

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16365

研究課題名（和文）脂肪組織に由来するエクソソームmiRNAを介した肝細胞増殖機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of hepatocyte proliferation mediated by exosomal miRNAs derived from adipose tissue

研究代表者

小宮 力 (Komiya, Chikara)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60825256

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪細胞特異的に急性にインスリン受容体を欠損させた(iFIRKO)マウスでは、脂肪が萎縮し、続いて間葉系前駆細胞群の増加を伴って脂肪組織が再生されることが報告されている。本研究では、このときに血中エクソソームと肝臓で共通して増加するmiRNAとして、miR-144-3pとmiR-486a-3pを同定し、これらのmiRNAがTxnipの発現を抑制して肝細胞の増殖を促進することを見出した。また、miRNAの初期転写産物(pri-miRNA)の検討から、間葉系前駆細胞群の増加を伴う脂肪組織の再生過程で、これらのmiRNAがエクソソームに内包されて脂肪組織から肝臓に送達された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織の再生過程で、肝細胞の増殖を促進するmiRNAが血中エクソソームで増加することを明らかにし、これらは脂肪組織で増加した間葉系前駆細胞群に由来する可能性が考えられた。間葉系幹細胞には傷害臓器の再生作用が報告されているが、本研究で同定されたmiR-144-3pとmiR-486a-3pは、残存する肝細胞を増殖させることで肝硬変に対する再生治療効果を有する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Tamoxifen-inducible adipocyte-specific insulin receptor knockout (iFIRKO) mice are known to exhibit adipose tissue regeneration with increased numbers of adipose stem and progenitor cells (ASPCs). In this study, we identified miR-144-3p and miR-486a-3p as miRNAs that are commonly increased in serum exosome and the liver, and found that these miRNAs promote hepatocyte proliferation by suppressing Txnip expression as a target gene. While the expression levels of pri-miR-144-3p and pri-miR-486a-3p were not increased in the liver, they were elevated in adipose tissue, suggesting that these miRNAs may be delivered from adipose tissue to the liver via exosome during adipose tissue regeneration with increased ASPCs.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：miRNA エクソソーム 脂肪組織 間葉系幹細胞 NASH Txnip

1. 研究開始当初の背景

肥満人口の増加から、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の増加が必至であるが、肝硬変に至った NASH に対する根本的な薬物治療は存在せず、重大な臨床課題である。近年、間葉系幹細胞を用いた再生医療がさまざまな疾患に対して期待されており、肝硬変に対する有効性も示唆されている。治療効果の少なくとも一部は間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによることが明らかになってきたが、肝硬変に対する再生作用の分子機構は十分に解明されていない。

最近、血中エクソソームの多くは脂肪組織に由来することが明らかになり、エクソソームを介して脂肪組織から肝臓に miRNA が送達されることで肝臓の遺伝子発現が調節されることが報告された。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて脂肪組織で間葉系幹細胞が増加するときの血中エクソソームに着目し、エクソソームが内包する miRNA (Exo-miRNA) が肝細胞に及ぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

脂肪組織で間葉系幹細胞が増加するとき血中で増加する Exo-miRNA から肝細胞の増殖を促進する miRNA を同定し、脂肪組織の間葉系幹細胞に由来する Exo-miRNA が肝臓の再生治療効果をもたらす可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て、指針を遵守して行った。

野生型マウスは日本クレアより購入した C57BL/6J マウスを用い、後天的脂肪細胞特異的インスリン受容体欠損 (iFIRKO) マウスは、The Jackson Laboratory より購入した C57BL/6J バックグラウンドの Adipoq-Cre/ERT2 Tg/- マウスと IR flox/flox マウスを交配して作製した。

(2) RNA-seq

Exo-miRNA はマウス血清から miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen) miRNeasy Micro Kit (Qiagen) で抽出した RNA に対し、QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) でライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行った。リファレンスとなる miRNA を GeNorm アルゴリズムで選択した。miRNA の標的遺伝子の探索は、TargetScan、RNAhybrid を用いて行った。肝臓の遺伝子発現は、マウス肝臓から RNeasy Mini Kit (Qiagen) で抽出した RNA に対し、TruSeq stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) でライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行った。変動した遺伝子の GO 解析は、DAVID Bioinformatics Resources を用いて行った。

