

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659351

研究課題名(和文) カロリー制限関連 microRNA : ヒト加齢疾患マーカーとしての可能性

研究課題名(英文) Calorie restriction associated microRNA: Possibility of biomarkers of human aging-dependent diseases

研究代表者

下川 功 (Shimokawa, Isao)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70187475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA (miRNA) は、細胞内において蛋白質翻訳抑制に関与する非コード RNA である。近年、血液中に miRNA が存在することが明らかとなり、新たな miRNA の機能が明らかにされつつある。中でも、個体の栄養状態や老化によって、c-miRNA 発現量が変化するのは興味深い。そこで本研究では、ヒト血漿試料における血液循環型 miRNA (c-miRNA) の機能解析及びヒトバイオマーカーへの応用を試みた。その結果、高血圧及び肥満において有意に発現変動する c-miRNA が存在することが明らかとなった。生活習慣病のバイオマーカーとして応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) belong to a small, non-coding RNA family and regulate the translational process of target messenger RNAs (mRNAs). It is reported that miRNAs circulate throughout a body (as circulating miRNA, c-miRNA), and that some c-miRNA expressions are altered with the physiological condition. We investigated the function of c-miRNAs in human blood plasma and their application as a biomarker. We identified the c-miRNAs associated with hypertension and obesity by using quantitative PCR, which suggested that c-miRNAs might regulate the metabolic state among distant organs. Thus, the identification of c-miRNAs in blood plasma has a high potential use both for diagnosis and for establishing a therapeutic target among lifestyle-related diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老年医学 microRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

miRNA は、標的 mRNA に結合することにより蛋白質の翻訳制御に関与する非コード RNA である。RNA の分子構造の性質上、不安定分子であることが予想される。しかしながら、近年、血液中に安定性を保持して存在していることが明らかとなった。血液循環型 miRNA (circulating miRNA, c-miRNA) の発見。従って、c-miRNA は血液循環を介した、細胞機能の制御・遠隔臓器間の代謝ネットワーク等に関与すると推察されるが、未だ機能は明らかではない。

長らく人類においては、食事制限を適度に行うことは(カロリー制限、CR)、生活習慣病罹患リスクの減少・老化の遅延等に効果的であることが知られていた。近年の研究成果により、CR 効果は、酵母・線虫等の下等生物からマウス・サル・ヒトの高等生物にいたるまで、寿命延長・悪性腫瘍発生リスク減少等を導くことが明らかとなった。主に CR 効果に関与する分子は、インスリン様増殖因子等に関わる、いわゆる主要な栄養代謝シグナル伝達系の転写因子・シグナル伝達分子・受容体群である。我々は、転写因子 FOXO1 は、CR 効果による腫瘍発生リスクの減少に必須な分子であることを示した (Yamaza H et al, 9, 372-382, *Ageing Cell*, 2010)。現在 c-miRNA の詳細な機能は不明である。しかし、血液中に存在していることから、インスリン等の生理活性物質と同様な機能を保持していることが推察されるが、未だ機能は不明である。

これまで我々は、次世代シーケンシング (NGS) を用いて、(1) CR 及び肥満マウスの血漿中には 300 種類以上の Argonaute-2 (Ago2) 結合型 c-miRNA が存在している、(2) 血清中 Ago2-c-miRNA は、栄養状態によって存在量が変化していることを明らかにした。この知見は、Ago2-c-miRNA は、生命恒常性維持への関与のみならず、抗加齢・疾患抑制に関連する CR 及び肥満のバイオマーカーとなり得る事を示唆している。

長崎県離島地区における疫学調査の結果、循環器系疾患の割合は全国的に低いことが示された。逆に老衰の割合が高いことと、肺炎の割合が高いことは、高齢者比率の高い人口構成を反映したものと推測される (前田 隆浩 他、44 巻 1 号、*日本老年学会誌*, 2007)。従って、長崎県離島部では高齢者比率が高く、全国的に進行している高齢化を 10 年程度先取りした人口動態を構築していると予想される。

