

平成 24 年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学

課題番号：S R 09

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	肝線維化に関連するマイクロ RNA の機能に関する研究	
研究者所属・氏名	研究代表者：工学部 教育推進センター・小川 智弘 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

本研究では、肝臓の星細胞が発現しているマイクロ RNA に着目し、その機能に関する研究を行った。星細胞は肝障害によって活性化状態になり、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生する細胞で、線維化を引き起こす要因となる。我々は、星細胞の活性化に伴い発現が上昇するマイクロ RNA を同定し、その機能について解析を行った。

2. 研究経過及び成果

我々は星細胞の活性化によって発現が変動するマイクロ RNA を数種同定した。その中で、肝臓の線維化と相関して発現が変動するマイクロ RNA に着目し、その機能と線維化との関連について調べた。我々はこれまでに星細胞の活性化に伴って発現が上昇するマイクロ RNA として miR-222 や miR-214 を同定し、発現が減少するマイクロ RNA として miR-143 や miR-195 を同定した (図 1)。マウスの肝線維化モデルを作製し、miR-214 が線維化の進行とともに発現が増加することを突き止めた (図 2)。また、ヒトの C 型肝炎患者においても肝臓の線維化の進行に伴って miR-214 の発現が上昇することもわかった (図 3)。以上の結果から、miR-214 が肝線維化の指標となる線維化マーカーの一つとしての有用性が示された。miR-214 の活性化星細胞での機能は不明であったため、培養星細胞に miR-214 を過剰発現することでの星細胞における遺伝子およびタンパク質の発現変動について調べた。その結果、miR-214 の過剰発現による星細胞での MMP-2 や MMP-9、 α -SMA、TGF- β 1 などの線維化関連遺伝子の発現が増加することがわかった (図 4)。また、miR-214 は転写因子の一つである Twist-1 により発現が調節されていることが報告されており、Twist-1 の遺伝子発現を調べるとマウス培養星細胞の活性化とともに発現が上昇していることが判明した (図 5(a))。また、Twist-1 の発現は肝線維化モデルマウスの肝臓でも線維化の進行とともに発現が上昇することもわかった (図 5(b))。これらのことから、miR-214 は Twist-1 による発現調節を受けており、miR-214 の発現が肝線維化の要因となる線維化関連遺伝子の発現を誘導する可能性が強く示唆された。マイクロ RNA は遺伝子の 3' UTR 領域に結合することで、タンパク質合成を抑制する働きがある。miR-214 の標的遺伝子として MAPK/Erk kinase 3 (MEK3) や transcription factor AP-2 gamma (TFAP2C)、Plenxin-B1、c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1)、phosphatase and tensin homolog (PTEN)、enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) などが知られている。miR-214 の過剰発現による星細胞での MEK3 や TFAP2C、Plenxin-B1、JNK1、PTEN、Ezh2 の遺伝子発現にはほとんど変化が見られなかった。miR-214 の過剰発現による星細胞の増殖や遊走性に対する影響も見られなかった。そのため、活性化星細胞においては標的となる遺伝子が異なっていると予想される。また、miR-214 は活性化星細胞から分泌され、標的細胞が肝細胞などの他の細胞である可能性も考えられた。

図 1. 初代培養マウス肝星細胞における miR-214 の発現

マウス肝星細胞を分離培養し、7日間培養による星細胞の活性化に伴う miR-214 の発現を定量性 PCR で解析した。有意差は、t 検定により行った (* $P < 0.05$)。

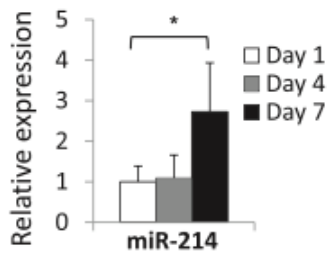


図 2. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 動物モデルにおける miR-214 の発現

メチオニン・コリン欠乏食を 5 週間および 15 週間投与したマウス肝臓の miR-214 の発現を定量性 PCR で解析した。有意差は、t 検定により行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。MCCD : コントロール食 (高脂肪食) 投与マウス肝臓;メチオニン・コリン欠乏食投与マウス肝臓

