

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17989

研究課題名（和文）肥満・糖尿病におけるmicroRNAによるインスリンシグナル制御とその意義

研究課題名（英文）Regulation of insulin signaling by microRNAs in obesity and diabetes

研究代表者

小野 薫 (Ono, Kaoru)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：80836403

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）：脂肪組織において miR-222の増加がインスリン作用伝達を制御し、インスリン抵抗性を増大させるという仮説をのもと、実験を進めた。1) マウス由来前駆脂肪細胞である 3T3-L1細胞にmiR-222過剰発現すると、インスリン作用に関連するIRS-1タンパク、IRS-1のリン酸化、Aktリン酸化が減弱。2) miR-222を抑制すると、Aktリン酸化は回復した。3) 直接作用によるものかに関しては、miR-222とIrs-1 mRNAの結合をルシフェラーゼアッセイにて確認した。以上から脂肪組織において、miR-222の増加はインスリンシグナルを負に制御し、インスリン抵抗性を増大させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、糖尿病の主因であるインスリン分泌障害、インスリン抵抗性にmiRNAが関与するという報告がなされるようになり、これまで知られていなかった糖尿病の発症メカニズムの理解につながることで期待される。また治療ターゲットとしても、miRNAの役割、機能が明らかになれば、糖尿病の発症予防や新規の治療法開発、新規バイオマーカーの開発につながる可能性がある。

今回、脂肪細胞においてmiR-222がIRS-1タンパク発現を介してインスリンシグナルを傷害することを証明した。これらの知見は、肥満・糖尿病において脂肪組織のインスリン作用が減弱することを説明するメカニズムの一つである可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We discussed the hypothesis that increased miR-222 in adipose tissue regulates insulin signal transduction and increases insulin resistance. 1) Overexpression of miR-222 in mouse 3T3-L1 pre-adipocytes attenuated IRS-1 protein, IRS-1 phosphorylation and Akt phosphorylation. 2) Inhibition of miR-222 recovered Akt phosphorylation. 3) We confirmed a direct interaction between miR-222 and the 3' UTR of IRS-1 via luciferase assays. Our findings suggest that miR-222 may attenuate insulin signaling and increase insulin resistance in adipose tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：microRNA インスリンシグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病において、インスリン抵抗性、インスリン分泌能低下がその発症・増悪の主因である。インスリン抵抗性は、つまりインスリン作用の減弱であり、当研究室ではインスリンシグナル経路の重要分子であるインスリン受容体基質の IRS-1 について発現調節機序の解析を行い、慢性的な高インスリン状態が IRS-1 蛋白の半減期短縮をもたらし、インスリンシグナル作用を減弱することを報告した(Mol. Endocrinol. 1995)。近年、このインスリンシグナル制御に miRNA が関与しているという報告がなされている。

miRNA は 21~25 塩基の non coding RNA であり、標的 mRNA の 3' -UTR に結合し転写物の不安定化、翻訳抑制またはその両方の作用により標的蛋白の発現を抑制する。miRNA は人を含めた多くの動物に存在しており、細胞増殖、分化、アポトーシス、代謝ホメオスタシスなどほぼ全ての細胞プロセスに関与していることが知られている。また近年は miRNA が膵臓やインスリン標的臓器においてインスリンの生成・分泌、インスリンシグナルを制御することが明らかになっている。申請者らも、肥満インスリン抵抗性モデルマウスの肝臓において miR-222 の発現が増加しており、この発現上昇により IRS-1 蛋白発現量が減少し、肝臓でのインスリンシグナルが減弱、インスリン抵抗性が惹起されることを報告した (Ono K et al. Plos One. 2018)。しかしインスリン標的臓器である脂肪組織における miR-222 の役割については、肝臓と同じくインスリンシグナルを負に制御するのか、インスリン抵抗性に miR-222 がどれほど影響しているのか、miR-222 の発現抑制によりインスリン抵抗性は改善するのか、などの点は不明である。