(3) RT-qPCR

Exo-miRNA、肝臓・脂肪組織の miRNA、pri-miRNA は、TaqMan Advanced miRNA Assays、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) で逆転写し、TaqMan Fast advanced Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 PCR を行った。肝臓・脂肪組織の mRNA は、Random Primer (Thermo Fisher Scientific) ReverTra Ace (Toyobo) で逆転写し、Fast SYBR Green Master Mix Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 PCR を行った。miRNA は *U6*、pri-miRNA は *Gapdh*、mRNA は *36b4* をリファレンスとした。

(4) 細胞培養

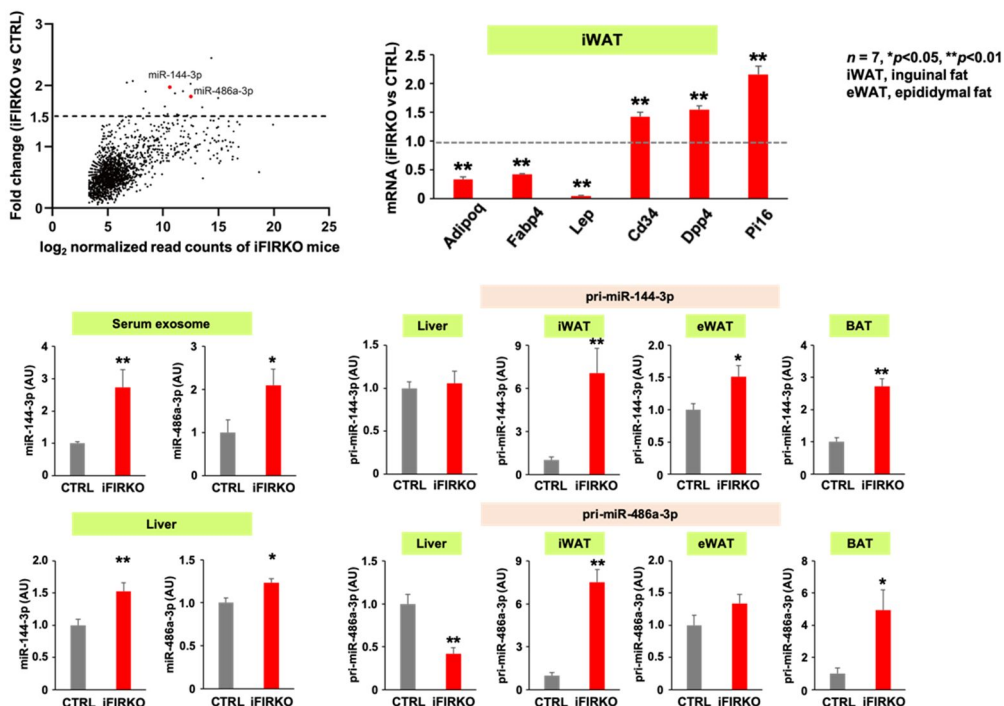
Hepa 1-6 細胞は ATCC より購入し、初代培養肝細胞は野生型マウスから単離した。miR-144-3p、miR-486a-3p の miRNA mimic、Txnip の siRNA は Thermo Fisher Scientific より購入し、Txnip 3'-UTR を組み入れた pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector は Promega より購入した。トランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。初代培養肝細胞に添加するエクソソームはマウスの血清から超遠心 (100,000g, 70 分) を 2 回行い回収し、NanoSight LM10 で粒子数を計測した。

4. 研究成果

(1) iFIRKO マウスの血中エクソソームと肝臓で増加する miRNA

iFIRKO (Adipoq-Cre/ERT2 Tg^{-/-}; IR flox/flox) マウスと対照 (CTRL, Adipoq-Cre/ERT2^{-/-}; IR flox/flox) マウスにタモキシフェンを 5 日間投与し、血中 Exo-miRNA を網羅的に解析すると、iFIRKO マウスで 19 種類の miRNA が対照マウスに比して 1.5 倍以上に増加していた。このうち定量 PCR で検証できた miRNA は 4 種類で、そのうち miR-144-3p、miR-486a-3p は iFIRKO マウスの肝臓でも有意に増加していた。

iFIRKO マウスの皮下脂肪では *Cd34*、*Dpp4*、*Pi16* の遺伝子発現の上昇を認め、既報に矛盾せず間葉系前駆細胞群が増加していると考えられた。miR-144-3p と miR-486a-3p の初期転写産物 (pri-miRNA) の発現は、iFIRKO マウスの肝臓で増加しておらず脂肪組織で増加していたことから、肝臓で増加した miR-144-3p、miR-486a-3p はエクソソームを介して脂肪組織から肝臓に送達された可能性が示唆された。

