

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700938

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームモデルにおける機能RNAの分子メカニズムの検討

研究課題名(英文)The role of microRNA in Metabolic syndrome model

研究代表者

安井 菜穂美(YASUI, Naomi)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：70399145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではメタボリックシンドロームの進展予防・治療に向けて、遺伝子発現制御を担っているマイクロRNA(miRNA)のメタボリックシンドローム病態への関与について調べた。

肥満・高血糖・脂質代謝異常に加え、腎障害が認められるSHRSP.ZFでは、非肥満対照動物Leanと比較して、miR-29aとmiR-378における有意な発現低下が認められ、とくに腎繊維化過程に関与しているmiRNA発現が変化していることが明らかとなった。また、肥満で増加する脂肪組織におけるmiRNA発現変化についても検討したが、脂肪組織においてはmiRNAよりも他の因子、下流の蛋白発現等の影響が大きい可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is recently linked to chronic kidney disease, but the responsible molecular mechanisms have not been fully elucidated. As various biological processes are known to be regulated by microRNAs(miRNAs), or small non-coding RNAs, we decided to investigate whether disorders of miRNAs system were involved in the pathophysiological mechanisms of renal disease in metabolic syndrome.

SHRSP.ZF showed several metabolic disorders similar to metabolic syndrome patients as well as increased urinary excretion of albumin. We identified 18 and 26 miRNAs were up- and downregulated in SHRSP.ZF compared with lean littermates. The expressions of miR-29a and miR-378 in the kidney were significantly decreased in SHRSP.ZF. Moreover, miR-29a was associated with development and progression of renal injury in SHRSP.ZF, and increased serum prolylase activity leads to the up-regulation of TGF-beta in this model.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：メタボリックシンドローム miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の変化により、我が国では脂肪摂取量が著しく増加し、それに伴って内臓肥満を基盤とした各種生活習慣病リスク集積によるメタボリックシンドロームが急増している。この状況は世界的規模で問題となっており、メタボリックシンドロームにおける病態発症および進展機構の解明が急がれる。

マイクロ RNA(miRNA)は、蛋白情報を持たない小分子 RNA であり、遺伝子転写後の発現制御を行っていることから機能 RNA とも呼ばれている。生活習慣病など病気の発症と進展の新たな展開として、様々な遺伝子の活性化や抑制遺伝子の不活性化が蓄積する、エピジェネティックな関与が示唆されているが、DNA メチル化やヒストン修飾の異常は miRNA により制御されることが明らかとなりつつある。

また、脂肪細胞の増殖・分化や糖代謝において機能調節に関わる miRNA が報告されているが (*Diabetes*, 2009:58, *Obesity*, 2010:11)、癌などの疾患に比べて生活習慣病に關与する miRNA の情報は未だ解析不十分である。

よって、肥満・糖代謝に関する miRNA の情報を基に、メタボリックシンドロームモデル動物における解析は、生活習慣病発症・進展機序を解明する上で新たな知見を見出す可能性が期待できる。

2. 研究の目的

これまでの研究の多くは、内分泌の生理活性、遺伝子・蛋白発現機構に焦点を当てられてきたが、本研究ではその上流に位置するであろう miRNA に注目した。

本研究では、メタボリックシンドローム病態における miRNA 発現動向の検討を行うとともに、腎障害など炎症臓器においても同様に検討し、メタボリックシンドロームおよびその病態進展における miRNA の関与を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

生活習慣病の発症・進展における miRNA の関与を調べるため、肥満、高血圧を合併するメタボリックシンドロームモデル動物 SHRSP.ZF ラットを用いた。

SHRSP.ZF ラットは、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルラット SHRSP の遺伝背景に遺伝性肥満 Zucker fatty ラットのレプチン受容体変異遺伝子を有するコンジェニックラットであり、若週齢より内臓脂肪蓄積型肥満・高血圧に加え、インスリン抵抗性・脂質代謝異常を呈し、ヒトメタボリックシンドロームと同様な病態が観察される。

このモデルは加齢に伴って病態が進展することから、使用週齢によって miRNA の組織および時期特異性の検討が可能になる。本研

究では、肥満および腎障害が認められる 12 週齢において、腎臓および脂肪組織の RNA を抽出し、miRNA のプロファイリング解析 (miRCURY LNA™ Array、エキシコン社) をおこなった。

また、SHRSP.ZF ラットの 12 週齢におけるメタボリックシンドローム病態について、その対照動物である非肥満同腹子 (Lean) と比較し、病態進展における肥満の影響について比較検討をおこなった。

SHRSP.ZF ラットと Lean で発現に有意な差が認められた miRNA について追加試験を行い、メタボリックシンドロームにおける各 miRNA の関与について調べた。

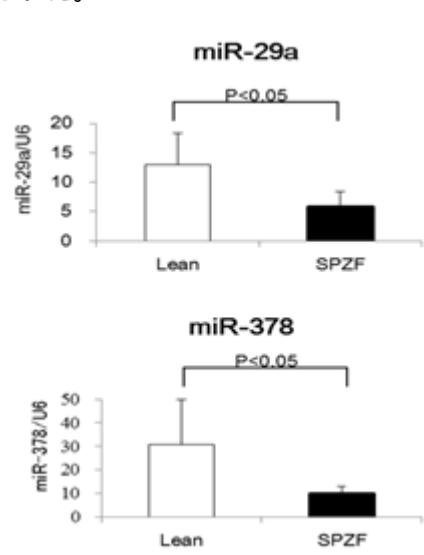
4. 研究成果

(1)メタボリックシンドロームの腎障害への影響

SHRSP.ZF は加齢に伴い、肥満・高血圧を発症する。一方、Lean は SHRSP 由来の高血圧を呈し、加齢に伴いその病態は進展する。12 週齢 SHRSP.ZF では、Lean と比較して肥満・高血糖・脂質代謝異常を発症していた。SHRSP.ZF における尿中アルブミン及び総タンパク排泄量は、同程度の高血圧を呈する Lean に比較して有意に増加しており、SHRSP.ZF で認められる腎障害増悪化には肥満が関与していることが示唆された。