### 2. 研究の目的

申請者らは「脂肪組織における miR-222 の増加が、インスリン作用伝達を負に制御しインスリン抵抗性を増大する」という仮説を立て、2型糖尿病の発症機序の一部として脂肪組織における miRNA の関与を明らかにし、インスリン抵抗性の発生機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) miR-222 過剰発現/抑制実験

miR-222 過剰発現/抑制に関しては、分化誘導した 3T3L-1 脂肪細胞に miR-222 mimic / miR-222 inhibitor または control oligo を導入試薬 Lipofectamine 3000 Reagent を用いて遺伝子導入し (培養液中の miR-222 mimic、inhibitor および control oligo の最終濃度は 30 nM とした)、48 時間培養ののち細胞を実験に用いた。miRNA の過剰発現、抑制の効果は q-PCR 法にて確認した。上記細胞に対しインスリン刺激を行い、インスリンシグナル経路の重要分子、その活性化の変化をウエスタンブロット法および q-PCR 法にて評価した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ：ベクターにはホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) とウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Rluc) を有する pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector を使用した。Luc の 3' 末端側に miRNA 標的配列として、miR-222 結合部位を含有している Irs-1 の 3' -UTR を導入し、miRNA 活性を定量的に評価した。3T3-L1 脂肪細胞を、Lipofectamine 3000 を用いて miR-222 mimic または control origo (最終濃度 30 nM) と 20ng の WT ベクター または mutant ベクターで、同時にトランスフェクションし、48 時間後に回収、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシの活性を測定した。

#### (3) グルコーストランスポーターを介した糖取り込み

グルコース取り込みの評価については、Glucose uptake assay kit-greenを使用した。3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化した後、miR-222を過剰発現させて48時間後、インスリンで刺激し、蛍光顕微鏡及びEx/Em=488nm/520 nm下プレートリーダーで評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 3T3L-1脂肪細胞においてmiR-222過剰発現によりAktのリン酸化は減弱した。

3T3L-1脂肪細胞にmiR-222 mimicをトランスフェクションすることで、miR-222の約90倍の過剰発現をq-PCRで確認した。インスリン刺激を加え、インスリン作用に関連するタンパクの発現をウエスタンブロットングで評価すると、IRS-1タンパクが減少し、インスリン刺激によるAktリン酸化が減弱した(図)。IRS-1 mRNAは有意に低下した。IRS-1タンパク、Aktリン酸化の減弱に伴い、PDE3Bをコードする*Pde3b* mRNAは有意差を持って減少し、*Hsl* mRNAも有意差を持って増加を示した。以上からmiR-222の発現上昇は脂肪組織におけるインスリン抵抗性に関与する可能性がある。