そこで本研究では、長崎県離島地域・都市地域で行われた疫学調査で蓄積された

ヒト血漿サンプルを用いて、マウスを用いた解析か抽出された CR 及び肥満 Ago2-c-miRNA の発現定量を行い、ヒト疾患における発現動態の特異性検証及びバイオマーカーへ応用を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、実験的 (CR 及び肥満マウス血漿における Ago2-c-miRNA の網羅的解析) 及び疫学的アプローチ (長崎県離島地域における動脈硬化と遺伝子多型解析) によって得られた解析結果を統合することによって、c-miRNA を指標とした老年病や生活習慣病の早期発見を可能とする予防・新規治療法の開発へと展開することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト血漿由来 Ago2-c-miRNA の抽出
ヒト血漿サンプルは、前田等 (研究分担者) によって、長崎県五島市、雲仙市の住民健康診断者を対象とした疫学調査を実施した際に収集された約 1800 名分の血漿・疫学データを利用した (動脈硬化性疾患の有無・動脈硬化指数・BMI・血圧・中性脂肪・コレステロール・喫煙・飲酒習慣歴の基本データ収集済)。上記ヒトサンプルから正常群 (36 検体)・高血圧群 (38 検体)・動脈硬化群 (31 検体)・肥満群 (BMI 値 30 以上、52 検体) に分類した。

その後、抗 Ago2 抗体 (wako) を用いてヒト血漿由来 Ago2-c-miRNA を精製した。

(2) 代謝・老化関連 Ago2-c-miRNA の同定
NGS 解析では、CR 及び肥満特異的 Ago2-c-miRNA 候補が抽出された。そこで、発現変動が顕著もしくは高度に発現している Ago2-c-miRNA の発現定量を、定量 PCR (qPCR) を用いて行った。具体的な実験方法は、上記 (1) で精製したヒト Ago2-c-miRNA を鋳型として cDNA を合成し、SYBR Green 法 qPCR 測定である。cDNA 合成及び PCR プライマーは EXIQON 社製、qPCR 試薬は、EXIQON 社及び TOYOBO 社製を用いた。qPCR 終了後、GraphPad Prism を用いて統計解析を行った。

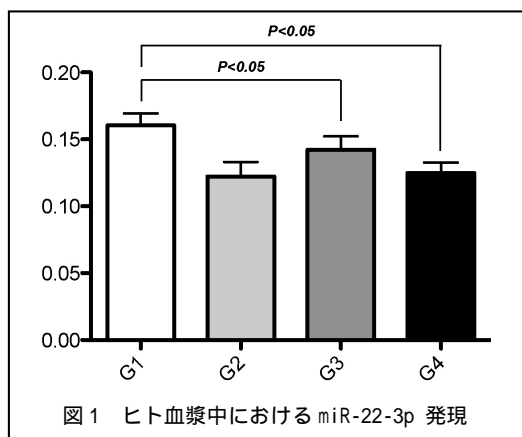
4. 研究成果

(1) cDNA 合成

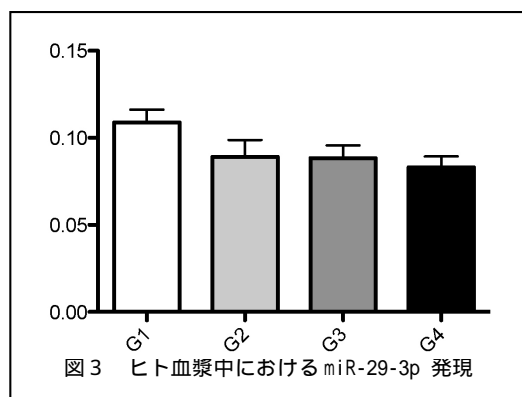
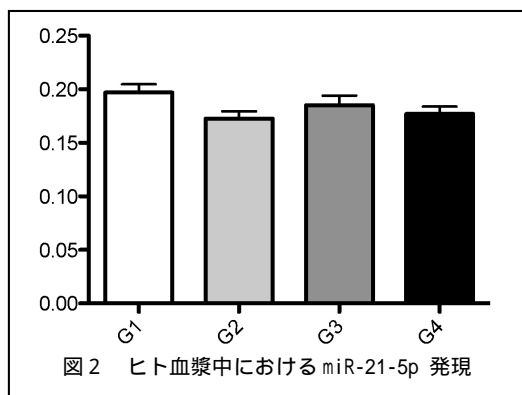
正常群 (G1)、高血圧群 (G2)、動脈硬化群 (G3) 及び肥満群 (G4) から得られた Ago2-c-miRNA プールを用いて cDNA 合成を行った。合成された cDNA は特異的プライマーを用いることにより Ago2-c-miRNA の測定が可能であった。従って、凍結保存されたヒト血漿サンプルに含まれる c-miRNA は、分子構造的安定性を保持していることが明らかとなった。その原因は不明であるが、おそらく、Ago2 を基本とした蛋白質群が c-miRNA の分子構造安定性保持に貢献していると推察される。

