

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560055

研究課題名(和文)遠隔臓器間代謝機構における血液循環型 microRNA の動作原理の解明

研究課題名(英文)Circulating-miRNA in peripheral blood in metabolic state of between distant organs

研究代表者

森 亮一(MORI, Ryoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：30509310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血液循環型 microRNA(c-miRNA, circulating miRNA)は、全身における協調的な代謝機構に関与していると考えられているが、その分子メカニズムは明らかではない。そこで本研究では、細胞内外における炎症特異的 microRNA(miRNA)の機能解析を、遺伝子改変マウスを用いて行った。その結果 miRNA KO マウスは、生後まもなく死亡した。生存した KO マウスは、外見上変化は認めなかった。しかし、体重増加率の減少と相まって、寿命が短縮した。これらの結果より、炎症特異的 miRNA は、炎症のみならず基本的な生命恒常性維持にも重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Circulating miRNAs (c-miRNAs) is involved in metabolic state of between distant organs, however its functions have not been elucidated. In this study, to clarify functions of intercellular and extracellular inflammation-related miRNA in vivo, I have recently generated miRNA knockout (KO) mice and while they are grossly normal through embryogenesis, they are very vulnerable to live at early postnatal stages. Those individuals that make it through the neonatal period thrive and are fertile as adults and display no gross abnormalities. these results indicated that miRNA is contributed to homeostatic mechanism and other biological phenomenon such as inflammation and tissue repair.

研究分野：実験病理学、老化学、代謝学、免疫学

キーワード：miRNA 代謝 高脂肪 寿命

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現制御機構は、転写→ mRNA 分解→翻訳→蛋白質分解で構成されている。microRNA (miRNA) は、標的 mRNA に作用することにより、蛋白質の翻訳を抑制に関与する非コード RNA (non coding RNA) である。近年の研究により、主要な遺伝子発現制御段階は、転写よりもむしろ翻訳過程が重要であることが示された。従って miRNA の機能解明は、様々な分野において重要性を増している。

miRNA は、通常の遺伝子と同様に核内で転写誘導されて、核外へ移行する。その後、細胞質内で様々な修飾を受けて、最終的に機能を有する成熟型 miRNA に合成される。これまで、細胞質内において機能を発揮する分子として研究がなされてきた。近年の研究により miRNA は、血液をはじめとした様々な体液中にも存在することが明らかとなった。特に血液中に存在する miRNA は、circulating miRNA (c-miRNA) として知られている。これら体液中に存在する miRNA は、エクソソーム内に含有され、機能を発揮していることが明らかとなっている。一方、Argonaute2 (Ago2)、高密度リポ蛋白質 (HDL, high-density lipoprotein) 等の蛋白質群と相互作用する事により、分子的安定性を保持し、miRNA 機能を担うと考えられている。しかしながら、その分子メカニズムは明らかではない。

血液中には、様々なホルモン等が存在し、全身性の協調的な生理現象を担っている。血液中に存在する miRNA は核酸分子にもかかわらず、ホルモン等の生理活性物質と同様に分泌されていることから、ホルモン類に次ぐ遠隔臓器間における新規仲介分子として注目されている。

一方、炎症は、生体防御に必須である反面、様々な病態発症の原因となり得る生体反応である。特に炎症の慢性化は、現代社会の主要疾患である生活習慣病、癌、心筋梗塞、アルツハイマー病、臓器線維化を惹起・増悪させる。脂肪組織等の局所炎症が発端となり、全身性軽度慢性炎症へ波及し、上記病態が発症すると考えられている。従って、個体レベルにおいて局所炎症と全身性慢性炎症の関連性を包括的に解明しなければ、正確な診断基準及び有効な治療法開発は困難である。

そこで本研究では、我々が独自に同定した炎症性 miRNA 群及び生活習慣病関連 miRNA 群の機能解析に着手した。

2. 研究の目的

- (1) 発生、加齢及び老化過程における炎症性 miRNA の機能解明
- (2) ヒト血漿サンプルにおける炎症性 miRNA の発現解析

3. 研究の方法

(1) モデル実験動物の作製

in vivo における miRNA 機能解析を行うため、糖尿病及び HFD (肥満) モデルマウスを確立した。

HFD マウスの作製に関しては、生後 8 週齢の AL (自由摂食群) マウスに高脂肪餌を食餌させた。

1 型糖尿病モデルマウスの作製については、ストレプトゾトシン (STZ) (10 mg/kg) を 2 日毎に計 5 回、腹腔内投与を行った。10 日以降、糖尿病の臨床的症狀 (多飲、多尿) 及び血糖値を確認した (ACCU-CHEK, Roche)。血糖値については、400 mg/dl 以上を糖尿病発症として定義した。

