

令和元年5月30日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19917

研究課題名(和文)非アルコール性肝疾患における炎症性 miRNA の機能解析と分子標的医薬の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of inflammation-related microRNA in non-alcoholic steatohepatitis and antisense oligodeoxynucleotide development

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、miR-X が関与する脂肪肝・NAFLD・NASH の全容解明および創薬ターゲットとしての可能性を探索した。その結果、(1) miR-X KO マウスは高脂肪食餌により寿命が延長すること、(2) miR-X KO マウスは加齢依存性脂肪肝の発症が抑制されていることが明らかとなった。さらにその分子メカニズムを解明するため、肝臓における miR-X 標的遺伝子群の包括的同定をおこなった。その結果、miR-X KO マウスにおいて、2,245 種類の遺伝子が高発現に認められた。さらに代謝と関連深い 7 種類の miR-X 標的候補遺伝子を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の変化に伴って、脂肪肝を呈する日本人は急増している。脂肪肝が悪化すると NAFLD・NASH へと進展するため、新たな治療薬及び検査マーカーの創出が急務である。臓器線維化は、不可逆的反応である。NASH では高度な線維化を伴うため、発症を事前に防ぐことも重要である。本研究達成により、miR-X が関与する脂肪肝発症及び NASH へと進展するメカニズム、そして miR-X を標的としたアンチセンスオリゴ(核酸医薬)の開発に成功した。miR-X を治療標的・検査マーカー分子として位置づけることにより先制医療確立に貢献していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Compared with wild-type (WT) mice, miR-X KO mice have shorter life spans (median survival time 117 and 54 weeks for WT and KO mice, respectively), which was extended by feeding a high-fat diet (HFD) (96 and 72 weeks, respectively). WT mice exhibited age-related fatty liver disease; however, this was attenuated by miR-X deficiency mice. Moreover, HFD feeding protected miR-X KO mice from the hepatic steatosis observed in age-matched HFD-fed WT mice, suggesting that miR-X plays a key role in hepatic lipid metabolism. Candidate miR-X target mRNAs were identified by performing RNA-sequencing of livers from 54-week-old WT and miR-X KO mice. We identified 2,245 genes that were upregulated (>2.0-fold) in miR-X KO livers compared with WT livers. Among these genes, bioinformatic analysis revealed seven candidate miR-X target mRNAs that were markedly associated with biological pathways in lipid metabolism.

研究分野：実験病理学

キーワード：microRNA NAFLD NASH アンチセンスオリゴ 脂肪肝 寿命 代謝 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、miR-X KO マウスを作製・機能解析を行っている過程で miR-X KO マウスは、脂肪性肝疾患が抑制されることを発見した。

脂肪性肝疾患は、主に肝細胞に中性脂肪が沈着して肝障害をきたす疾患の総称である。これまで脂肪性肝疾患の原因は、過剰飲酒と考えられてきた(アルコール性肝疾患)。90年代頃より、アルコール性肝疾患を惹起するほど飲酒歴がなくとも、アルコール性肝疾患と類似する所見を示す肝障害が報告されるようになった。現在では、NAFLD(非アルコール性脂肪性肝疾患：脂肪肝を呈する病態)および NASH(非アルコール性脂肪性肝炎：NALFD 進行により肝線維化(肝硬変)・肝癌を発症)と報告されている。脂肪肝を呈する日本人男性は 30% を超えており、NAFLD・NASH の患者数は増加傾向であるため、新たな治療薬および検査マーカーの創出が急務である。

そこで本研究では、miR-X が関与する脂肪肝・NAFLD・NASH の全容解明および創薬ターゲットとしての可能性を追求するに至った。本研究達成により、miR-X を治療標的・検査マーカー分子として位置づけることにより先制医療確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、miR-X が関与する脂肪肝、NAFLD および NASH の全容解明並びに miR-X アンチセンスオリゴ(AS ODN)の開発である。具体的には以下である。

- (1) 脂肪肝・NAFLD・NASH 発症における miR-X の機能解明。
- (2) 脂肪肝・NAFLD・NASH 改善効果を有する miR-142 AS ODN の開発。

3. 研究の方法

(1) 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 週間食餌させる。そして、脂肪肝および脂肪蓄積を検証する。

(2) NAFLD・NASH 発症モデルマウスの作製

NAFLD・NASH 発症マウスモデルを、コリン・メチオニン欠乏食餌ならびにフルクトース食餌(Charlton et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011)を用いて作製する。具体的には、生後 8 週齢マウスに各餌を 12~24 週間与える。そして、脂肪肝および脂肪蓄積に伴う線維化のグレードを病理学的に検証し、NAFLD・NASH モデルマウスを作製する。

