

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：35313

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07065

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患において発現が増加するmiRNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of miRNAs upregulated in non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

田中 徹也(TANAKA, Tetsuya)

中国学園大学・Chugoku gakuen Univ, Faculty of Contemporary Life Science・教授(移行)

研究者番号：10346380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)患者の肝臓で発現が上昇している miRNA (miR-199a-3pおよび miR-126-3p) が脂肪細胞の分化と脂質代謝に与える影響を調査・検討した。miR-199a-3p とmiR-126-3pはいずれも、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質-(C/EBP)を増加させ、低酸素誘導因子(HIF)-1 の発現を減少させていることを明らかにした。このことから、これら miRNA は、HIF-1 および/または C/EBP mRNA 発現の制御を通じて脂肪細胞に脂肪滴形成を促進することで発症に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患の発症機序の一部に、miRNA を介した遺伝子発現制御により、低酸素誘導因子(HIF)-1 の発現を減少させることで、肝臓の脂肪細胞に油滴形成を促進させる経路があることを明らかにした。今回検討した miRNA は、これまでに非アルコール性脂肪肝で病態の進行に関与することが報告されていたものとは別の miRNA であり、その発現増加は既知のものよりも著しいものであり、学術的に新規性が高い。また得られた結果は、非アルコール性肝炎の発症機序の一部を明らかにしたものであり、疾患の予防や重篤化阻止に繋げていける社会的(医学的)にも意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：Investigation of the effects of miRNAs (miR-199a-3p and miR-126-3p) that are upregulated in the liver of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) on adipocyte differentiation and lipid metabolism. Both miR-199a-3p and miR-126-3p increase CCAAT/enhancer-binding protein-(C/EBP) and decrease hypoxia-inducible factor (HIF)-1 expression made it. These results indicate that these miRNAs contribute to pathogenesis by promoting lipid droplet formation in adipocytes through regulation of HIF-1 and/or C/EBP mRNA expression.

研究分野：薬理学、毒性学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 miRNA 導入 脂肪蓄積 炎症 繊維化

1. 研究開始当初の背景

肥満やメタボリックシンドロームを原因とする NAFLD では生活習慣の改善や運動療法、併発する糖尿病、高血圧、脂質代謝異常に対する治療が行われている。しかし、その効果は限定的であり、NAFLD に対する特異的な治療法は存在しない。NAFLD の克服には、病態進行度の診断や予後予測を行い、病態を改善する適切な治療法を選択すること、さらには NAFLD により喪失した肝機能をいかにして再生し維持するかが重要である。

そこで、NAFLD 肝組織で特に顕著な発現増加がみられる miR-126、miR-193a、miR-199a に着目し、これら miRNA が NAFLD の基礎病態である脂肪蓄積、炎症、線維化の発症・進行に及ぼす影響をプロテオミクス解析で解明し、NAFLD の発症・病態形成と miRNA の発現の関連を明確化することで、miRNA を利用した NAFLD の診断や予後予測法、さらには新たな治療法の開発基盤構築につなげたいと考えた。

2. 研究の目的

NAFLD 患者の肝組織での miRNA 発現解析の結果、正常肝と比較して NAFLD 肝組織で miR-126、miR-193a、miR-199a が著しく増加し、これら miRNA は、NAFLD で増加し、かつ病態を進行することが報告されている miR-122 よりも顕著な発現増加を示している。

これら miRNA の NAFLD の発症、肝機能維持における役割は明らかでなく、miRNA が制御するタンパク質の発現を網羅的に解析することで、miRNA の標的遺伝子を同定し、miRNA の表現型を誘導するタンパク質分子パスウェイを統合的に解析する。これにより、実際の肝病変でおこっている機能未知の miRNA (miR-126、miR-193a、miR-199a) の発現異常が、どのようなメカニズムで NAFLD を誘導するのかを明確化することを目的とする。

