

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17984

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおけるmiR-221/222の機能解析

研究課題名(英文)Adipocyte-specific ablation of mir221/222 protects mice from obesity and insulin resistance

研究代表者

山口 哲志(Yamaguchi, Satoshi)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：00834326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞特異的miR-221/222ノックアウトマウス(miR-221/222AdipoK0)は野生型マウスと比較して肥満や耐糖能異常が改善した。精巢周囲脂肪組織の遺伝子発現解析および3T3L1細胞を用いた3'非翻訳領域のレポーターアッセイによりmiR-221/222のターゲット遺伝子としてDNA-damage-inducible-transcript4(Ddit4)を同定した。Ddit4はmTOR活性の抑制因子として報告されている。miR-221/222AdipoK0の脂肪組織ではDdit4の蛋白発現量が上昇しており、mTOR活性が抑制される事で肥満が改善する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪細胞特異的miR-221/222ノックアウトマウスは食事誘導性肥満に抵抗性を示す事から、miR-221/222のメタボリックシンドロームにおける役割やその主たるターゲット遺伝子を明らかにする事により、miR-221/222Antagomirが肥満症、2型糖尿病、メタボリックシンドロームに対する治療法となり得る。また、マウス、ヒト血清中のmiR-221/222濃度を検討する事により、糖尿病診断や予後予測のバイオマーカーとしての意義を検討する。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue specific miR-221/222 knockout mice were protected from diet induced obesity. Gene chip analysis of epididymal fat tissue and luciferase reporter assay revealed miR-221/222 target DNA-damage-inducible-transcript4(Ddit4). Ddit4 is known as a negative regulator of mechanistic target of rapamycin (mTOR) which positively regulate cell growth and proliferation. Ddit4 protein expression were enhanced in the epididymal fat of miR-221/222AdipoK0. MiR-221/222AdipoK0 is protected from diet induced obesity through the repression of mTOR via miR-221/222 targeting Ddit4.

研究分野：糖尿病

キーワード：microRNA メタボリックシンドローム 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの蛋白質をコードするほとんどすべての遺伝子の発現は microRNA (以下 miRNA) による制御を受けていると考えられ、癌、メタボリックシンドローム、自己免疫疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病など多くの疾患において miRNA の発現パターンが変化していることが分かっている。さらに、血清中において miRNA は RNase に破壊されることなく安定して存在することが報告され、miRNA は他の細胞に取り込まれ細胞内 miRNA として機能し細胞間コミュニケーションにかかわっていると考えられている。そこで我々は肥満の病態形成に関わる miRNA を同定するために、食事誘導性肥満マウスの血清、肝臓、脂肪組織の miRNA 発現プロファイリングを施行したところ、脂肪組織特異的に発現が上昇する miR-221/222 を同定した。さらに血清中にも肝臓組織と同程度のリード数が存在することを示した。(Higuchi C Metabolism 2015 Apr; 64(4): 489-97.)。以上の経緯から脂肪細胞における miR-221/222 の機能解析研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では脂肪細胞特異的 miR-221/222 ノックアウトマウスを用いて miR-221/222 の肥満症やメタボリックシンドロームにおける役割やその主たるターゲット遺伝子を明らかにする。また miR-221/222 のヒトおよびマウスの血清中の濃度を検討することによってバイオマーカーとしての意義を検討する。これらの検討により miRNA の発現制御機構や機能を解明することで、新たな診断方法の開発や miR-221/222 Antagomir を肥満症、2 型糖尿病、メタボリックシンドロームをターゲットとした RNA 創薬へと研究を展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) miR-221/222 は X 染色体上に近接して存在し、シード配列が同一であり、また発現調節も似通っているので、miR-221、miR-222 を同時にノックアウトした。miR-221/222 flox/flox とアディポネクチンプロモーター Cre トランスジェニックマウスを交配することによって脂肪細胞特異的 miR-221/222 ノックアウトマウス (miR-221/222 AdipoK0) を作製した。野生型マウス (miR-221/222 flox/y) と miR-221/222 AdipoK0 を高脂肪高蔗糖食で飼育しその表現型を解析する事で脂肪組織における miR-221/222 の機能や主たるターゲット遺伝子を明らかにする。