2 型糖尿病モデルマウスの作製については、BKS. Cg-Dock7^{+/+}Lepr^{db}/J マウス (+/db) (チャールスリバー) 及び miRNA KO マウスを交配させて、miRNA KO (分子名は論文投稿準備中であるため公表を控えている) & +/db を作製した。その後、雌雄の miR KO & +/db の交配を行い、miRNA KO & db/db マウスを作製した。2 型糖尿病発症についての基準は、1 型糖尿病モデルマウスの条件に加え、外見的な肥満も考慮した。

(2) 実験動物の表現型解析

miR KO マウスの発生及び出産後の表現型解析を行うため、胎生期 18.5 日 (E18.5)、出産直後及び 6 週目における、生存率を調査した。

また、miR KO マウスの食餌量、体重、寿命を測定した。なお、食餌量及び体重については 4 週間毎に計測した。死に至ったマウスについては、死因解析を行うため臓器を摘出、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、病理学的解析を行った。

(3) ヒト血漿サンプルからの miRNA 精製及び発現定量解析

ヒト血漿サンプルについては、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、抗 Ago2 抗体 (Wako) を用いてヒト血漿由来 Ago2-c-miRNA を精製した。そして、cDNA 合成を行い (Exiqon)、定量 PCR (qPCR) を行った (TOYOBO)。

4. 研究成果

(1) miRNA KO マウスの発生及び出産直後に關する解析結果

胎生期における miRNA KO (miR^{-/-}) マウスは、正常に発生していた (表 1)。しかし、出生直後から miRNA KO マウスは、コントロール (WT) 及びヘテロ欠損 (miR^{+/-}) マウスと比較すると、死に至ることが明らかとなった (表 2、表 3) (図 1)。

| E18.5 embryo | WT | miR ^{+/-} | miR ^{-/-} | Total |
|-------------------|-----|--------------------|--------------------|-------|
| Number of mice | 27 | 63 | 22 | 112 |
| % of total number | 24% | 56% | 20% | 100% |

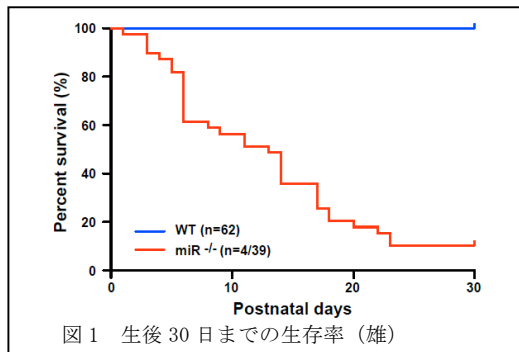
表 1 胎生期 E18.5 における生存割合

| Postnatal 1 day | WT | miR ^{+/-} | miR ^{-/-} | Total |
|-------------------|-----|--------------------|--------------------|-------|
| Number of mice | 32 | 57 | 11 | 100 |
| % of total number | 32% | 57% | 11% | 100% |