3. 研究の方法

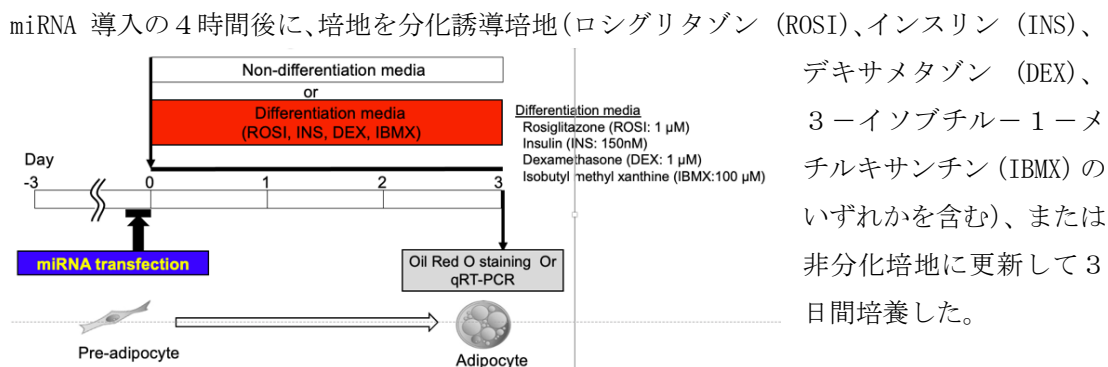
(1) 細胞培養 (タイムスケジュールは下図参照)

マウス脂肪細胞前駆細胞 3T3-L1 を 10% FBS 含ダルベッコ改変イーグル培地 (Pen、Stm 含) で培養した。培養条件は 5% CO₂ インキュベーター内、37°C。培地交換は 3 日ごと。

(2) miRNA の細胞への導入 (タイムスケジュールは下図参照)

miR-126-3p miR-199a-3p または miR-33a (ポジティブコントロール)、およびネガティブコントロール miRNA (control-miR) を、Lipofectami™ RNAi MAX トランスフェクション試薬を使用して 3T3-L1 細胞にトランスフェクトした。

(3) 脂肪細胞への分化誘導 (タイムスケジュールは下図参照)



(4) 脂肪細胞への分化（油滴蓄積）の確認

分化誘導後に細胞をプレート上で洗浄、固定後に Oil Red O で染色し、油滴を染色し、脂肪細胞への分化を観察した。また、プロパノールで染色された油滴を溶解し、A490 を測定することで定量化した。

(5) 脂肪細胞分化・脂質代謝関連遺伝子の発現量の解析（qRT-PCR）

分化誘導後の、または未分化の細胞から total RNA を抽出し、cDNA 逆転写後に Thunderbird SYBR qPCR mix を使用して、qRT-PCR を行った。定量値は GAPDH で補正した。

(6) バイオインフォマティクス解析

今回用いた miRNA の機能解析のためのターゲット遺伝子のバイオインフォマティクス解析は、miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) miR-199a-3p と miR-126-3p の両 miRNA とともに未分化細胞および脂肪細胞分化後の細胞に脂肪滴を蓄積させた（図 1）

図 1-A 脂肪細胞への分化

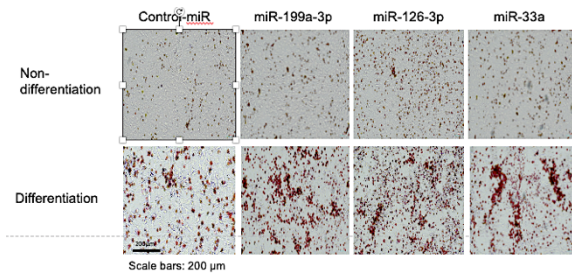
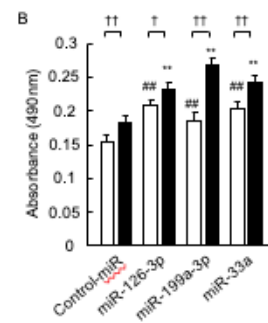


図 1-A に示すように control-miR と

比較して、positive control と同様に miR-199a および miR-126 は脂肪細胞を顕著に分化させ脂肪を蓄積させることが明らかになった。このことは、色素抽出による比色定量の結果からも確認している（図 1-B）。

