The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	MicroRNAによる脂肪細胞分化の制御
Author(s)	村田, 有香
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52325
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　村田　有香　）	
論文題名	MicroRNAによる脂肪細胞分化の制御

論文内容の要旨

【緒言】

MicroRNAは癌，炎症，動脈硬化症などの様々な疾患と関連していることがこれまでに報告されているが，肥満，糖尿病，非アルコール性脂肪肝炎などの代謝性疾患との関連については未だに不明な点が多く，特に脂肪細胞分化におけるmicroRNAの役割については不明な点が多いのが現状である．

我々のこれまでの研究では，非アルコール性脂肪肝炎患者の肝臓から採取した生検組織を用いた検討から，2つのmicroRNAの発現が健常人に比べて明らかに変化していることが認められた．これらのmicroRNAをmiR-XX，miR-YYと呼称し，このmiR-XX，miR-YYによる脂肪細胞の分化・増殖への影響について検討することとした．

【方法】

本研究では，マウス3T3-L1細胞を用いて，成熟脂肪細胞へと分化させる系を使い研究を行った．すなわち，miR-XX，miR-YYをもとにした合成microRNA模倣分子を作製し，これを培養細胞に導入した．成熟脂肪細胞への分化はOil Red O法にて視覚的に観察した．さらに，生成したトリアシルグリセロール（TG）含量を測定することにより，脂肪細胞の分化を定量的に評価した．また，miR-XXの作用メカニズムを検討するため，マウス3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化の過程において，脂肪細胞分化，および脂質代謝に関わる潜在的な標的遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した．すなわち，miR-XXをトランスフェクションしたマウス3T3-L1細胞を回収し，Negative control群とmicroRNA処置群での遺伝子変化を比較検討した．このDNAマイクロアレイを用いた解析により変化した遺伝子群の中から，脂肪細胞分化および脂質代謝に関わる遺伝子として，今回我々はAcyl-CoA thioesterase 2（ACOT2）に着目した．はじめに，ACOT2のマウス3T3-L1細胞での発現を確認するため，ウエスタンブロット法による解析を行った．また，ACOT2遺伝子およびタンパクの発現を抑制するために，ACOT2に特異的なsmall interfereing RNA（siRNA）を作製し，マウス3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化における役割についても検討した．

【結果および考察】

miR-XXおよびNegative controlを20 nMで処置した結果，マウス3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化誘導開始後6日目のOil Red O染色の結果から，Negative control群と比較してmiR-XX処置群で細胞内脂肪蓄積の顕著な増加が認められた．この結果は細胞内TG含量の測定結果によって定量的に確認することができ，Negative control群と比較してmiR-XX処置群でTG含量の統計学上有意な増加が認められた．また，分化誘導後6日目の細胞数を比較したところ，Negative control群とmiR-XX処置群で細胞数に明らかな変化は認められなかった．すなわち，miR-XXは細胞数を変化させることなく，脂肪蓄積を促進していることが明らかになった．これらの結果から，miR-XXはマウス3T3-L1脂肪細胞分化誘導系において，成熟脂肪細胞への分化を促進することが明らかになった．

次に，miR-YYおよびNegative controlを10 nMで処置した結果，miR-YY処置により顕著な脂肪蓄積が認められ，TG含量もNegative control群と比較してmiR-YY処置群でTG含量の統計学上有意な増加が認められた．しかしながら処置後の細胞数は，miR-YY処置群で著しく減少した．これらの結果から，miR-YYは10 nMの濃度において細胞増殖を抑制している可能性があるため，2.5 nMに濃度を減少させて処置を行った．その結果，2.5 nMという低濃度でも，miR-YY処置により顕著な脂肪蓄積が認められ，TG含量もNegative control群と比較してmiR-YY処置群で顕著な増加が認められた．処置後の細胞数は，Negative control群と比較して，miR-YY処置群で有意差はないものの，細胞数の減少が認められた．すなわち，miR-YYはmiR-XXと異なり，脂肪蓄積を促進する一方で，細胞数の減少を引き起こすことが明らかになった．

これらの結果から，マウス3T3-L1細胞へのmiR-XX，あるいはmiR-YYの処置により，マウス3T3-L1細胞から成熟

脂肪細胞への分化が促進されることが明らかになった．しかしながら，miR-YYによる細胞数の減少は非常に強力であるため，今回の実験においては主にmiR-XXによる作用メカニズムについて詳細に検討することとした．

マウス3T3-L1脂肪細胞分化誘導系において，ACOT2特異的siRNAをトランスフェクションし，ACOT2遺伝子発現，およびタンパク発現を抑制した結果，Negative control 群と比較して，ACOT2-siRNA処置群で細胞内脂肪蓄積の顕著な減少が認められた．これらの結果から，ACOT2はマウス3T3-L1脂肪細胞分化誘導系において，成熟脂肪細胞への分化に重要な役割を果たしていることが明らかになった．

以上のことより，miR-XXはACOT2遺伝子の発現を上昇させることにより，3T3-L1細胞の成熟脂肪細胞への分化を促進している可能性が考えられる．

【総括】

脂肪細胞の分化にはmiR-XXをはじめとするmicroRNAを介した分化誘導経路が存在する可能性があり，その中でmiR-XXは脂肪細胞分化を促進することが明らかになった．miR-XXにより発現が調節され，かつ脂肪細胞分化および脂質代謝に関わる潜在的な標的遺伝子の一つとして，ACOT2が存在する可能性が考えられる．今回の研究から，マウス3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化において，miR-XXはACOT2の発現を上昇させて，脂肪細胞の分化を促進している可能性が示された．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　村田　有香　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	山城　隆
	副 査	教授	村上　伸也
	副 査	准教授	波多　賢二
	副 査	講師	久保庭　雅恵

論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス 3T3-L1 脂肪細胞分化誘導系を用いて、脂肪細胞分化における microRNA の影響を明らかにしたものである。その結果、脂肪細胞分化において microRNA を介した分化誘導経路が存在し、そのメカニズムの一つとして ACOT2 の発現を上昇させて脂肪細胞の分化を促進している可能性が示された。

本研究は、ACOT2 を介した microRNA による脂肪細胞分化促進メカニズムの一端を明らかにしたものであり、これらの結果は今後の脂肪組織形成法の確立に応用できる可能性がある。

よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。