(2)SHRSP.ZF の腎臓における miRNA プロファイリング解析

肥満による腎障害の増悪化が認められた 12 週齢 SHRSP.ZF の腎臓および副睾丸周囲脂肪組織から miRNA を抽出し、発現プロファイリング解析を行った。SHRSP.ZF で有意に変動がみられた miRNA は腎臓で 44 種類であり、機能や関連遺伝子が明らかになっている miRNA は少なかった。それら候補 miRNA のうち、SHRSP.ZF ラットと Lean で発現量が大きく異なるものを抽出し、リアルタイム PCR 法にて発現量を確認した。腎臓においては miR-29a と miR-378 における有意な発現低下が認められた。



(3)SHRSP.ZF における腎障害における miRNA 発現の関与

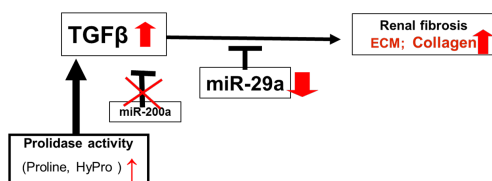
腎障害で認められる組織変化として腎臓の線維化があり、コラーゲン、細胞外マトリックスが過剰に蓄積することがあげられる。Wang, Bらは、TGF- β 1を介した近位尿細管細胞におけるコラーゲンの蓄積にmiR-29aの関与を報告しており、SHRSP.ZFの腎臓において、miR-29aの発現量はSHRSP.ZFラットで有意に抑制されていた。

腎組織の繊維化過程において、miR-29aはコラーゲン蓄積を助長するTGF β 1を抑制することが報告されている。SHRSP.ZFラットでは、TGF- β 1およびその受容体の遺伝子発現亢進、I型コラーゲンの増加による線維化の進展が確認され、miR-29a発現量は抑制されていた。さらに、SHRSP.ZFラットでは血中プロリダーゼ活性がLeanと比較して有意な増加が認められた。

細胞外マトリックスで蓄積されるコラーゲン合成は、プロリダーゼ活性の増加と相関がみられ、プロリダーゼ活性の増加により、TGF β 1およびTGF β 受容体1の発現が増加することが明らかとなっている(*EJ Pharmacol.* 2010)。また、miR-200aはTGF β 1の発現を抑制することが報告されているが、SHRSP.ZFラットの腎臓において発現変化は認められなかった。

以上のことから、SHRSP.ZFラットの腎組織繊維化過程において、これまでの報告とは異なり、プロリダーゼ活性増加によるTGF β 1発現上昇機構が考えられ、miR-29aの発現抑制により繊維化の進展が助長されていることが示唆された。

Scheme of miR-29 and its potential role in renal fibrosis in SHRSP.ZF.



(4) 脂肪組織における miRNA 発現

脂肪細胞から分泌されるアディポカインは肥満における炎症反応、肥満関連病態の進展に關与している可能性が考えられている。

SHRSP.ZFラットはLeanと比較して、血中レプチン、レジスチン、MCP-1、アンジオテンシノーゲン濃度が高値であり、副睾丸周囲、腸間膜周囲、腎周囲脂肪におけるアディポカイン遺伝子発現量では、中でも腎周囲脂肪におけるMCP-1発現量の増加が顕著であった。腎周囲脂肪におけるMCP-1発現亢進は、腎周囲脂肪を介した腎臓の炎症を引き起こすことが考えられる。

そこで脂肪組織におけるmiRNA発現をマイクロアレイ法により測定したところ、脂肪組

織でLeanと差が認められたmiRNAはわずか4種類であり、機能が明らかになっているものは少なかったことから、脂肪組織における炎症反応は、miRNAよりも他の因子、下流の蛋白発現等の影響が大きいことが考えられた。

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)

Yasui N, Negishi H, Ikeda K, et al.(他 7名)

Differential Expression of MicroRNAs in the Kidneys of SHRSP.Z-*Lep^{fa}*/IzmDmcr Rats, a metabolic syndrome model. 査読無 *Physiological Research*. 62(2) (2013)

Yasui N, Ikeda K, Negishi H, Nara Y, Yamori Y.

Animal models for metabolic syndrome.

査読無

Nihon Rinsho. 69(1): 358-363 (2011).

[学会発表](計 3 件)

Yasui N, Tsukuma R, Negishi H, Yamori Y, Ikeda K. Development of Renal Injury in SHRSP.ZF at the Age of 12 weeks.

The 16th International SHR Symposium, Cardiovascular Genetics Satellite of ISH.

2014年6月18日、ローマ

津熊梨沙、安井菜穂美、岸本亜野、山村知香、家森幸男、池田克巳。

肥満モデルラットにおける内臓脂肪組織部位別のアディポカインの発現比較。

第36回日本高血圧学会学術総会、2013年10月24-26日、大阪

Yasui N, Nishiyama E, Negishi H, Yamori Y, Ikeda K.

Differential Expression of MicroRNAs in the Kidneys of SHRSP.Z-*Lep^{fa}*/IzmDmcr Rats.

The 15th International SHR Symposium.

2012年9月27-28日、メルボルン

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

武庫川女子大学薬学部健康機能解析学講座ホームページ:

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/research/lab/biology/06.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安井菜穂美 (YASUI Naomi)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：70399145

(2)研究分担者

(3)連携研究者