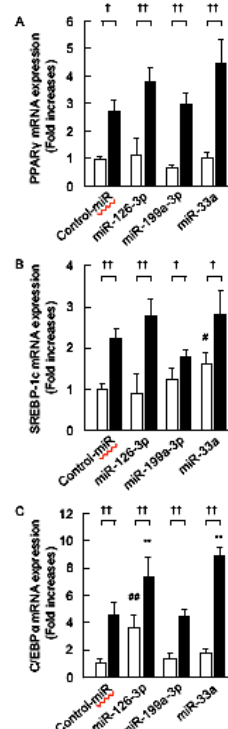


興味深いことに、miR-199a および miR-126 は、未分化細胞にも脂肪を蓄積させていた。

(2) miR-199a-3p と miR-126-3p は脂質代謝に関連する遺伝子の発現を制御している。

脂質蓄積における miR-126-3p および miR-199a-3p の分子機構を調査するため、3T3-L1 細胞における主要な脂肪生成制御遺伝子の mRNA 発現を検討した。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アルファおよびガンマ (PPAR α および PPAR γ)、ステロール調節エレメント結合タンパク質 1c (SREBP-1c)、および CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 α (C/EBP α) の遺伝子発現の変化を調査したところ PPAR γ 、SREBP-1c、C/EBP α の mRNA 発現は非分化条件下よりも増加したが（図 2 A, B）、PPAR α の mRNA 発現はすべてのグループで検出されなかった。miR-126-3p は、対照 miRNA と比較して、非分化条件および分化条件の両方で C/EBP α mRNA 発現を有意に増強した（図 2C）。一方、miR-199a-3p は PPAR γ 、SREBP-1c、および C/EBP α の mRNA 発現は変化させなかった。これらの結果は、miR-126-3p が 3T3-L1 細胞における C/EBP α mRNA 発現の誘導を介して脂質蓄積を促進することを示唆している。

図 2 脂肪代謝関連遺伝子の発現



(3) miR-126-3p は HIF-1 α の発現制御を介して C/EBP α の発現を調節している。

miR-126-3p が細胞内で C/EBP α mRNA 発現を誘導するメカニズムを調べるために、miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>)を使用して miR-126-3p の標的遺伝子を検索し、表1の結果を得た。この中から miR-33a の直接の標的であることが報告されている HIF-1 α に焦点を当て miR-126-3p または miR-199a-3p が今回の実験条件において HIF-1 α mRNA 発現をダウンレギュレートするかどうか検討した。

分化条件下では、miRNA を導入した各細胞における HIF-1 α mRNA の発現は、非分化条件下に比べて減少した (図3)

miR-126-3p と miR-199a-3p はいずれも、対照 miRNA と比較して、miR-33a と同様に分化条件における HIF-1 α mRNA 発現を抑制した(図3)。

さらに、miR-126-3p トランスフェクションは、未分化条件における HIF-1 α mRNA 発現を抑制した。一方、miR-199a-3p は、未分化条件では HIF-1 α mRNA 発現を変化させなかった。これらの結果は、miR-126-3p または miR-199a-3p が主に HIF-1 α mRNA 発現を減少させ、分化状態での脂質蓄積を引き起こすことを示唆している。

(4) まとめと研究結果の意義および今後の展望

最近、miRNA は、脂肪生成、炎症、線維症、発がんなどの複数の NAFLD 病因の主要な制御因子と予測され始めている。我々は以前の研究で、NAFLD 患者の肝生検サンプルにおける miRNA の発現が健常者と比較して異なることを報告してきた。しかし、それら miRNA の機能的標的と病理学的/生理学的役割は不明であった。その中で、我々は、miR-27b が ACOT2 発現の誘導を通じて脂肪細胞における過剰な脂質蓄積を促進している新規経路を発見してきた。本研究では、miRNA、miR-126-3p および miR-199a-3p が、NAFLD 病因の脂質蓄積に及ぼす影響を調査した。今回の研究の結果、miR-126-3p および miR-199a-3p が脂質蓄積を促進し、脂質代謝関連遺伝子発現を変化させる NAFLD 病因の新規メカニズムが示唆された (図4)。

本研究の結果は、miR-126-3p が 3T3-L1 細胞における脂質蓄積を増強し、C/EBP α 発現を増加させることを実証した。C/EBP α は肝臓および脂肪組織で高度に発現しており、脂質代謝、グルコース代謝、および脂肪生成に関与する重要な転写因子の1つである。C/EBP α は、分化し

表1 標的遺伝子の検索結果

Gene name	Symbol
solute carrier family 7, member 5	SLC7A5
calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	CAMSAP1
ADAM metalloproteinase domain 9	ADAM9
sprouty-related, EVH1 domain containing 1	SPRED1
v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog	CRK
polo-like kinase 2	PLK2
insulin receptor substrate 1	IRS1
regulator of G-protein signaling 3	RGS3
DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C (Drosophila)	DIP2C
integrin, alpha 6	ITGA6
syndecan 2	SDC2
protocadherin 7	PCDH7
EF-hand domain family, member D2	EFHD2
A kinase (PRKA) anchor protein 13	AKAP13
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	GNA13
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	PTPN9
F-box protein 33	FBXO33
hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	HIF1A