(2) miR-221/222 AdipoK0 と miR-221/222 flox/y の脂肪組織における mRNA と miRNA の発現プロファイルの比較を行い、さらにそのターゲット遺伝子を同定する。また miR-221/222 発現レンチウイルスベクター、LNA microRNA Mimic あるいは Antagomir を用いて、マウス培養 3T3L1 脂肪細胞やマウス培養血管内皮細胞で過剰発現あるいはノックダウン実験を行い、さらに mRNA と miRNA の発現プロファイリング (DNA アレイ) を施行してターゲット遺伝子の確認を行う。

(3) マウスの精巣周囲脂肪組織より精製した poly (A) RNA を用いて、Rapid Amplification of cDNA (RACE) を施行する事でマウスにおける miR-221 ホスト遺伝子を同定する。

(4) miR-221/222 の血清中の濃度を高脂肪高蔗糖食負荷 C57BL6 マウス、正常耐糖能者、2 型糖尿病患者で検討することによってバイオマーカーとしての意義を検討する。

4. 研究成果

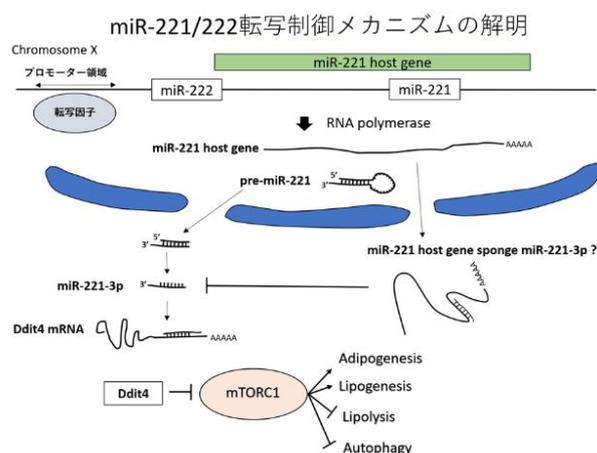
(1) miR-221/222 AdipoK0 では miR-221/222 flox/y で認められる精巣周囲脂肪組織における miR-221/222 の発現増加が有意に抑制され、miR-221/222 flox/y と比較して体重増加が有意に抑制された。miR-221/222 AdipoK0 マウスの脂肪組織重量は miR-221/222 flox/y と比較して低下し、病理組織においては脂肪細胞の小型化が認められた。酸素消費量、呼吸商に有意な差は認めないが、糖負荷試験・インスリン負荷試験では糖代謝およびインスリン抵抗性が改善した。精巣周囲脂肪組織を成熟脂肪細胞および stromal vascular fraction (SVF) に分離して miR-221/222 の発現量を検討した所、高脂肪高蔗糖食による miR-221/222 の発現上昇は成熟脂肪細胞特異的に認められ、SVF においては miR-221/222 の発現に変化は認められなかった。

