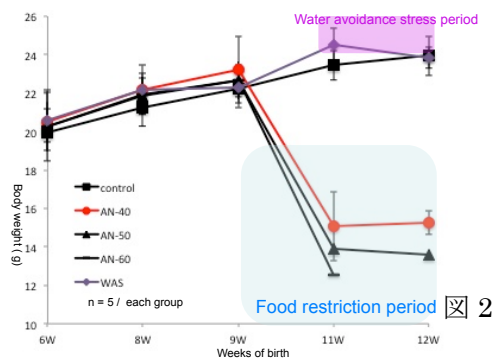


図 2

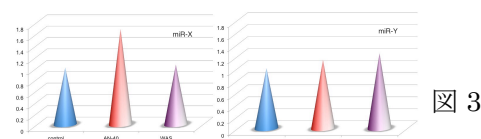


図 3

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Shu Takakura, Keisuke Kawai, Tetsuya Hiramoto, Masato Takii, Chiharu Kubo, Nobuyuki Sudo

Specific microRNA expressions under chronic starvation stress in mouse hippocampus

22nd World Congress on Psychosomatic Medicine, 2013, Lisbon, Portugal

(2) 高倉 修, 河合 啓介, 横山 寛明, 小島 美沙子, 田中 和子, 須藤 信行
栄養回復期に虫垂炎を発症した神経性食欲不振症の 3 症例

第 17 回日本摂食障害学会, 神戸, 2013

(3) 高倉 修, 西原 智恵, 波多 伴和, 権藤 元治, 森田 千尋, 瀧井 正人, 河合 啓介, 須藤 信行

9 歳発症の若年性神経性食欲不振症の一治療例

第 18 回日本摂食障害学会総会、大阪、2014

[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:
出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 修 (TAKAKURA SHU)

研究者番号：80325521

(2) 研究分担者

河合 啓介 (KEISUKE KAWAI)

研究者番号：80117100

(3) 連携研究者

()

研究者番号：