表 2 出生直後 1 日目の生存割合

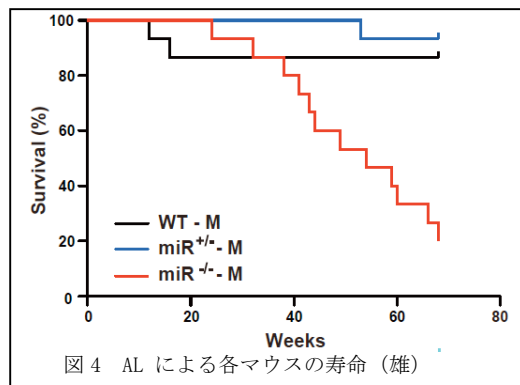
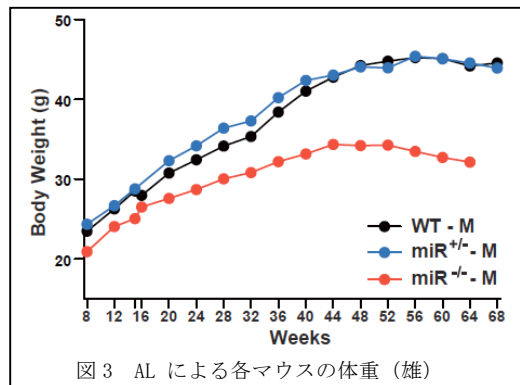
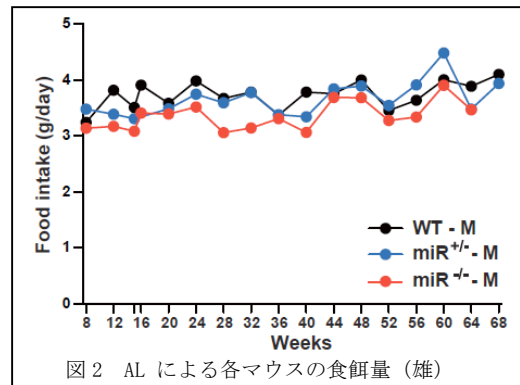
| 6 wks old | WT | miR ^{+/-} | miR ^{-/-} | Total |
|-------------------|-----|--------------------|--------------------|-------|
| Number of mice | 171 | 314 | 97 | 582 |
| % of total number | 29% | 54% | 17% | 100% |

表 3 6 週齢マウスの生存割合

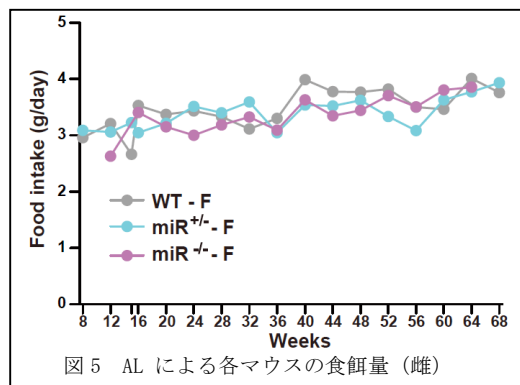


(2) miRNA KO マウス表現型解析

miRNA KO マウスの一部は、生存可能である。生存した miRNA KO マウスの食餌量、体重、寿命を測定した。その結果、雄 miRNA KO マウスは、コントロール及びヘテロ欠損マウスに比べ、AL において食餌量に変化は認められなかった (図 2)。しかし、20 週齢より体重上昇変化の顕著な低下が認められた (図 3)。また、40 週齢頃から寿命の短縮が認められた (図 4)。



一方、雌 miRNA KO マウスは、雄同様に食餌量に変化は認められなかった (図 5)。しかし、44 週齢から体重上昇の低下 (図 6)、40 週齢から寿命の低下が認められた (図 7)。



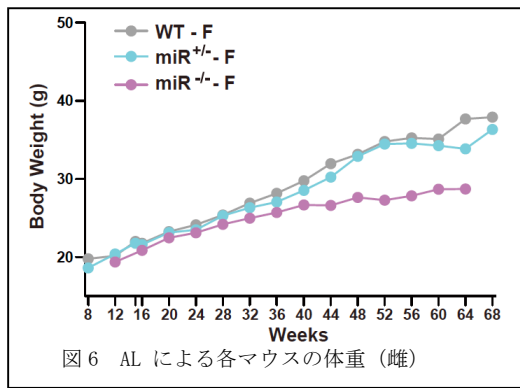


図 6 AL による各マウスの体重 (雌)

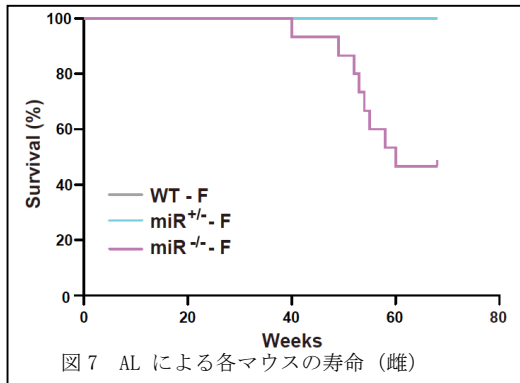


図 7 AL による各マウスの寿命 (雌)

(3)HFD 食餌 miRNA KO マウス表現型解析
AL 群と同様に解析を行った。雄 miRNA KO マウスは、コントロール及びヘテロ欠損マウスに比べ、HFD において食餌量及び体重変動に変化は認められなかった (図 8、図 9)。しかし、40 週齢頃よりヘテロマウス群の寿命短縮が認められるようになった (図 10)。