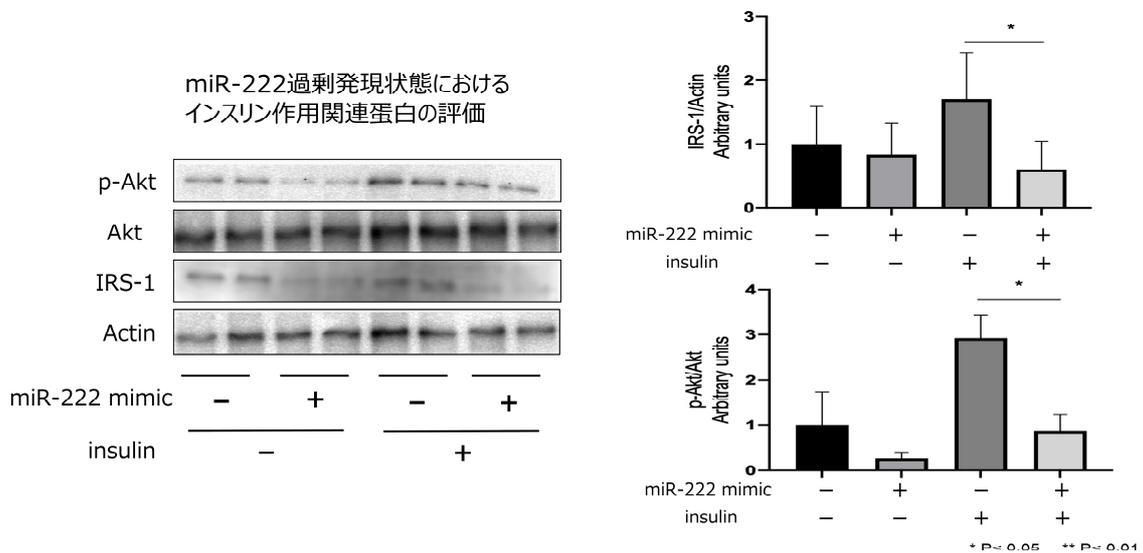


図 : 3T3-L1脂肪細胞におけるmiR-222過剰発現によるインスリンシグナルへの影響

(2) 3T3L-1脂肪細胞において、TNFによるインスリンシグナル伝達障害はmiR-222発現を抑制することにより回復する。

miR-222の発現を抑制することで、インスリン抵抗性を解除できるか解析した。TNFは濃度依存的にAktのリン酸化を抑制することは知られている。TNF刺激を加えた後、さらにmiR-222発現を抑制することで、インスリン作用に関連するタンパクの変化を検討した。3T3L-1脂肪細胞にmiR-222 inhibitorをトランスフェクションすることで、miR-222が約0.61倍の発現抑制されることをq-PCRで確認した。ウエスタンブロットでは、TNF処理によりAktリン酸化は減弱したが、miR-222 inhibitorを加えるとAktリン酸化は回復した。(図)。以上から、脂肪組織におけるmiR-222の発現抑制は、TNF誘発性のインスリン抵抗性を抑制できる可能性がある。

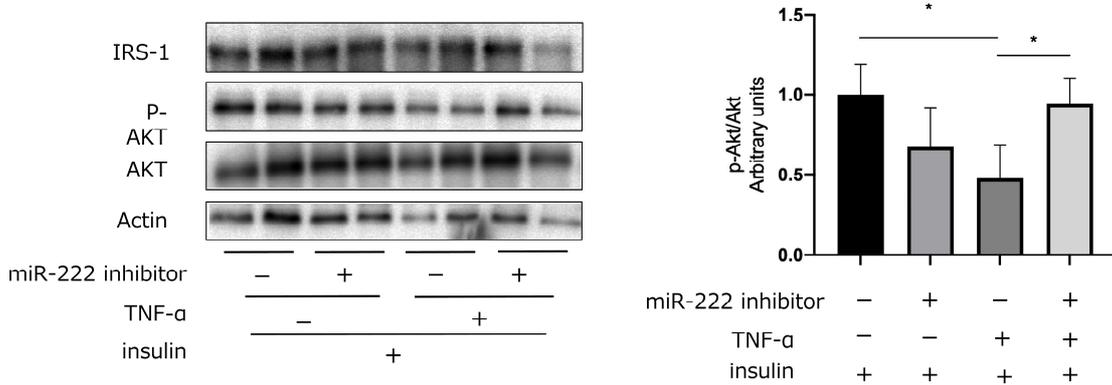


図 : 3T3-L1脂肪細胞におけるmiR-222発現抑制によるインスリンシグナルへの影響

(3) 脂肪細胞においてIrs-1 mRNAはmiR-222の標的遺伝子である。

3T3L-1 脂肪細胞においても miR-222 と Irs-1 mRNA 3' -UTR が結合するかを確認するためにルシフェラーゼアッセイを行った。miR-222 のシード配列に相補的な配列を含むマウス Irs-1 mRNA 3' -UTR を挿入したベクター (WT) を作成した(図 A)。またシード配列に相補的な配列を変異させたベクター (Mut) も作成し対照として使用した。

miR-222を過剰発現した3T3L-1脂肪細胞ではルシフェラーゼ活性が有意に低下した。しかし変異を入れたベクターを導入したmiR-222過剰発現細胞ではその活性は変化しなかった(図 B)。これらの結果はマウスIrs-1 mRNAがmiR-222の標的遺伝子であることを示している。