(3) 脂肪肝発症過程における miR-X 標的遺伝子の包括的同定

通常食餌を 54 週間施したマウス肝組織をホモジナイズし、total RNA を精製した。そして、HiSeq(イルミナ社)を用いて RNA シークエンス(RNA-Seq)を行った。バイオインフォマティクス解析は、Strand NGS(Strand 社)を用いた。

(4) miR-X AS ODN の作製

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector(promega 社)に mature miR-X 配列を導入した。その後、Locked Nucleic Acid(LNA)修飾 miR-X AS ODN 及び上記発現ベクターを、3T3 細胞株へ遺伝子導入した。導入 48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) miR-X KO マウスは HFD 食餌により寿命が延長する

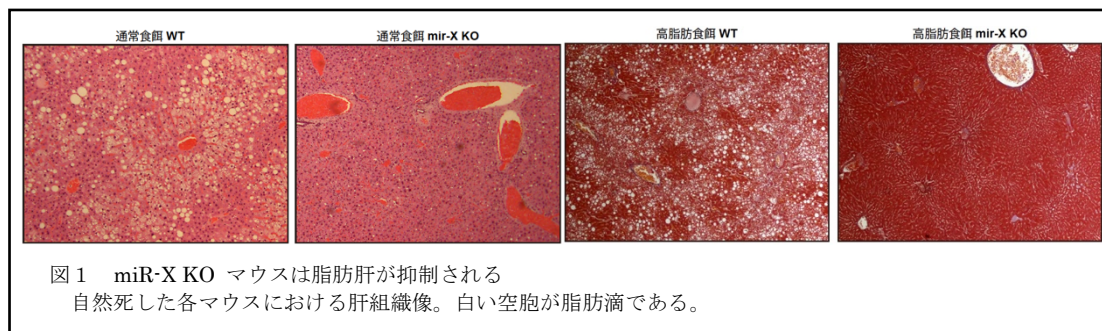
生後 6 週齢を始めとして、野生型(WT)及び miR-X KO の寿命を調べた(表 1)。その結果、通常食餌(RD) miR-X KO マウスの寿命は、RD-WT マウスと比較して、短かった。しかし、miR-X マウスは、HFD 食餌により寿命が延長した。一般的には、HFD 食餌によって寿命は短くなる(例；WT マウス(雄)：RD 食餌 117 週、HFD 食餌 94 週)。今後は HFD 食餌によって寿命延長する原因を調べる。

| | WT | miR-X ヘテロ | miR-X KO |
|-------|-----|-----------|----------|
| RD 雄 | 117 | 107 | 54 |
| RD 雌 | 111 | 120 | 60 |
| HFD 雄 | 94 | 96 | 72 |
| HFD 雌 | 103 | 94 | 89 |

表 1 生存期間中央値
RD：通常食餌、HFD：高脂肪食餌

(2) miR-X KO マウスは加齢依存性脂肪肝の発症が抑制されている

自然死した通常食餌及び高脂肪食餌マウスを病理解剖行った結果、miR-X KO マウスは、肝臓における脂肪蓄積が減弱していた(図 1)。自由に食餌可能なマウスは、一般的に加齢に応じて肝臓に脂肪蓄積が認められる。しかしながら本研究では、食餌量には変化がないのにもかかわらず miR-X KO マウスは認められなかった。miR-X は、肝臓における脂肪代謝に関与している可能性が高い。