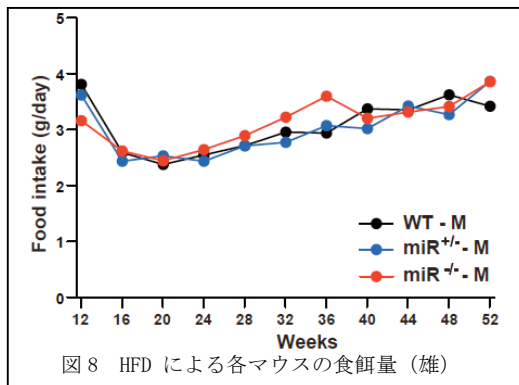


図 8 HFD による各マウスの食餌量 (雄)

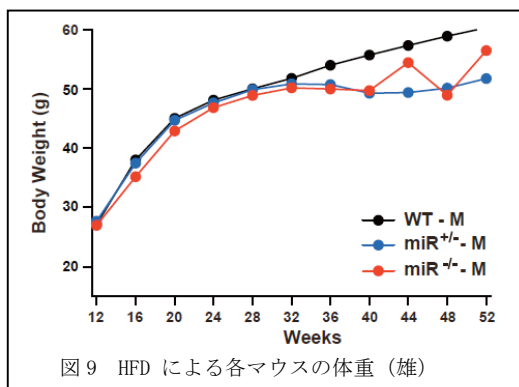


図 9 HFD による各マウスの体重 (雄)

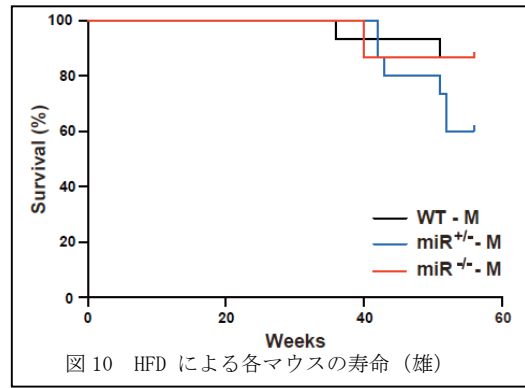


図 10 HFD による各マウスの寿命 (雄)

一方、雌 miRNA KO マウスは、コントロール及びヘテロ欠損マウスに比べ、HFD において食餌量、体重及び寿命に変化は認められなかった (図 11、図 12、図 13)。

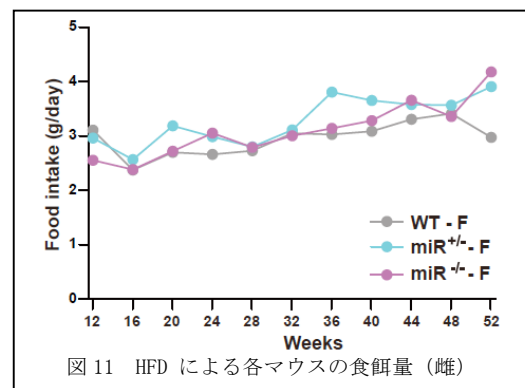


図 11 HFD による各マウスの食餌量 (雌)

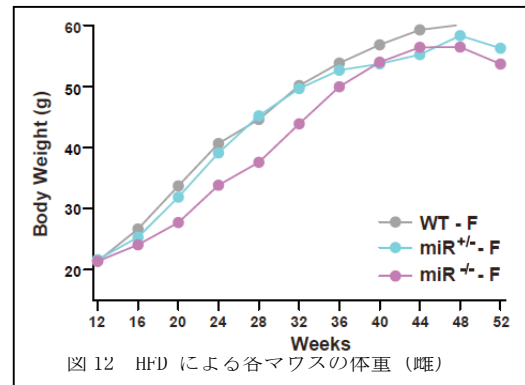


図 12 HFD による各マウスの体重 (雌)