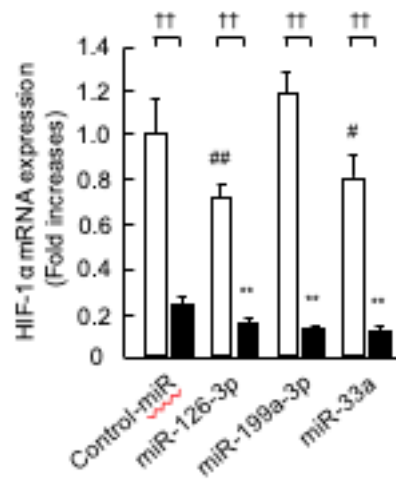


図3 HIF-1 α の発現変化

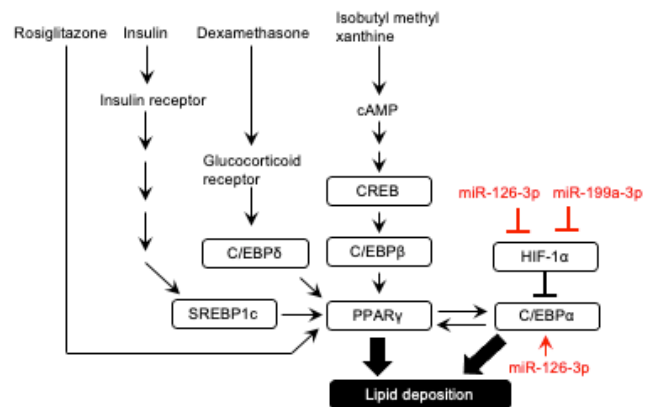


図4 NAFLD の病因の新規メカニズム

た脂肪細胞における PPAR γ 発現を活性化するためにも必要であり、C/EBP β および C/EBP δ は PPAR γ 発現を増強する。一方、PPAR γ は他の脂肪生成遺伝子と同様に C/EBP α の発現を誘導する。PPAR family は、協調して脂肪生成中の脂質代謝を促進すると考えられている。miR-126-3p が PPAR γ および SREBP-1c の mRNA 発現を変化させなかったことが今回のデータで示されたように、miR-126-3p-C/EBP α axis が過剰な脂質蓄積を引き起こすメカニズムを解明するには、脂肪生成遺伝子を含むさらなる研究が必要である。

さらに、肝臓における C/EBP α 発現および脂質代謝の調節に関与する miR-126-3p の標的 mRNA として HIF-1 α に焦点を当てた。HIF-1 ファミリーの活性化と低酸素状態が NAFLD における脂質蓄積誘導を起こすことが報告されているからである。HIF-1 α mRNA 発現が脂肪細胞分化中で著しく減少し、脂肪生成促進 miRNA が増強したという今回のデータは、miR-126-3p-HIF-1 α -C/EBP α cascade が、肝細胞および脂肪細胞における脂質蓄積の根底にある新規な分子機構である可能性を示唆しているが、具体的な機構解明にはさらなる検討が必要である。

これにより、miRNA を利用した NAFLD の診断や予後予測法、さらには新たな治療法の開発基盤構築につながると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 和田孝一郎、臼田春樹、田中徹也、岡本貴行	4. 巻 155
2. 論文標題 iPad を用いた動物実習シミュレーターの活用と今後の薬理学実習のあり方について（連載：これからの薬理学教育を考える）	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)	6. 最初と最後の頁 185-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takayuki Okamoto, Eiji Kawamoto, Haruki Usuda, Tetsuya Tanaka, Tetsuro Nikai, Kunihiro Asanuma, Koji Suzuki, Motomu Shimaoka, and Koichiro Wada	4. 巻 9
2. 論文標題 Recombinant human soluble thrombomodulin suppresses leukocyte adhesion by reducing lipopolysaccharide-induced endothelial cellular stiffening.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Israt Jahan, Takayuki Okamoto, Haruki Usuda, Tetsuya Tanaka, Koichiro Wada
2. 発表標題 Up-regulated miR-199a-3p and miR-126-3p promote adipocyte differentiation by targeting HIF-1 .
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中徹也、臼田春樹、新林友美、岡本貴行、和田孝一郎
2. 発表標題 高血圧自然発症ラット（Spontaneously Hypertensive Rat, SHR）の胎生期および新生児期におけるマスト細胞関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臼田春樹、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎
2. 発表標題 好酸球性食道炎患者における高病原性口腔内細菌の保菌についての検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田浩一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さがマクロファージの炎症性分化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田浩一郎
2. 発表標題 リコモジュリンによる血管内皮細胞の硬化抑制とその役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年回
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>中国学園大学現代生活学部人間栄養学科 https://www.cjc.ac.jp/university/human_nutrition.html 島根大学医学部薬理学講座 https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/</p>

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
研究 分 担 者	岡本 貴行 (OKAMOTO Takayuki) (30378286)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

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