(2) DNA アレイを用いた精巣周囲脂肪組織の mRNA 発現プロファイルにより、miR-221/222 のターゲット遺伝子候補として DNA-damage-inducible transcript4 (*Ddit4*) を同定した。pmirGLO に *Ddit4* の 3' 非翻訳領域をサブクローニングし 3T3L1 細胞を用いたルシフェラーゼ活性を測定したところ、miR-221-3p mimic および miR-222-3p mimic の存在下で低下した。一方、miR-221/222 の seed 配列との結合部位に変異を加えた 3' 非翻訳領域のルシフェラーゼ活性には変化が認められなかった。このことから miR-221/222 はその seed 配列を介して *Ddit4* の 3' 非翻訳領域に結合していることが示された。*Ddit4* は mTOR 活性の抑制因子として知られており、脂肪細胞においては mTORC1 活性の抑制を介してインスリンシグナルを増強することが報告されている。また *Ddit4* ノックアウトマウスにおいてはインスリン抵抗性による耐糖能の悪化を認めることが報告されていることから、miR-221/222AdipoK0 では発現上昇した *Ddit4* を介して mTOR 経路が抑制される事で肥満が改善する事が示唆された。マウス精巣周囲脂肪組織において *Ddit4* の蛋白発現量は miR-221/222 flox/y に比較して有意に上昇しており、mTOR の基質である S6K のリン酸化は miR-221/222 flox/y に比較して miR-221/222AdipoK0 で抑制される傾向を認めた。また、miR-221/222AdipoK0 において脂肪細胞分解関連遺伝子である *Lipe* および *Pnpla2* の発現量と miR-221/222 発現量が強く負に相関した。また、レンチウイルスベクターを用いて 3T3L1 脂肪細胞において miR-221/222 のノックダウン実験を施行した所、miR-221/222 のノックダウンにより *Ddit4* の蛋白発現量は上昇し、インスリン誘導性の S6K のリン酸化は抑制される傾向を認めた。

mir221/222のターゲット遺伝子候補 *Ddit4* (DNA-damage-inducible transcript 4)

Annotation	Expression value				Ratio				Keyword
	Gene Symbol	STD flox/y	HFHS flox/y	STD AdipoK0	HFHS AdipoK0	STD flox/y / HFHS flox/y	HFHS AdipoK0 / STD flox/y	HFHS AdipoK0 / STD AdipoK0	
Igf2bp2	118.67	92.1249	111.7554	233.6214	0.94171111	2.535921633	0.776293537	2.090470796	○
Foxp2	53.299	25.9217	46.43965	56.3454	0.87130526	2.173875204	0.486344149	1.213294949	○
<i>Ddit4</i>	187.11	201.753	462.7286	363.3727	2.572693376	4.925549761	1.076306009	0.795212658	○
Tiparp	370.5	370.92	243.0674	629.3118	0.85505572	1.696832998	1.001139547	2.589042381	○
Gm13034	89.328	42.1467	66.82102	71.24998	0.748041988	1.695229393	0.471820226	1.062880904	○
Cdkn1c	139.73	64.0298	86.02513	99.0883	0.615654307	1.547503123	0.458240702	1.151828704	○
Gm17275	38.154	25.3554	28.33733	38.81103	0.742702665	1.522796175	0.664546943	1.362550036	○
Ppp2r2a	173.04	103.359	136.4849	156.1966	0.786018009	1.511209022	0.59524432	1.144424035	○
Caprin2	105.01	84.2198	107.7583	127.1511	1.026181566	1.509752515	0.802024674	1.17996572	○
Fox	250.58	115.658	96.99457	173.6935	0.38708195	1.501785438	0.481593204	1.790754885	○
Uhr1	466.95	305.255	824.7025	515.4158	0.83979894	1.407259055	0.549233409	0.825050088	○
Mark1	85.066	51.9903	72.25445	73.05361	0.849397416	1.405949422	0.610827134	1.011060357	○
Cas1	67.434	63.5866	83.56946	87.91584	1.239275979	1.382816921	0.942943555	1.052009191	○
Igfb3	54.551	51.5612	53.44313	71.05316	0.97890093	1.378039758	0.945191462	1.329509705	○
Ags1f	594.96	470.197	450.3722	646.7574	0.756984426	1.375501884	0.790306572	1.436050893	○
Etv3	409.62	143.705	342.2083	197.4402	0.835419716	1.3739252	0.350821875	0.576959121	○
Itih3	812.14	684.812	787.2126	920.5015	0.944677789	1.344167505	0.843216477	1.19979769	○
Ddx3x	858.5	512.759	864.2457	688.9457	0.73727234	1.345904233	0.597272921	1.037182036	○
Cpm8	216.84	167.54	246.7763	249.4114	1.110399723	1.328912547	0.864878737	1.033654975	○
Pvt1	122.86	150.147	130.7448	199.2742	1.022638068	1.327192246	1.174282767	1.524146276	○
Ptdm4	20.392	19.8345	22.20171	24.96736	1.088734869	1.325815598	0.923614459	1.124569234	○
Ets2	528.18	309.016	364.8452	406.857	0.690761172	1.316821998	0.585059407	1.151449568	○
Smarca1	20.203	21.4039	22.6035	28.04365	1.118815111	1.310214603	1.059436016	1.240677329	○

