

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710066

研究課題名(和文) 環境化学物質に対する生体応答にマイクロRNAは関与するか？

研究課題名(英文) Are miRNAs involved in responses to environmental chemicals?

研究代表者

吉岡 亘 (YOSHIOKA WATARU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80425496

研究成果の概要(和文)：

miRNAは生体の持つ多くの機能に関与する重要な遺伝子発現調節因子であると考えられている。しかしながら、化学物質が引き起こす生体応答にmiRNAが関与するかどうか不明であった。そこで、環境中に存在する汚染化学物質であるダイオキシンが、miRNAによる遺伝子発現調節機能を攪乱するかを検証した。

環境汚染化学物質であるダイオキシンを曝露されたマウス肝臓で、量の変動するmiRNAとしてmiR-101aとmiR-122を発見した。miR101aの標的であるCOX-2は、阻害剤実験から、ダイオキシン曝露による肝障害に重要な役割を果たすことが明らかとなった。これらの実験事実から、環境汚染化学物質であるダイオキシンがmiRNAを介した遺伝子発現調節異常を介して肝障害という毒性現象を引き起こすことが示された。

研究成果の概要(英文)：

MicroRNA (miRNA) is a class of small RNA that functions as a negative regulator of gene expression. Human and mouse genomes encode over 1,400 and 700 miRNAs, respectively, and most of the cellular pathways are considered to be modulated by miRNAs. However, it is still largely unknown about the pathophysiological role of miRNAs. Thus, we investigated the possible involvement of miRNAs in the toxic responses to xenobiotic chemicals.

Here, we searched for miRNAs responsible for inducing liver damage in mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and found that miR-101a and miR-122 are differentially downregulated by TCDD in a time-dependent manner. Since miRNA exerts multiple actions by repressing its target genes, we quantified the target genes of miR-101a, such as cyclooxygenase-2 (COX-2), enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), and cFos, and found the upregulation of these genes, which suggests that miR-101a downregulates the expressions of these genes in the mouse liver. A COX-2 selective inhibitor, NS-398, suppressed the onset of TCDD-induced liver damage. In conclusion, this study demonstrated that TCDD dysregulates the expression of miR101a and miR122, and that COX-2, a target gene of miR101a, plays a significant role in liver damage in mice exposed to TCDD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：毒性学

科研費の分科・細目：環境学(分野)、放射線・化学物質影響科学(細目)

キーワード：環境汚染化学物質、miRNA、COX-2

1. 研究開始当初の背景

生体は、環境ストレスに対応した遺伝子発現制御を行うことで、恒常性を維持しつつ環境適応を行っている。生体に備わる遺伝子発現の重要な制御因子として、転写因子とmiRNAがある。転写因子とmiRNAはそれぞれ固有の転写制御機構を持ち、多数の転写因子群とmiRNA群の複雑な組み合わせと相互作用によって、発現する遺伝子群が決定されている。

転写因子を介した環境応答は長年の研究により詳細に明らかにされてきた。環境中の化学物質に対しては、AhRやNrf2といった転写因子が、それぞれ第一相や第二相の薬物代謝酵素群の発現を誘導し、環境適応に寄与している。他方、miRNAは近年発見され、1000種類を超えるmiRNAがゲノム中の最大で30%の遺伝子の発現制御をすると予測されているが、未だ不明のことが多い。

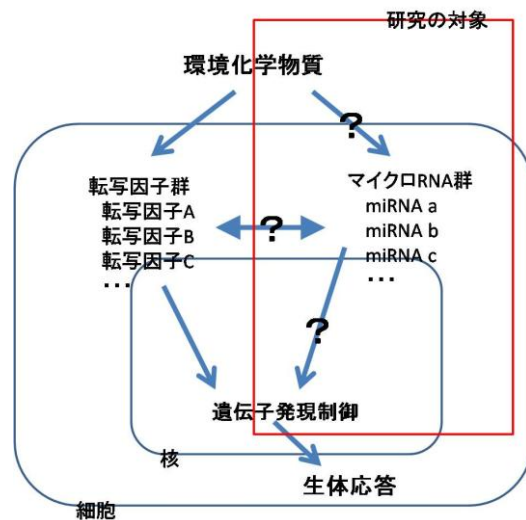
毒性学の分野では、ダイオキシン曝露に対する応答に関与するmiRNAの同定を試みた報告があるが、miRNAの抽出と検出に関する手法上の限界のために明確な結論を引き出すには至っていない。インスリン分泌、薬物代謝酵素の誘導、アポトーシス、細胞増殖といった重要な生体反応は、miRNAの制御下にあることが知られているが、これらの反応は、ダイオキシンによっても引き起こされることから、ダイオキシン曝露による生体応答の分子基盤にmiRNAが関与する可能性が高く、解明すべき重要な課題であると考えられる。

