

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580468

研究課題名(和文) マイクロRNAによるネコ肥満・糖尿病の病態解明とバイオマーカーへの応用

研究課題名(英文) Characterization of feline microRNAs: a potential biomarker for diagnosis of feline diabetes and obesity

研究代表者

佐々木 典康 (SASAKI, NORIYASU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20307979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネコの肥満や糖尿病の病態形成に関与するマイクロRNA(miRNA)を網羅的に検索することを目的として、次世代シーケンサーを用いて脂肪組織および血中エクソソームに含まれるmiRNAの同定を行った。脂肪組織では少なくとも169種類の新規ネコmiRNAが同定され、標的としては血管新生や脂肪分化促進あるいは脂肪分化抑制に働く遺伝子が推定された。

研究成果の概要(英文)：To characterize novel microRNAs (miRNA) related to obesity and diabetes in cats, we identified the feline miRNA expressed in white adipose tissue (WAT) and exosome with next-generation sequencing. In WAT, we identified 169 of novel feline miRNAs that could regulate expression of their target genes including angiogenesis, adipocyte differentiation and inhibition.

研究分野：獣医生化学

キーワード：マイクロRNA ネコ 肥満 糖尿病 エクソソーム バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合し、翻訳抑制により発現調節を行う非コード低分子 RNA であり、様々な動物種に存在する。ヒトではすでに 800 種類以上が同定され、タンパク質の少なくとも 1/3 以上が miRNA による発現制御を受けているとされる。この miRNA は遺伝子発現を制御するため、発生、分化、代謝調節だけでなく癌を含む多くの疾患との関連性が強く指摘されている。さらに近年では血液中にもエクソソームに内包された miRNA が安定に発現し、他の細胞に移行することで機能調節をしていることが報告されている。特に、この血中 miRNA は新しいバイオマーカーとして注目され癌の超早期診断や転移、予後診断の目的で広く研究が進められている。しかし miRNA と各種病態との関連は未解明な部分が多く、特に肥満や糖尿病といった代謝病と miRNA の関連についての報告は多くない。

獣医学領域を中心に目を向けてみると既にゲノム解析が概ね終了しているウシやイヌでは、マイクロ RNA のデータベースである miRbase に登録済みの miRNA も数多く存在する。しかしながら、ドラフトゲノムの解析が終了しているにも関わらずネコ miRNA はデータベースに登録がされておらず、関連論文も皆無である。これらのことから、獣医学領域、特に小動物臨床領域で重要なネコの miRNA に関する研究は大きく立ち遅れている状況であることがわかる。

代表者はこれまでに、ネコ脂肪組織に発現する miRNA を一部同定し、それらのいくつかは糖尿病ネコの血中で増加することを見出している。加えてこの miRNA の予想される標的遺伝子はインスリン感受性に関わる因子である。これはネコでは糖尿病で特定の血中 miRNA が増加し、糖尿病の病態形成に関与している可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

(1) miRNA 自体は 20~21 ヌクレオチド程度と非常に短い配列のため、動物種間を越えて保存されていることも多いが、ネコに関してはデータベースや論文などの報告が皆無であるため、機能解析を行う前にネコ miRNA を新規同定する必要がある。そこで肥満や糖尿病で中心的な働きをする組織である脂肪組織で発現する miRNA をネコで網羅的に解析し、新規ネコ miRNA を同定することを第 1 の目的とする。

(2) 肥満や糖尿病における miRNA の分子病態形成機序を解明するために、脂肪組織に発現する miRNA のうち代謝関連遺伝子の発現や機能に影響を与える分子種をデータベース上で検索することを第 2 の目的とする。

(3) 診断や病態把握のバイオマーカーとして利用するために、検査が容易である血中 miRNA の解析を行うことを第 3 の目的とする。ネコ血中 miRNA を網羅的に解析し、肥満・糖尿病などの各種代謝疾患診断の新たなバイオマーカーになり得るかの可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪組織に発現する miRNA の網羅的解析：健常な成雌ネコ (雑種) の後腹膜脂肪組織から RNA を抽出しライブラリーを作成した。逆転写・PCR 増幅後に電気泳動を行い 22~30 塩基に相当する領域を切り出し Illumina HiSeq2000 による Paired End 解析を実施した。17 塩基以上の配列を選択後、ネコゲノム (Felis\_catus\_6.2) へのマッピングを行い、20 か所以下のユニークマップのみを相同性検索に用いた。既知 miRNA との相同検索はこのユニークマップデータをクエリー配列として、miRbase 上の既知 miRNA 配列 (release19) と BLASTN による相同検索を実施した。

(2) 血中エクソソームに存在する miRNA の網羅的解析：ネコの血中 miRNA を同定するとともに、血糖値の変動との比較を行う目的で、摂食後の時間変化による血中 miRNA の変動を網羅的に比較検討した。1日1回 (8:00am) の給餌で飼育している健常な雄ネコ (5 匹) を用い時間経過ともなう変動を解析した。給餌 1 時間前 (7:00am)、給餌 1 時間後 (9:00am)、給餌 12 時間後 (8:00pm)、給餌 23 時間後 (7:00am) の 4 点で頸静脈より採血を行い、血清を採取した。各個体から得られた血清 1mL をプールし、総量 5mL のプール血清を作成した。このプール血清に含まれるエクソソームを分離し、RNA 抽出に利用した。エクソソームに含まれる RNA は品質検査、ライブラリー作成の後、Illumina HiSeq2000 で解析 (50bp、シングルリード) し、ネコドラフトゲノム (Felis\_catus\_6.2) にマッピングした。18~25 塩基長の配列を百万リード当たりの発現量に換算して、各採血時点での発現量比較を行った。既存の他動物種の miRNA との相同性検索は miRbase で行った。