(3) NAFLD・NASH 発症モデルマウスの作製

NAFLD・NASH 発症マウスモデルを、コリン・メチオニン欠乏食餌ならびにフルクトース食餌を用いて作製した。現在、解析中である。

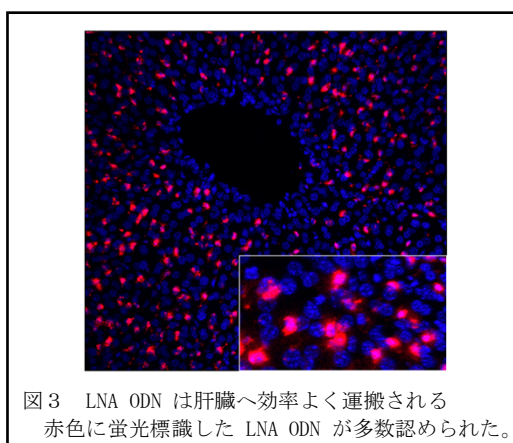
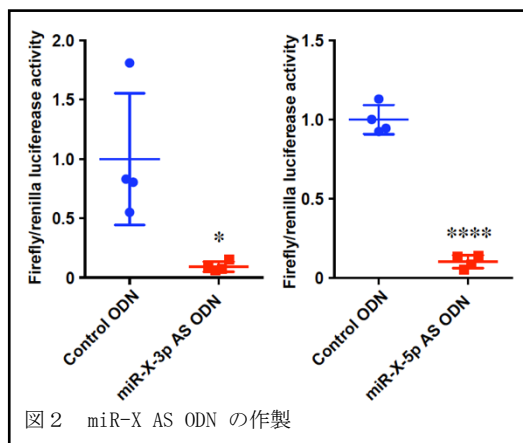
(4) 肝臓における miR-X 標的遺伝子群の包括的同定

通常食餌を54週間施した WT マウス及び miR-X KO 肝臓における mRNA 発現を、NGS を用いて解析した。その結果、miR-X KO マウスにおいて、2,245 種類の遺伝子が高発現に認められた (2 倍で cut off)。さらにバイオインフォマティクス解析を行い、7 種類の miR-X 標的候補遺伝子を抽出した。これら 7 種の遺伝子群の中には、代謝に重要な役割を担っている遺伝子も含まれていた。今後は、これら遺伝子発現細胞の同定を行い、機能解析を行うことを考えている。

(5) miR-X AS ODN の作製

LNA 修飾 miR-X AS ODN をデザインし、合成した。そして、miR-X 発現ベクターと miR-X AS ODN を同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、miR-X AS ODN 導入細胞では、ルシフェラーゼ活性の有意な発現減少が認められた (図2)。従って、miR-X AS ODN は miR-X に結合していることが確認された。

さらにリポソームを基本とした核酸デリバリーシステムを用いて、肝臓への LNA 修飾 ODN 運搬を検証した。その結果、腹腔内投与された Alexa564 標識 LNA ODN は、24 時間後、肝臓に到達していることが確認された (図3)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① Park S, Nayantai E, Komatsu T, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. Targeting NPY deficiency prevents postmenopausal adiposity by augmenting estradiol-mediated browning. *Journal of Gerontology: Biomedical Sciences & Medical Sciences*, 査読有, in press DOI:10.1093/gerona/gly282
- ② Umehara T, Mori R, Mace KA, Murase T, Abe Y, Yamamoto T, Ikematsu K. Identification of Specific MicroRNAs in Neutrophils of type 2 Diabetic Mice: Overexpression of *microRNA-129-2-3p* Accelerates Diabetic Wound Healing. *Diabetes*, 査読有, 68, 617-630, 2019.
DOI:10.2337/db18-0313
- ③ 森 亮一, 朴 盛俊, 下川 功, 栄養と加齢—基礎研究より—, 栄養, 査読無, 3 巻, 233-237, 2018.
DOI 無し

- ④ de Kerckhove M, Tanaka K, Umehara T, Okamoto M, Kanematsu S, Hayashi H, Yano H, Nishiura S, Tooyama S, Matsubayashi Y, Komatsu T, Park S, Okada Y, Takahashi R, Kawano Y, Hanawa T, Iwasaki K, Nozaki T, Torigoe H, Ikematsu K, Suzuki Y, Tanaka K, Martin P, Shimokawa I, Mori R. Targeting miR-223 in neutrophils enhances the clearance of *Staphylococcus aureus* in infected wounds. *EMBO Molecular Medicine*, 査読有, 10, e9024, 2018.
DOI:10.15252/emmm.201809024
- ⑤ Mori R, Tanaka K, Shimokawa I. Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair. *Development Growth & Differentiation*, 査読有, 60, 306-315, 2018.
DOI:10.1111/dgd.12542
- ⑥ 森 亮一、田中 克弥、野崎 中成、下川 功、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、臨床免疫・アレルギー科、査読無、69 巻、46-52、2018
DOI 無し
- ⑦ Park S, Komatsu T, Kim SE, Tanaka K, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. Neuropeptide Y resists excess loss of fat by lipolysis in calorie-restricted mice: a trait potential for the life-extending effect of calorie restriction. *Aging Cell*, 査読有, 16, 339-348, 2017.
DOI:10.1111/ace.12558
- ⑧ Park S, Mori R, Shimokawa I. The fat regulator neuropeptide Y and caloric restriction. *Aging (Albany NY)*, 査読有, 30, 2243-2244, 2017.
DOI:10.18632/aging.101338
- ⑨ Tanaka K, Kim SE, Yano H, Matsumoto G, Ohuchida R, Ishikura Y, Araki M, Araki K, Park S, Komatsu T, Hayashi H, Ikematsu K, Tanaka K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I, Mori R. MiR-142 is required for *Staphylococcus aureus* clearance at skin wound sites via small GTPase-mediated regulation of the neutrophil actin cytoskeleton. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有, 137, 931-940, 2017.
DOI:10.1016/j.jid.2016.11.018
- ⑩ Pei W, Tanaka K, Huang SC, Xu L, Liu B, Sinclair J, Idol J, Varshney GK, Huang H, Lin S, Nussenblatt RB, Mori R, Burgess SM. Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *npj Regenerative Medicine*, 査読有, 1, 16013, 2016.
DOI:10.1038/npjregenmed.2016.13