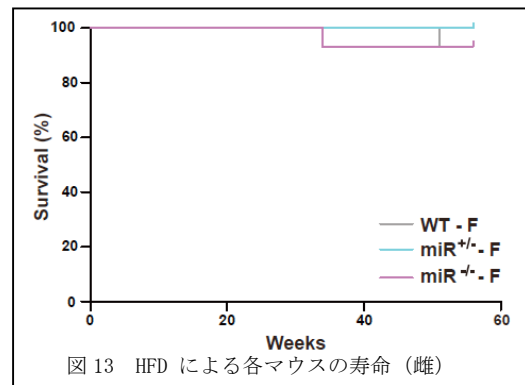


図 13 HFD による各マウスの寿命 (雌)

(4) miRNA KO マウスを用いた糖尿病発症モデルの作製

糖尿病状態における miRNA の機能解析を行うため、1 型糖尿病モデルマウスの作

製を行い、表現型解析を行った。その結果、miRNA KO マウスは、WT と比較して、STZ の感受性に違いを認めた。2 型糖尿病発症モデルの作製については、現在進行中である。

(5) ヒト血漿サンプルを用いた miRNA 発現解析

次世代シーケンシングを用いて、マウス血液中に存在する miRNA の包括的同定及び解析を行っている。その結果を組み入れて、いくつか興味のある miRNA を抽出し、ヒト血漿サンプルにおける発現動態を試みた。その結果、安定した発現定量を捉えることは出来なかった。

(6) 考察

本研究で着目した炎症関連 miRNA は、炎症のみならず、生育過程においても重要な役割を担っていることが明らかとなった。特に、性差及び食の質により多様な性質を示すことは興味深い。現在、表現型解析を継続中である。今後は、炎症のみならず、オートファジーといった代謝に関連する生命現象にも着目し、総合的に解析を行うことを考えている。

一方、マウスで得られた結果をヒトに応用することを目的とし、ヒトサンプルを用いた発現定量解析を逐次行っている。マウスでは高発現であるが、ヒトサンプル中では低発現が理由なのかは不明であるが、qPCR 方による増幅が困難な場合が多々ある。この改善法として、最近注目されているデジタル PCR (dPCR) 法による解析を考えている。今後は、dPCR 法による解析技術の確立を行っていきたくと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, Kim SE, Kawata T, Park S, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Mori R. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice, *Aging Cell* (in press, article first published online; 23 March 2015, DOI: 10.1111/ace1.12340) , 査読有
- ② Kamohara R, Yamaza H, Tsuchiya T, Komatsu T, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Otabe S, Yamada K, Nagayasu T, Shimokawa I, Overexpression of the adiponectin gene mimics the metabolic and stress resistance effects of calorie restriction, but not the anti-tumor effect, *Experimental Gerontology*, 査読有, 64, 46-54, 2015.

- ③ Park S, Fujishita C, Komatsu T, Kim SE, Chiba T, Mori R, Shimokawa I, NPY antagonism reduces adiposity and attenuates age-related imbalance of adipose tissue metabolism, *FASEB Journal*, 査読有, 28, 5337-5348, 2014.
- ④ Mori R, Tanaka K, de Kerckhove M, Okamoto M, Kashiyama K, Tanaka K, Kim SE, Kawata T, Komatsu T, Park S, Ikematsu K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I, Reduced FOXO1 accelerates skin wound healing and attenuates scarring, *American Journal of Pathology*, 査読有, 184, 2465-2479, 2014.
- ⑤ Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I, A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Scientific Reports*, 査読有, 4, 4517, 2014.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Mori R, Identification of the inflammation-related microRNA in murine skin wound healing using next generation sequencing, The 4th Busan-Nagasaki Joint Seminar on Aging Research, 21 February 2014, Pusan (Korea).
- ② 森 亮一、転写因子 FoxO1 の発現抑制は皮膚創傷治癒を促進し癒痕形成を減弱する、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、広島国際会議場 (広島県広島市)
- ③ Mori R, Pathophysiological role of inflammation-related microRNA in murine skin wound healing, FEBS-EMBO Meeting, 30 August - 4 September 2014, Paris (France)
- ④ Mori R, Reduced FOXO1 accelerates skin wound healing and attenuates scarring, EMBO Conferences, The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair, 6 - 10 September 2014, Sant Feliu de Guixols (Spain)
- ⑤ 森 亮一、Identification of inflammation-related miRNAs in skin wound healing、2014 年 11 月 25 日～27 日、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕（計1件）

①下川 功、森 亮一、東京化学同人、老化の生物学（カロリー制限）、2014、pp. 216-235

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

無し

○取得状況（計0件）

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師

研究者番号：23650484

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し