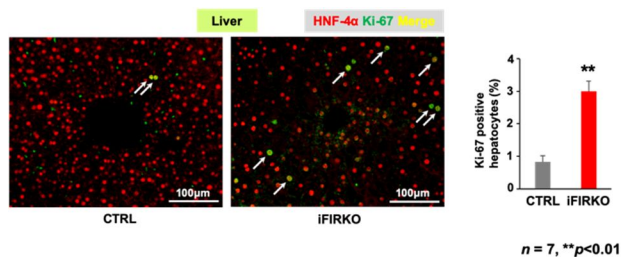
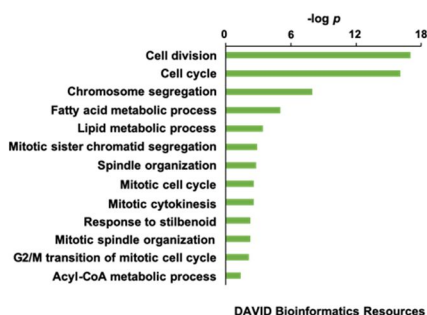


(2) miR-144-3p、miR-486a-3p の肝細胞増殖作用

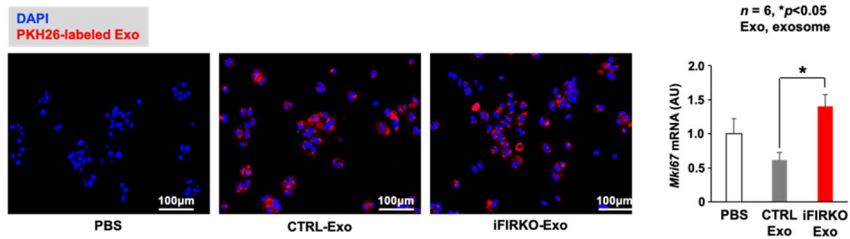
肝臓の mRNA を網羅的に解析すると、iFIRKO マウスで 635 遺伝子の発現が対照マウスに比して 1.5 倍以上に増加していた。これらの遺伝子を GO 解析すると細胞周期に関連する遺伝子が多く含まれており、肝臓を HNF-4 α 、Ki-67 で二重染色すると iFIRKO マウスでは肝細胞の増殖が促進されていることが確認された。

初代培養肝細胞に iFIRKO マウスの血中から回収したエクソソームを添加すると対照マウスの血中から回収したエクソソームを添加したときに比して *Mki-67* の遺伝子発現が上昇した。また、miR-144-3p、miR-486a-3p の miRNA mimic を初代培養肝細胞にトランスフェクションすると細胞増殖が促進された。

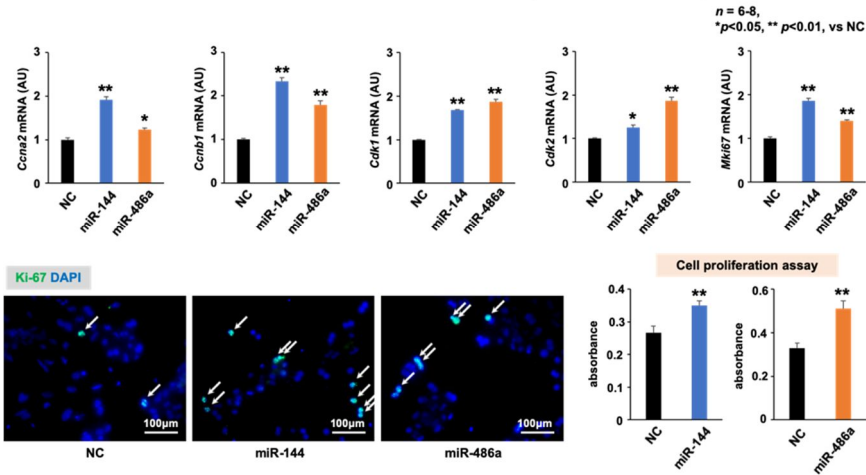
GO analysis of up-regulated (iFIRKO vs CTRL, FC>1.5) genes