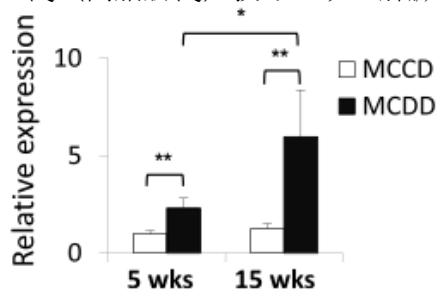


図 3. C 型ウイルス性肝炎患者における miR-214 の発現

C型ウイルス性肝炎患者における線維化ステージごと (F1-F4) のmiR-214の発現を定量性PCRで解析した。各ステージごとにおける有意差検定をJonckheere-Terpstra testに基づき行った。

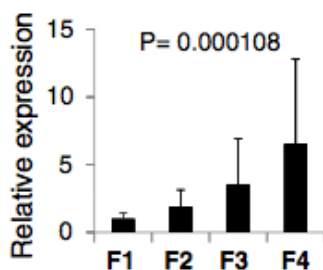


図 4. miR-214 precursor の細胞導入による線維化関連遺伝子の遺伝子発現変化

ヒト培養星細胞に対して miR-214 precursor を細胞導入し、miR-214 を細胞内で強制発現させた。そして、線維化関連遺伝子の発現を定量性 PCR で解析した。有意差は、t 検定により行った (** $P < 0.01$)。

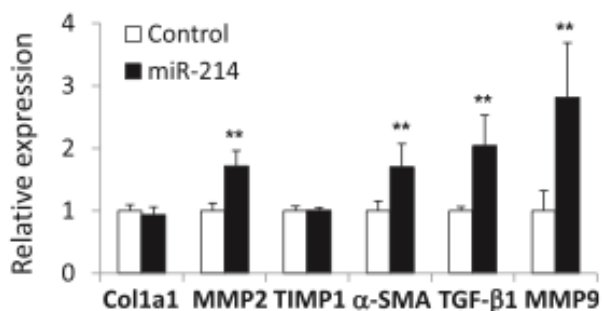
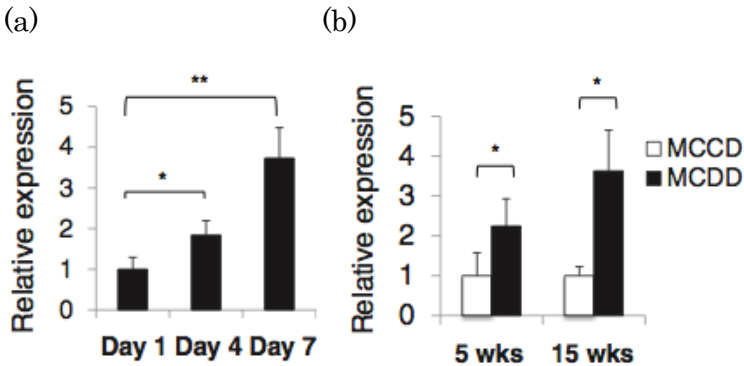


図 5. 初代培養マウス肝星細胞および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 動物モデルにおける miR-214 の発現

(a) マウス肝星細胞を分離培養し、7 日間培養による星細胞の活性化に伴う miR-214 の発現を定量性 PCR で解析した。有意差は、t 検定により行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。 (b) メチオニン・コリン欠乏食を 5 週間および 15 週間投与したマウス肝臓の miR-214 の発現を定量性 PCR で解析した。有意差は、t 検定により行った (* $P < 0.05$)。MCCD : コントロール食 (高脂肪食) 投与マウス肝臓;メチオニン・コリン欠乏食投与マウス肝臓



3. 本研究と関連した今後の研究計画

マイクロ RNA はこれまでの研究により、エクソソームに包まれた状態で細胞外に分泌されることがわかっている。肝星細胞由来のマイクロ RNA が肝細胞や肝がん細胞にどのように作用しているかを今後明らかにする必要がある。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Fibrogenesis and Tissue Repair	雑誌	2012年8月