(2) Ago2-c-miRNA 発現解析

NGS 解析の結果、miR-21-5p、miR-22-3p、miR-29a-3p、miR-122-5p、miR-451a は、高発現していることが明らかとなっている。そこで、各群における上記 Ago2-c-miRNA 群の qPCR 法を用いた発現解析を行った。その結果、G2 及び G4 における miR-22-3p 発現量は、G1 と比較して有意に減少していることが明らかとなった(図 1)

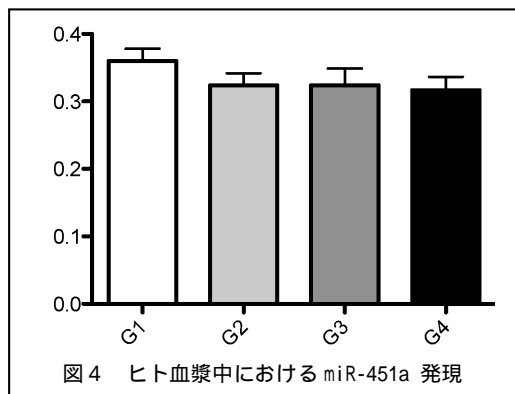


一方、miR-21-5p、miR-29a-3p、miR-451a については、統計学的有意差は認められなかった(図2~4)



miR-122-5p については、高発現量にもかかわらず qPCR 法による測定が不可能であった。今後は、特異的プライマーの変更、デジタル PCR 等の解析系の変更を必要があると考えます。

以上、本研究により(1)ヒトサンプルを用いた Ago2-c-miRNA 精製法の確立、(2) miR-22-3p は、生活習慣病によって発現変動することが明らかとなった。今後は、miR-22-3p 機能解析及びバイオマーカーとしての可能性を追求したいと考えている。



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 12 件)

Hayashi H, Iseki M, Kawabata M, Nonoshita M, Yamamoto H, Shimokawa I, Primary hepatic gastrointestinal stromal tumor showing remarkable myxoid change and hemangiopericytoma-like pattern, Acta Medica Nagasakiensia, 査読有, Vol.58, 2013, 19-24

Hayashi H, Ohtani H, Yamaguchi J, Shimokawa I, A case of intracystic apocrine papillary tumor: Diagnostic pitfalls for malignancy, Pathol Res Pract, 査読有, Vol.209, 2013, 808-811

Park S, Mori R, Shimokawa I, Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction, Mol Cells, 査読有, Vol.35, 2013, 474-480

Chiba T, Dong K, Nishizono S, Shimokawa I, Mechanisms of lifespan extension and preventive effects of calorie restriction on tumor development: Possible link between central neuroendocrine system and peripheral metabolic adaptation, J Phys Fitness Sports Med, 査読有, Vol.2, 2013, 259-266

Matsuo T, Miyata Y, Sagara Y, Higami Y, Tobu S, Matsuo M, Noguchi M, Shimokawa I, Kanetake H, Sakai H, Renoprotective effects of telmisartan after unilateral renal ablation in rats, Int J Nephrol Renovasc, 査読有, Vol.6, 2013, 207-214

Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T,

Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y, Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration, *Age(Dordr)*, 査読有、Vol.35、2013、1143-1156

安井 万里子、坂本 光、新宮 啓太、平 光寿、高藤 康、徳満 純一、鳥山 愛生、永田 祐貴、難波 夏実、道辻 徹、高木 理博、石田 正之、有吉 紅也、林 洋子、下川 功、M5 総合病理 CPC 記録:慢性呼吸不全により死亡した 31 歳男性、*長崎医学会雑誌*、査読有、87 巻、2012、80-86

下川 功、カロリー制限とホルミシス、*日本抗加齢医学会雑誌*、査読有、Vol.8、2012、87-91

林 洋子、井関 充及、川崎 辰彦、下川 功、*Microcystic adnexal carcinoma の一例、診断病理*、査読有、Vol.029、2012、150-154

Otabe S, Wada N, Hahinaga T, Yuan X Shimokawa I, Fukutani T, Tanaka K, Ohki T, Kakino S, Kurita Y, Nakayama H, Tajiri Y, Yamada K Hyperadiponectinemia protects against premature death in metabolic syndrome model mice by inhibiting AKT signaling and chronic inflammation, *J Endocrinol*、査読有、Vol.213、2012、67-76