[学会発表] (計 15 件)

- ① 森 亮一、野崎 中成、miRNA-223 発現抑制は Interleukin-6 分泌促進を介し黄色ブドウ球菌感染創を改善する、第 18 回日本再生医療学会総会、2019
- ② 森 亮一、野崎 中成、miR-223 発現抑制は皮膚創傷部位の感染予防に効果的である、第 8 回臨床ゲノム医療学会、2018
- ③ 森 亮一、好中球由来 miR-223 の発現抑制は皮膚感染創における黄色ブドウ球菌排除を促進する、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- ④ Mori R, Comprehensive identification of wound healing and inflammation miRNAs reveals a key role for miR-223 in neutrophilic clearance of *S. aureus* at wound sites, EMBL Symposia The Complex Life of RNA, 2018
- ⑤ 森 亮一、小松 利光、朴 盛俊、下川 功、Role of C/EBP α -miR-223-Interleukin-6 secretion pathway at *Staphylococcus aureus*-infected wound sites. 第 41 回日本基礎老化学会総会、2018
- ⑥ 森 亮一、朴 盛俊、林 洋子、下川 功、黄色ブドウ球菌感染創における C/EBP α -miR-223-IL6 分泌経路の機能解析、第 107 回日本病理学会総会、2018
- ⑦ 森 亮一、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
- ⑧ Mori R, Comprehensive identification of wound healing and inflammation miRNAs reveals a key role for miR-223 in neutrophilic clearance of *S. aureus* at wound sites, 33rd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine, 2017
- ⑨ 森 亮一、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、第 9 回日本 RNAi 研究会/第 4 回日本細胞外小胞学会、2017
- ⑩ 森 亮一、田中 克弥、小松 利光、朴 盛俊、林 洋子、荒木 正健、荒木 喜美、下川 功、Inflammation-related miR-142 family is associated with longevity and metabolism in vivo, 第 40 回日本基礎老化学会総会、2017
- ⑪ Mori R, Comprehensive Identification of Wound Healing and Inflammation miRNAs Reveals a Key Role for miR-223 in Neutrophilic Clearance of *S. aureus* at Wound Sites. Gordon Research Conference: Tissue Repair and Regeneration, 2017

- ⑫ 森 亮一、下川功、皮膚創傷治癒過程における miR-223 の機能解析、第 106 回日本病理学会総会、2017
- ⑬ 森 亮一、創傷治癒における microRNA の新機能. 第 46 回日本創傷治癒学会, シンポジウム「創傷治癒学の最前線：基礎医学の進歩」、2016
- ⑭ 森 亮一、田中 克弥、下川 功、MiR-142 は皮膚創部における黄色ブドウ球菌感染防御に必須である、第 62 回日本病理学会秋期特別総会、2016
- ⑮ Mori R、Identification of wound inflammation-related miRNAs: miR-223-deficient neutrophils improve Staphylococcus aureus-infected skin wound sites. EMBO Conference: The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair、2016.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鳥越 秀峰

ローマ字氏名：TORIGOE, Hidetaka

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：理学部第一部応用化学科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80227678

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：下川 功

ローマ字氏名：SHIMOKAWA, Isao

研究協力者氏名：小松 利光

ローマ字氏名：KOMATSU, Toshimitsu

研究協力者氏名：田中 克弥

ローマ字氏名：TANAKA, Katsuya

研究協力者氏名：野崎 中成

ローマ字氏名：NOZAKI, Tadashige

※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。