## 4. 研究成果

健常な成雌ネコの後腹膜脂肪組織から採取した RNA を次世代型シーケンサーで網羅的に解析し、データベース上の他動物種の既存 miRNA と相同性検索を実施した。配列の重複等を除外し、確実にネコでの新規 miRNA と断定できる 169 種類の miRNA を同定した。ネコ脂肪組織で最も発現の高い miRNA は miR-10b であり、ついで miR-143 であった。他の研究者の報告によるブタ脂肪組織での

miRNA 発現パターンと比較したところ、発現の多い40種類のうち異なっていたのは12種類だけであり、後は発現量の差異はあるもののほぼ同じであった(表1)。miR-10bは脂肪細胞分化への関連が報告されていないが、標的遺伝子の一つがE-カドヘリンであり脂肪組織内の血管新生に参与している可能性が示唆された。また、脂肪分化を促進するmiRNAと抑制するmiRNAの両者の発現が見られたが、これは脂肪組織を解析に用いたため、様々なステージの脂肪細胞が混在したためと考えられる。

表1: ネコ脂肪組織に発現するmiRNA種

ネコ脂肪組織で発現の多いmiRNA(Top40)

Annotated miRNAs	Read number	Annotated miRNAs	Read number	Annotated miRNAs	Read number	Annotated miRNAs	Read number
miR-10b	1463556	let-7f	66079	miR-186-5p	19857	miR-451a	8312
miR-143	722597	miR-181a-5p	54119	miR-151-5p	19438	miR-98	6648
miR-148a-3p	492942	let-7a	48953	miR-30e-5p	18749	miR-30c	6537
miR-10a-5p	358652	miR-378a	40602	miR-21	17836	miR-378c	6422
miR-22-3p	337879	miR-486	39799	miR-151-3p	17030	miR-30b	6272
miR-26a	272572	miR-30a-5p	38392	let-7g-5p	15785	miR-125b-5p	6219
miR-126-5p	179272	miR-30d-5p	29892	miR-26b	14866	miR-103	5883
miR-27b-3p	158979	miR-16-5p	23022	miR-199-3p	12644	miR-125a-5p	5585
miR-378a	154459	miR-92a	22882	miR-28-3p	9818	miR-25	4499
miR-191-5p	67451	let-7i-5p	20804	miR-126-3p	9668	let-7b	4367

Ref: Guoxi Li et al. MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by solexa sequencing. (2011) J.Cell. Biochem. 112, 1318-1328

バイオマーカーへの応用するために血中に発現するmiRNAも同様に次世代型シーケンサーで網羅的に解析した。血糖値の変動との関連を見るために、食直後から空腹時までの経時間的な血液試料を用いた変動の解析を実施した。5匹からのプール血清を用いてエクソソーム中のmiRNAを解析したところ、どの時点でも上位の発現miRNA種はほぼ同じであった。空腹時に発現が多いmiRNA種、あるいは食直後に発現が多いmiRNA種がそれぞれ見出されたが、既存miRNAとの相溶性が低いためネコ特有のmiRNAである可能性も高い。脂肪組織で発現の高かったmiRNAはエクソソーム内には多くは含まれておらず、今後、より詳細な解析が必要であると思われる。

以上より、本研究はネコmiRNAを網羅的に解析・同定した最初の研究であり、得られたmiRNAの情報は本研究の主眼とする肥満・糖尿病研究のみならず他の多くの疾患の病態解明や診断への応用が期待できるものである。また、血中エクソソームに内包されるmiRNAについても初めての網羅的解析を行い、今後の診断的利用への可能性を見出した。

脂肪組織に発現するmiRNAは脂肪分化に参与するmiRNAが多く、今後の機能解析により肥満や糖尿病の病態との関連解明が必要である。

しかし解析したmiRNAのうち、未だに同定ができない配列も多く残っている。より詳細な解析を行うことでネコ特有の新規miRNAが発見できる余地も十分にあり、今後の展開も

十分期待できる。

今回の研究結果よりネコ血中エクソソームに多く含まれるmiRNAが同定されたことで、今後はリアルタイムPCR法あるいはマイクロアレイ法などを用いた、より簡易な検査方法への利用が考えられる。しかしながら、血中のmiRNAには未同定のmiRNA種が多く含まれ、また全身の代謝状態による影響を受けることも予想されるので、より病態や代謝状態の条件を揃えることで特異的な変動を示すmiRNA種を検索することが必要であると思われる。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

佐々木典康

次世代シーケンサーによるネコ白色脂肪組織microRNAの網羅的解析

第156回日本獣医学会学術集会

2013年9月21日

国立大学法人 岐阜大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 典康 (NORIYASU SASAKI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 20307979

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：