Chiba T, Tsuchiya T, Mori R, Shimokawa I、*Protein reporter bioassay systems for the phenotypic screening of candidate drugs: a mouse platform for anti-aging drug screening Sensors(Basel)*、査読有、Vol.12、2012、1648-1656

Fang P, Tagliaro ML, Shimokawa I、*Rodent Models to Study the Roles of the GH-IGF-1 Axis in the Aging and Anti-Aging Effects of Calorie Restriction*、*Open Endocrinol J*、査読有、Vol.6、2012、42-48

[学会発表](計 21 件)

Shimokawa I、Longevity genes; an update、The 4th Busan-Nagasaki Joint Symposium on Aging Research、21 February、2014、Busan

Shimokawa I、A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction、Asian Association of Aging Research-2013

Seoul Symposium、8~9 November、2013、Seoul

Shimokawa I、Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3、Asian Aging 2013: Japan-Korea Joint Conference on Genes, Metabolism, and Neurodegeneration、31 October ~ 2 November、2013、Kyoto

Shimokawa I、Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3、2013 Mini-Symposium on Mitochondria and Aging、19 October、2013、Taipei

Shimokawa I、Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction via FoxO1 and FoxO3、Cold Spring Harbor Conferences Asia、9~13 September、2013、China

下川 功、カロリスにおけるニューロペプチド Y の役割、第 13 回日本抗加齢医学会総会、2013 年 6 月 28 日~30 日、横浜

Shimokawa I、A novel role of neuropeptide Y in mammalian aging: Linking calorie restriction to longevity、The 20th World Congress of Gerontology and Geriatrics、23~27 June、2013、Seoul

Shimokawa I、A contrast between roles for FoxO1 and FoxO3 in cancer suppression and lifespan extension by dietary restriction in mice、The 4th East Asia-West Pacific Region Workshop on Aging Society and Elderly Care、22 June、2013、Tokyo

下川 功、カロリー制限の寿命延長、腫瘍抑制効果における Neuropeptide Y の役割、第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日~8 日、札幌

森 亮一、次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場・マリノメッセ福岡(福岡県)

Shimokawa I、Necessity of Neuropeptide Y for the Effect of Dietary Restriction in Mice、The 65th Annual Meeting of Gerontological Society of America、14~18 November、2012、San Diego

Ryoichi Mori、Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice、The 4th EMBO meeting、22~25 September、2012、Nice (France)

Shimokawa I、The necessity of

neuropeptide Y in the effect of dietary restriction in mice、Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging、22~27 October、2012、Tokyo

森 亮一、Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice、第4回日本 RNAi 研究会、2012年8月30日~9月1日、グランドプリンスホテル広島（広島県）

Shimokawa I、Differential regulation of cancer and lifespan by dietary restriction through FoxO1 and FoxO3、International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka-Biology of Aging and Disorders-、24~26 August、2012、Fukuoka

Ryoichi Mori、Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice、International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka - Biology of Aging and Disorders-、24~26 August、2012、Tsukushi Kaikan (Fukuoka)

下川 功、Dbf4 は ATM/ATR によって直接制御されるチェックポイントタンパクとして機能している、第35回日本基礎老化学会、2012年7月26日~27日、千葉

下川 功、「FoxO とカロリー制限」 in シンポジウム「中庸の徳~インスリンシグナルと寿命、疾患」、第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月22日~24日、横浜

Shimokawa I、A potential role for COX6B1, a subunit of mitochondrial respiratory complex IV, in the effect of dietary restriction、2012 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and the 11th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting、14~15 June、2012、Osong
Shimokawa I、A potential role for COX6B1, a subunit of mitochondrial respiratory complex IV, in the effect of dietary restriction、The 4th Hallym-Nagasaki-Exetended Joint Meeting, Aging, Re-generation and Re-construction、28 February、2012、Seoul

②1 Shimokawa I、Modulators of neuropeptide Y; potential dietary restriction mimetics、The 2nd

Pusan-Nagasaki joint Seminar on Aging Research、17 February、2012、Pusan

〔図書〕(計2件)

(1) 千葉 卓哉、下川 功、羊土社、老化寿命のサイエンス 第5章 カロリー制限模倣物、2013、pp.182-189

(2) 下川 功、千葉 卓哉、森 亮一、シーエムシー出版、レスベラトロールの基礎と応用 第7章 サーチュインと老化、寿命、2012、pp.66-75

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70187475

(2) 研究分担者

前田 隆浩 (MAEDA, Takahiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40284674

(3) 連携研究者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：30509310