(3) (1)で示したように高脂肪高蔗糖食により成熟脂肪細胞特異的に miR-221/222 の発現が上昇した事から、脂肪細胞分化に関与する転写因子による miR-221/222 の転写制御が存在する可能性が示唆された。2019年に Bovine における miR-221 のホスト遺伝子として Long non-coding RNA の一つである *MIR221HG* が同定された (Genes 2020, 11(1), 29)。そのプロモーター部位には脂肪細胞分化にかかわる遺伝子の結合部位が存在し、*MIR221HG* のノックダウンにより 3T3L1 脂肪細胞の分化が促進する事が報告されている。*MIR221HG* はマウスでは同源性は保たれていないとされるが、多くの文献において種間で同源性が保存されていない Long non-coding RNA が機能的には保存されている場合がある事が報告されている。そこで、マウスの精巣周囲脂肪組織より精製した poly(A)RNA を用いて、*Mir221* 遺伝子上に gene specific primer を設計し、Rapid Amplification of cDNA (RACE) を施行した。その結果、長さ 1537bp の Long non-coding RNA を miR-221 ホスト遺伝子 (*Mir221* host gene) として同定し、Genbank に登録した。miR-221/222 の成熟 RNA は 3' 末端側 (mmu-miR-221-3p, mmu-miR-222-3p) である事から、*Mir221* host gene は miR-221/222 に対して 'microRNA sponge' 作用を有する事が予測される。そこで、野生型マウスにおいて miR-221-3p と miR-221 ホスト遺伝子の組織分布を比較すると、最も高い発現を示す脳において、高脂肪高蔗糖食により miR-221/222 は発現が低下し、一方 *Mir221* host gene の発現は上昇しており、逆相関が認められた。



(4) マウス血清においては mmu-miR-221-3p、mmu-miR-222-3p いずれも血中濃度が HFHS 飼育下で増加する傾向を認めたが、また正常耐糖能者および糖尿病患者血清において hsa-miR-221-3p は HbA1c と負に相関したが、hsa-miR-222-3p は HbA1c と正に相関した。

(5) 以上の成果から、miR-221/222 は脂肪組織で発現する事で *Ddit4* をターゲット遺伝子として mTOR 活性を上昇させ、メタボリックシンドロームの病態形成に寄与する事が考えられる。また、miR-221/222AdipoK0 の精巣周囲脂肪組織において脂肪細胞分解酵素に関連する遺伝子と miR-221/222 発現量が強く負に相関した事から、特に脂肪分解を抑制する事で肥満の病態形成に

寄与している事が示唆される。miR-221/222 の転写制御は Mir221 host gene の転写制御を共有すると考えられるが、そのプロモーター領域には脂肪細胞分化に關与する転写因子の結合部位が存在すると想定される。CAGE(Cap Analysis of Gene Expression)は、RNA ポリメラーゼ産物の Cap 構造を補足する Cap-trapper 法により RNA の 5' UTR の塩基配列をゲノム上にマッピングする技術であるが、CAGE 法により組織や細胞による転写開始点を同定し、転写因子結合領域の解析を行う。また、本研究において血清中の miR-222 は HbA1c と正の相関を示すことを見出した。血清中の miR-222 濃度は糖尿病発症の診断のバイオマーカーとなる可能性が高いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口哲志
2. 発表標題 メタボリックシンドロームにおけるmir221/222の機能解析
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口哲志
2. 発表標題 メタボリックシンドロームにおけるmir221/222の機能解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------