

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和3年4月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学
職 名 准教授
研究代表者 井上 裕介

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 20009)

1. 共同研究課題名	非アルコール性脂肪性肝炎と肝細胞癌に関与する miR-194/192 の標的遺伝子の同定				
2. 共同研究目的	核内受容体 HNF4αは肝がん抑制因子であり、肝臓特異的 HNF4α欠損マウスは非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を発症する。HNF4αが直接制御する miR-194-5p と miR-192-5p(miR-194/192)はがん化やがんの進展、EMT、エピゲノム制御に関与する標的遺伝子が同定されているため、miR-194/192 は NASH や肝細胞がんの抑制因子であることが推測される。本研究では、網羅的な miR-194/192 の標的遺伝子の同定と機能解析を目的とし、新規の NASH や肝細胞がんの治療薬開発の基盤とする。				
3. 共同研究期間	令和2年4月1日 ～ 令和3年3月31日				
4. 共同研究組織					
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担		
(研究代表者) 井上 裕介	大学院理工学府分子科学部門	准教授	研究の総括		
(分担研究者) 笠野 一郎	大学院理工学府理工学専攻博士後期課程	大学院生	miR-194/192 の標的遺伝子の同定		
岩崎 若菜	大学院理工学府理工学専攻博士前期課程	大学院生	マウスへの AAV9 ベクターの導入と解析		
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏 名	藤谷 与士夫	

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

肝臓における遺伝子発現は HNF4 α 等の転写因子を起点として複雑に制御されている。我々は肝臓特異的HNF4 α 欠損マウス(KOマウス)が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を発症することを明らかにしている。また、HNF4 α は肝細胞がん(HCC)の抑制遺伝子であるため、KOマウスのNASH発症の際はHNF4 α 標的遺伝子の発現変動により、HCCに進行すると予想される。我々はHNF4 α の標的遺伝子として同一プロモーターで制御されるmiR-194とmiR-192(以下、miR-194/192)とその標的遺伝子を複数同定している。これらの標的遺伝子には増殖や EMT を促進する遺伝子が多く含まれるため、HNF4 α の発現低下はmiR-194/192 の発現減少を介してその標的遺伝子を発現増加させ、HCC の形成や進行を引き起こすと推測される。しかし、1つのmiRNAは多くの標的遺伝子が存在するため、miR-194/192 経路の全容解明にはmiR-194/192 の標的遺伝子の網羅的な同定が必要である。申請者は現在までに、101 種類と 69 種類のmiR-194とmiR-192の標的遺伝子候補をスクリーニングしている。

本研究では、肝臓における miR-194/192 の新規標的遺伝子の同定とその機能解析を行い、NASH や HCC 発症に寄与する新規の HNF4 α -miR-194/192 経路を解明することを目的とした。

7. 共同研究の成果

miR-194 の標的遺伝子を網羅的に同定するために、miR-194 を導入したヒト肝がん細胞株 Huh7 で発現低下した 101 種類のうち、HepG2 細胞でも発現低下する遺伝子を 17 種類抽出した。さらに、RIP アッセイにより miR-194 が直接結合する遺伝子の同定を試みた。miR-194 を Huh7 細胞に強制発現させて RIP アッセイを行った結果、12 種類の遺伝子を同定した(同様な実験で miR-192 の標的遺伝子候補は 69 種類から 15 種類に絞り込んだ)。また、これら 12 種類の遺伝子のうち、7 種類の遺伝子は KO マウスで有意に発現が増加していた。そのため、これら 7 種類の遺伝子と、RIP アッセイにおいて著しく濃縮が認められたが、KO マウスにおいて発現が増加傾向にある 1 つの遺伝子を含む 8 種類の遺伝子を miR-194 の新規標的遺伝子候補とした。これらの 8 種類の遺伝子は miR-194 の結合予測部位を有していたため、実際に miR-194 が各標的遺伝子の mRNA に結合し発現抑制を行うかを、レポーターアッセイを用いて解析した。現在までに 5 種類の遺伝子の解析が終了し、その全ての遺伝子において miR-194 が結合することが明らかとなった。

5 種類の新規標的遺伝子の中でも遺伝子 X は、RIP アッセイでの濃縮率が高く、KO マウスでの発現増加が最も高いため、HNF4 α /miR-194 による制御を強く受けていると予測される。遺伝子 X は様々ながん種で発現が増加し、EMT や細胞増殖を促進することが報告されている。データベース解析の結果、遺伝子 X の発現は肝ガン患者で発現増加しており、生存率は遺伝子 X 高発現の患者の方が低いことが明らかとなった。そのため、現在ヒト肝がん細胞株において MTT アッセイ、コロニー形成アッセイ、細胞周期アッセイを行うことで、遺伝子 X が肝がんの悪性化に関与しているかを解析中である。また、アデノ随伴ウイルスを用いた *in vivo* での腫瘍形成変化や転移能の有無なども解析中である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

- 1) 第 19 回生体機能研究会岩崎若菜、2020 年 9 月 19 日、肝臓における HNF4 α /miR-194-5p 経路の新規標的遺伝子の同定
- 2) 第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 4 日、肝臓における HNF4 α /miR-194-5p 経路の新規標的遺伝子の同定

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)電子メールで情報交換を行っている。