申請者は、環境中の化学物質が生体に及ぼす影響を分子レベルで明らかにすることを目標に研究を行い、環境化学物質が引き起こす腎臓の形態・機能異常に関与する遺伝子発現変化を明らかにしてきた。研究の過程で、「転写因子が制御する遺伝子発現調節に対する環境化学物質による攪乱」というこれまで一般的であった考え方に加えて、環境化学物質への生体応答の過程にmiRNAが関与することを想定することによって、これまで不明であった分子毒性メカニズムを実体に即して理解することができるのではないかとこの着想を得た。miRNA研究は近年急速に進展している研究分野で、研究手法が整備されつつある。機能性RNAの研究によって学位を得た申請者の知識と技術を活かして研究に取り組むことによって、環境化学物質への生体応答に関して新たな展開が期待できると考

え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

化学物質の生体影響は、「転写因子による遺伝子発現制御を介した反応」というパラダイムが実験的証拠に基づいて提示され支配的な概念となっている。一方、生体内に存在する機能性RNAであるマイクロRNA(miRNA)が発見されたのは比較的最近であり、miRNA群が転写因子群と並んで遺伝子発現制御を担う重要な因子であることが明らかにされてきているが、化学物質の生体影響に関するmiRNAの果たす役割については不明のことが多い。化学物質の有害性評価をより適切なものために、また、化学物質に対する生体応答についての理解を深めるために、化学物質が引き起こす影響について、これまで解明されてきた転写因子への作用に加えてmiRNAへの作用を解明する必要があると考えた。そこで本研究では、化学物質がmiRNAによる遺伝子発現調節を攪乱するかどうかを明らかにしようとした。



本研究では、環境化学物質による生体影響とmiRNAの関係を明らかにすることを目標に、手法の検証を行いながら研究を行った。具体的には、環境化学物質の典型例としてダイオキシンを用い、ダイオキシン曝露マウスの肝臓で発現量の変動するmiRNAとその標的遺伝子を同定することを目的とした。miRNAならびにその標的の変動を見出した場合には、そ

れらの変化が、肝臓での毒性現象において果たす役割を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6J 系統マウスは日本クレアから購入した。マウスはプラスチックケージで飼育し、飲料水および固形飼料（ラボ MR ストック）を自由摂取させた。飼育室内の温度と湿度は、それぞれ、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ に保ち、12 時間の明暗周期で飼育した。9 週齢の雄マウスに、コーンオイルに溶解した 2, 3, 7, 8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン (TCDD) を $50 \cdot \cdot \text{g} / \text{kg}$ 体重の用量で単回腹腔内投与し曝露を行った。解剖は、曝露後 2 日および 14 日に麻酔下で行い、血液および肝臓を採取した。肝臓片は、液体窒素を用いた凍結保存および 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。COX-2 の阻害実験では、COX-2 の選択的阻害剤として NS-398 を用いた。NS-398 は Dimethyl sulfoxide に溶解し、20、40 mg / ml の溶液を作製した。この溶液と Tween20 を、終濃度が 10% DMSO、1% Tween20 となるように生理食塩水で希釈し、投与液とした。TCDD 投与 6 時間前から、NS-398 を 20、40 mg / kg 体重の用量で 24 時間おきに 14 日間連続して、腹腔内投与を行った。血漿中 AST と ALT は Fuji DriChem7000 を用いて測定した。肝臓中 miRNA 量は、polyA polymerase (PAP) RT-qPCR 法によって解析した。miRNA 前駆体と標的遺伝子 (COX-2、cFos、EZH2) の RNA 量は RT-qPCR 法で、タンパク質量はウェスタンブロッティング法で解析した。