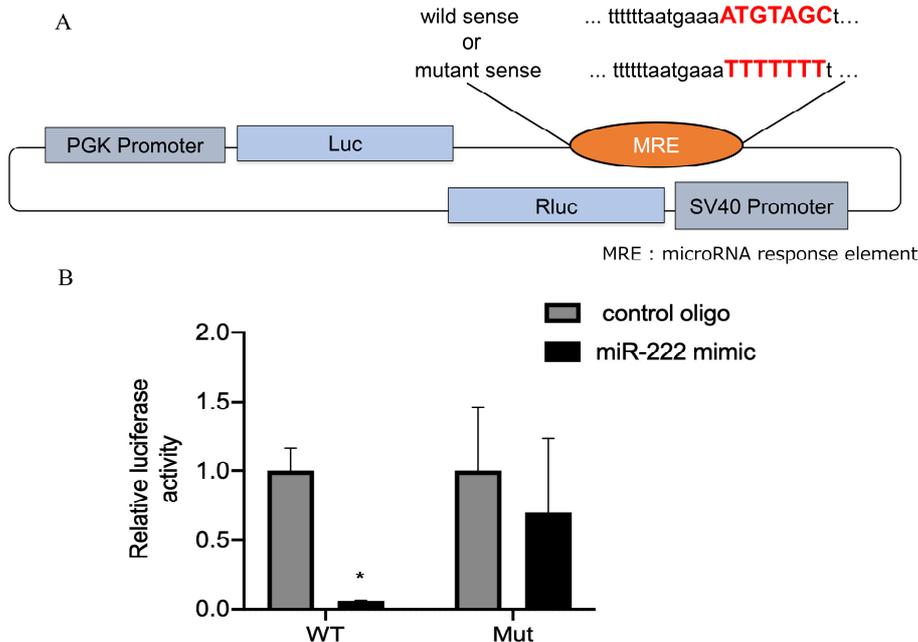


図 : miR-222と mouse IRS-1 mRNA 3' -UTRの結合をルシフェアーゼアッセイで検討。

(4) miR-222過剰発現によりグルコース取り込みが減少する。

miR-222 過剰発現によりインスリンシグナルの重要分子である Akt のリン酸化が抑制されることが判ったため、その下流であるグルコース取り込みを評価することとした。miR-222 を過剰発現した 3T3-L1 脂肪細胞では、糖取り込みがコントロールと比較し有意に低下していた(図 )。

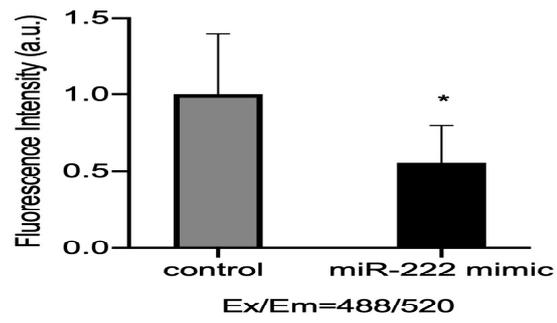
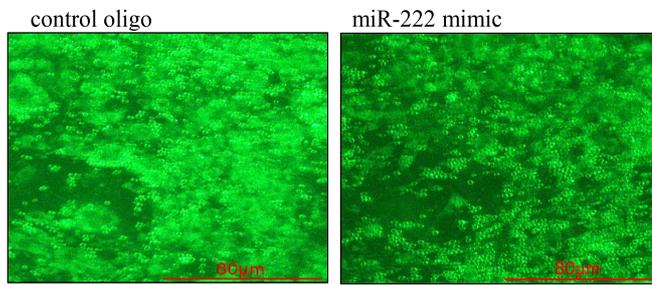


図 : miR-222 過剰発現によりグルコース取り込み

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------