Treatment of serum exosome to primary cultured hepatocytes

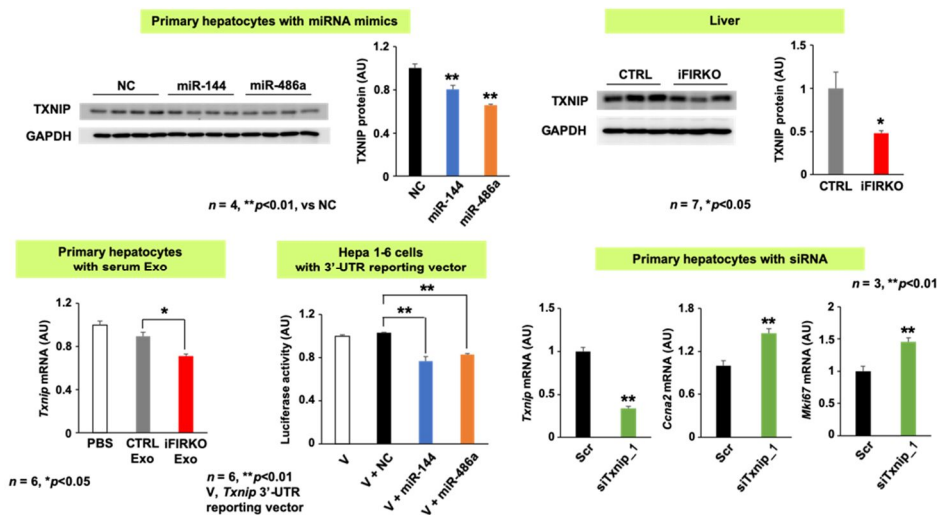


Transfection of miRNA mimics into primary cultured hepatocytes



(3) miR-144-3p、miR-486a-3p の標的遺伝子

データベース情報から *Txnip* が miR-144-3p、miR-486a-3p に共通して標的遺伝子と予測された。実際に、miR-144-3p、miR-486a-3p の miRNA mimic をトランスフェクションした初代培養肝細胞、iFIRKO マウスの肝臓で *TXNIP* の発現が低下しており、iFIRKO マウスの血中エクソソームを添加した初代培養肝細胞でも *Txnip* の発現低下が確認された。加えて、*Txnip* 3'-UTR を組み入れたレポーターベクターとともに miRNA mimic を初代培養肝細胞にトランスフェクションすると、miR-144-3p、miR-486a-3p とともにルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制することから *Txnip* がこれらの miRNA の標的遺伝子と考えられた。また、siRNA を用いて初代培養肝細胞で *Txnip* をノックダウンすると *Mki-67* の遺伝子発現が上昇した。Txnip 欠損マウスでは肝傷害や肝部分切除後の肝再生が促進されること、ヒトの NASH の肝臓では *TXNIP* の発現が上昇していることが報告されていることから、miR-144-3p、miR-486a-3p は肝硬変に対して再生治療効果をもたらす可能性が考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niitsu Yoshihiro, Komiya Chikara, Takeuchi Akira, Hara Kazunari, Horino Masato, Aoki Jun, Okazaki Rei, Murakami Masanori, Tsujimoto Kazutaka, Ikeda Kenji, Yamada Tetsuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Increased serum extracellular vesicle miR-144-3p and miR-486a-3p in a mouse model of adipose tissue regeneration promote hepatocyte proliferation by targeting Txnip	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0284989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小宮 力, 新津 吉博, 竹内 彬, 原 一成, 堀野 雅人, 村上 正憲, 辻本 和峰, 池田 賢司, 山田 哲也
2. 発表標題 脂肪組織に由来するエクソソームmiRNAを介した肝細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新津 吉博, 小宮 力, 竹内 彬, 原 一成, 堀野 雅人, 村上 正憲, 辻本 和峰, 池田 賢司, 山田 哲也
2. 発表標題 脂肪組織由来エクソソームmiRNAの肝細胞増殖に与える影響の検討
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新津吉博、小宮力、原一成、堀野雅人、竹内彬、村上正憲、辻本和峰、池田賢司、山田哲也
2. 発表標題 脂肪組織に由来するエクソソームmiRNAを介した肝細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第32回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新津吉博、小宮力、原一成、堀野雅人、竹内彬、村上正憲、辻本和峰、池田賢司、山田哲也
2. 発表標題 脂肪組織に由来するエクソソームmiRNAを介した肝細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第25回アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2022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