4. 研究成果

本研究では、まず、miRNA 定量法について検討を行った。miRNA は小分子 RNA 種に分類されるものであり、サイズが小さいことから通常の RT-PCR 法の適応はできない。そこで、RT-PCR 法を基にした小分子 RNA 種の定量法である stem-loop RT-qPCR 法ならびに PAP RT-qPCR 法について検討し、後者が精度・感度共に本研究の実験系においては良いことが分かった。従って、本研究では後者の方法を miRNA の定量法として用いた。

次いで、マウスへのダイオキシン (TCDD) 曝露が引き起こす肝障害について発症の時期を特定するための実験を行った。TCDD 曝露後 8 日目以降に顕著な肝障害が観察された。この実験の結果から、肝障害の起こっていない曝露 2 日後と、肝障害が既に起こっている曝露 14 日目を、以後の解析の時点とすることにした。

TCDD 曝露 2 日後の肝臓における種々の miRNA の発現量を解析した結果、miR-101a 量が減少していることを発見した。肝臓で多く発現す

ることの知られている miR-122 について定量を行った結果、この時点では量に変化がなかった。

TCDD 曝露 2 日後の時点で、miR-101a の標的遺伝子であることが知られている COX-2、cFos、EZH2 の発現量を解析したところ、これらの遺伝子について、タンパク質量が増加していた。標的である分子が何れも同様に増加していたことから、これらの分子の抑制因子である miR-101a の減少が、これらの分子の発現量を増加させたと考えられた。

TCDD 曝露 14 日後の肝臓における種々の miRNA の発現量を解析した結果、miR-101a 量が減少していることを発見した。減少の程度については、TCDD 曝露後 2 日後と同程度であった。また、肝臓で多く発現することの知られている miR-122 について定量を行った結果、miR-122 については、この時点で減少していることが分かり、曝露 2 日後とは異なる結果となった。

この時点で、miR-101a の標的遺伝子である COX-2、cFos、EZH2 のタンパク質量が増加していたことから、miR-101a の減少がこれら標的タンパク質の発現量を増加させたと考えられた。これらの変化が 2 日目と同様であったことから、マウス体内に存在する TCDD が持続的な変化を引き起こしたと考えられた。

COX-2 がプロスタグランジン合成の律速酵素であることから、COX-2 発現上昇が炎症性プロスタグランジン産生量を増加させて肝障害に至るとの仮説を立て、COX-2 選択的阻害剤 NS-398 投与実験により検証した。血中 ALT 及び AST レベルの TCDD 曝露による上昇は、NS-398 の投与量依存的に抑制された。miR-101a 量が NS-398 の影響を受けなかったことから、miR-101a の減少が COX-2 発現上昇や肝障害の結果ではなく原因であると考えられた。以上の結果から、TCDD 曝露がマウス肝臓中の miR-101a を減少させること、miR-101a の標的である COX-2 が曝露による肝障害の原因であることの結論を得ることができた。

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 2 件)

① Yoshioka W, Higashiyama W, Tohyama C. Involvement of MicroRNAs in Dioxin-Induced Liver Damage in the Mouse. Toxicol Sci. 査読有, 掲載確定 (印刷中), 2011. 掲載頁未定

② Yoshioka W, Peterson RE, Tohyama C. Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有, 掲載確定(印刷中), 2011. 掲載頁未定

〔学会発表〕(計4件)

① 吉岡 亘. Disruption of miRNA-regulation of COX-2 and downstream effects by dioxin. BMB2010. 2010年12月8日. 兵庫県・神戸市・神戸ポートアイランド

② 吉岡 亘. Reduction in miR-101a expression level and associated changes in TCDD-exposed mouse liver. SOT2010 (国際毒性学会第49回年会). 2010年3月10日. アメリカ合衆国、ソルトレークシティ・Exhibit Hall

③ 吉岡 亘. Effects of dioxin-exposure on gene expression regulated by micro RNA in the mouse liver. フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2009年11月6日. 沖縄県・宜野湾市・沖縄コンベンションセンター

④ 吉岡 亘. Reduction in miR-101a expression level in TCDD-exposed mouse liver. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease. 2009年10月26日. 東京都・文京区・東京大学鉄門記念講堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 亘 (YOSHIOKA WATARU)
東京大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号: 80425496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし