

脂肪細胞 3T3-L1 分化の *PPAR $\gamma$*  を中心とした転写ネットワークの解析

水谷隆之      田中正視      田中理英子  
高梨正勝      大野慎一郎      黒田雅彦

東京医科大学分子病理学講座

【要旨】 過食、運動不足および遺伝的要因による過剰な脂肪細胞分化の進行は、肥満ならびに糖尿病の発症を誘導すると考えられている。メタボリック症候群、糖尿病等の治療および創薬標的の探索として、脂肪細胞分化機構の理解は重要であるが依然として不明な点が多い。microRNA (miRNA or miR) は 20 ~ 25 塩基の一本鎖 RNA であり、相補的な配列を持つ標的 mRNA に作用し発現を抑制する。近年、miRNA が発生、分化、また癌をはじめとした各種疾患の発症に深く関与することが明らかになっている。このような背景から我々は、脂肪細胞分化における miRNA とその標的 mRNA の解析を行った。脂肪細胞分化モデルである 3T3-L1 細胞株を利用し、脂肪分化におけるコファクターである転写因子 *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferators-activated receptor gamma) が調節していると考えられる miRNA の同定を行った。マイクロアレイを用いた全 microRNA と *PPAR $\gamma$*  mRNA の時系列プロファイルを相関解析するという新しい方法で試みた。その結果、miR-146b, miR-214, miR-210, miR-199b が *PPAR $\gamma$*  の標的 miRNA である可能性が示唆され、さらにそれら miRNA の制御している mRNA が予測できた。今回の結果から、*PPAR $\gamma$*  によって発現制御される miRNA および、その miRNA に制御される mRNA が予測され、脂肪細胞への分化過程における新たな経路が示された。

## はじめに

21 世紀に入り、ヒトを始め多くの種のゲノムシーケンシングが終わり、ポストゲノム研究としてトランスクリプトームの探求がなされている。その過程で、タンパク質をコードしていない領域から non-coding RNA が大量に発見された<sup>1)2)</sup>。microRNA (以下、miRNA あるいは miR) は、non-coding RNA のひとつで、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの非翻訳型 1 本鎖 RNA であり、他のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する機能を持つ。それぞれの miRNA は、相補的な塩基配列を持つ標的 mRNA に特異的に作用し、その mRNA の分解または翻訳阻害という 2 様式で機能する<sup>3)4)</sup>。この

miRNA と標的の遺伝子との関係性では、seed 配列と呼ばれる miRNA の 5' 末端に存在する配列が重要と言われ、様々な *in silico* 解析で標的遺伝子を推測する研究がなされている<sup>5)6)</sup>。また、逆方向として microRNA も種々の遺伝子によって制御されているため、mRNA と microRNA は相互にその発現を調節していると考えられるが、現在の *in silico* 解析のみで導かれる標的予測結果には多くの偽陽性が含まれることが問題視されている<sup>7)</sup>。

白色脂肪細胞は体内エネルギーの貯蔵、及び各種アディポサイトカインの産生・分泌を行う重要な組織である<sup>8)</sup>。モデル系としてマウス由来の白色脂肪前駆細胞が使われ、脂肪分化の転写因子ネットワークの解明に利用されてきた<sup>8)9)</sup>。それら転写因子の

平成 24 年 5 月 21 日受付、平成 24 年 12 月 11 日受理

キーワード：microRNA、脂肪分化、microarray、3T3-L1、*PPAR $\gamma$*

(別冊請求先：〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学分子病理学講座 黒田 雅彦)

TEL: 03-3351-6141 FAX: 03-3351-6173

中でも核内受容体型転写因子の一種である *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferators-activated receptor gamma) は、15deoxy- $\Delta$ 12,14-プロスタグランジン J2 や酸化 LDL (9-HODE, 13-HODE)、ニトロリノレン酸やチアゾリジン誘導体等をリガンドとし、PPARE (AGGTCA-n-AGGTCA) 配列を認識して脂肪分化関連遺伝子の発現を制御することから、脂肪分化全体のコアファクターと考えられている<sup>10)11)</sup>。

microRNA は、組織や発生期に特異的に発現しており、増殖や分化を調節・制御する重要な役割を果たす。従って、生体機能を理解する上で、microRNA の発現と機能の解析を行うことは非常に有用であるが、脂肪細胞の分化と microRNA との関連は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、脂肪分化のコアファクターである *PPAR $\gamma$*  が制御する microRNA の同定を目的として、マウス由来の脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を用い、マイクロアレイによって網羅的に解析した。また、microRNA と mRNA の発現変動を比較解析することにより、それら下流の microRNA と mRNA との標的予測解析を試みた。

#### 研究材料および方法

##### 細胞培養と分化

3T3-L1 脂肪前駆細胞は (American Type Culture Collection, Manassas, VA)、10% calf serum and penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100  $\mu$ g/ml) 含有 DMEM (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) 下で培養した。脂肪細胞の分化には、Adipogenesis Assay Kit (Chemicon International, Temecula, CA) を用いた。細胞は 0 日目として initiation media (10  $\mu$ g/ml insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone and 0.5  $\mu$ M IBMX in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum) で刺激され、3 日目に progression media (10  $\mu$ g/ml insulin in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum) に培養液を交換、6 日目に maintenance media (DMEM supplemented with 10% fetal calf serum) に交換した。すべての実験を通して細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

##### マイクロアレイ実験

Total RNA は 3T3-L1 細胞から ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を使用し抽出した。抽出した total RNA は Agilent microRNA microarrays Version 1.2 に基づき、100 ng が 567 種類の miRNA の発現解析が可能な Mouse micro-RNA Microarray kit (Agilent

Technologies) でラベル化された。DNA microarray scanner G2505B (Agilent Technologies) を使用しシグナルは計量され、全ての miRNA マイクロアレイのシグナルは feature extraction software (v9.5.1.1) で数値化された。mRNA マイクロアレイは、34,967 遺伝子の発現解析が可能な CodeLink UniSet Mouse 20K I (CodeLink) を使用し、1,000 ng の total RNA は PureLink Labeling Kit でラベル化され、miRNA マイクロアレイと同様に DNA microarray scanner G2505B で計量され、CodeLink Expression Analysis software v4.2.0.27985 を用いて解析された。

##### データ解析

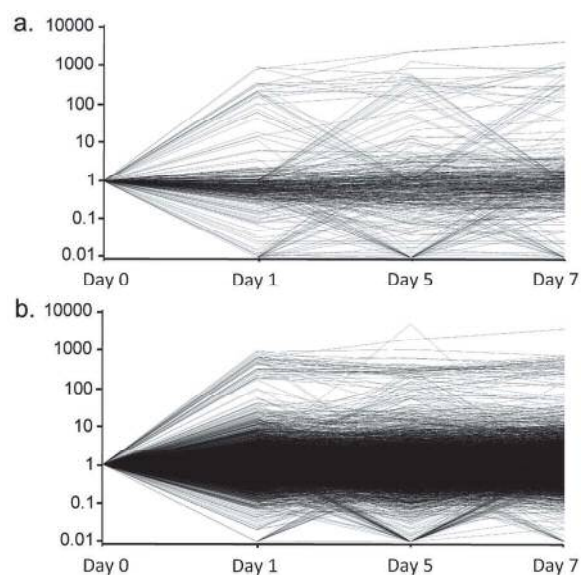
miRNA と mRNA の相関解析を含む全てのデータ解析には、R software (<http://www.r-project.org/>) と Perl programming language (<http://www.perl.org/>) を用いた自作のプログラムを用いた。また、配列解析には miRanda アルゴリズムを用いた<sup>12)</sup>。

##### 定量的 Polymerase chain reaction (PCR) 解析

3T3-L1 細胞 (分化誘導後 Day0, 7) から得られた total RNA より、TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA RT Kit (Life technologies) および microRNA specific stem-loop primer (miR-146b, miR-199b, miR-210, miR-214, miR-16) を用いて逆転写反応を行った。定量 PCR は、TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays (Life technologies) (miR-146b, miR-199b, miR-210, miR-214, miR-16) を用いた。サーマルサイクラーは MX3005P (ストラタジーン社)、解析には MxPro (ストラタジーン社) を使用した。標準化は miR-16 の発現で行った。統計検定に t-検定を用い、有意差水準は 5% とした。

#### 結 果

3T3-L1 を用い、脂肪分化誘導開始後 0, 1, 5, 7 日目の miRNA および mRNA 発現の変動をマイクロアレイにより網羅的に確認した。Day0 と比較して Day3, 5, 7 において 2 倍以上発現が変動したものは、mRNA では各々 19.4, 18.2, 19.1% に対して、miRNA では各々 9.7, 17.3, 14.6% であり、mRNA は microRNA に対して変動したものが多かった (Figure 1)。また、発現プロファイルをクラスター解析してみたところ、microRNA では時間経過とプロファイルの類似性が一致している (クラスター上の Day0, 1 と Day5, 7 がそれぞれ近い) のに対し、mRNA では Day5, 7 が近いことは同じであったが、Day0, 1 に類似性は見られず、Day1 が最も他の時間に対し

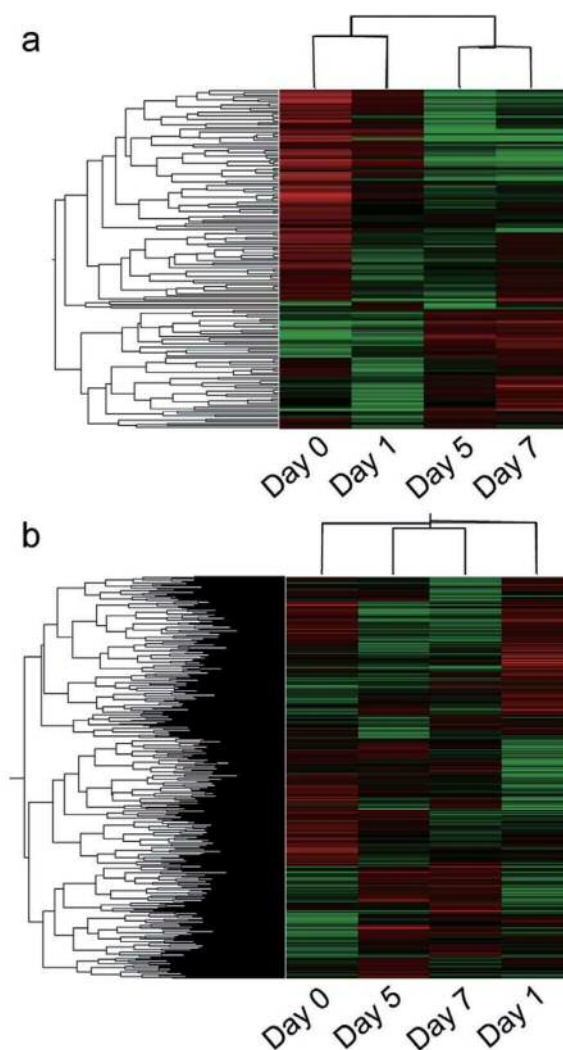


**Fig. 1** Gene expression profiles of 3T3-L1 adipocyte differentiation (a: miRNA, b: mRNA). Vertical bars represent relative expression values of genes. Horizontal bars represent the time from differentiation stimulus.

てプロファイルが離れていた (Figure 2)。

次に、脂肪分化のコアファクターである *PPAR $\gamma$*  の下流 miRNA の解析をするため、Pearson の相関係数を基に相関比較解析モデルを立てた (Figure 3a)。*PPAR $\gamma$*  は転写因子として下流の遺伝子を正に調節すると言われているため、*PPAR $\gamma$*  の発現と正の相関を持っている microRNA を抽出したところ、miR-146b, miR-199b, miR-210, miR-214, miR-322 が高い相関係数を持っていた (Figure 3b)。加えて、*PPAR $\gamma$*  は PPARE と呼ばれるドメインに結合することがわかっており、これら5つの miRNA の遺伝子配列の上流 20 kb で配列解析したところ、miR-322 を除く全ての miRNA が PPARE に似た配列を持っていることがわかった (Table 1)。間接的な標的の可能性が高い miR-322 を除く4つの miRNA (miR-146b, miR-199b, miR-210, miR-214) が脂肪分化により発現亢進することを確かめるために、マイクロアレイと比較してより定量精度の高い定量的 PCR (TaqMan miRNA assay) を用いて確認実験を行った (Figure 4)。脂肪分化誘導7日目の 3T3-L1 の total RNA サンプルを用いて、4つの miRNA の発現解析を行った結果、4つの miRNA の全てが Day 7 で発現亢進しており、特に miR-146b, miR-214 の2つは有意であった (Figure 4,  $p < 0.05$ )。

さらにこれら2つの miRNA の下流を探索するた

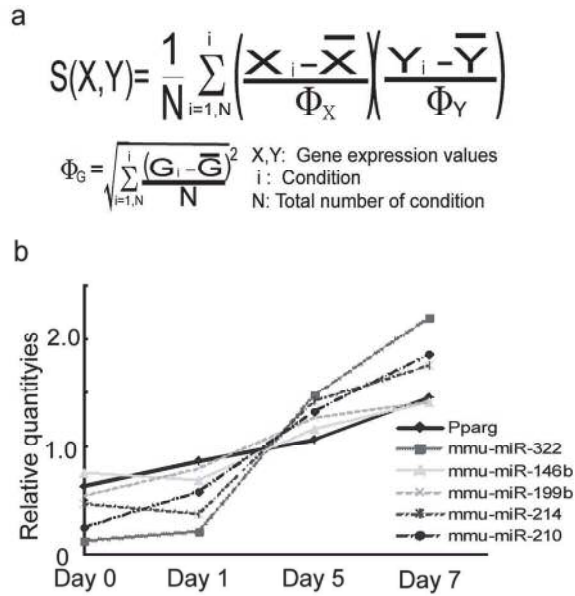


**Fig. 2** Clustered heatmaps of gene expression profiles of 3T3-L1 adipocyte differentiation (a: miRNA, b: mRNA) according to their expression values. The upper tree represents the cluster of samples and the left tree represents the cluster of genes. Green bars reflect downregulated genes and red bars upregulated genes.

め、配列解析で標的遺伝子として候補に上がっているもののうち、miRNA の発現に逆相関している mRNA を調べた。結果、miR-146b は9個、miR-214 は14個の標的遺伝子を持つことがわかった (Table 2)。

## 考 察

今回の実験では、3T3-L1 を用いた脂肪分化誘導開始後0, 1, 5, 7日目の miRNA および mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにより網羅的に確認したところ、mRNA は明らかに microRNA に対して変動したものが多く、microRNA では時間経過と



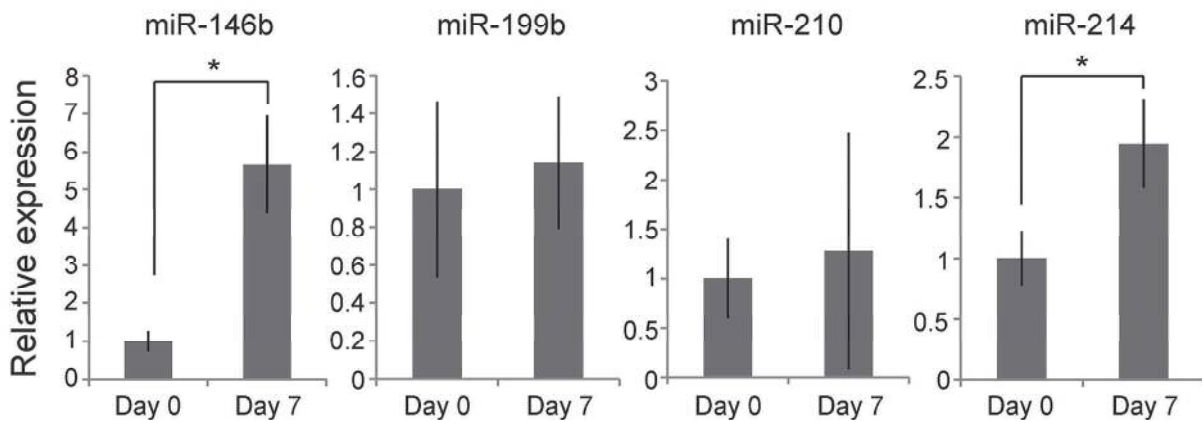
**Fig. 3** a) The numerical formula for correlation analysis. “S” means correlation coefficient ( $-1 < S < 1$ ). b) Screening results of correlation analysis to find the downstream miRNAs of *PPARγ*. The vertical bar represents the expression values of genes and horizontal bar represents the time from differentiation stimuli.

プロファイルの類似性が一致していることに対し、mRNAではそうではなく Day1 が最も他の時間に対してプロファイルが離れていた (Figure 1, 2)。このことは、mRNA がより分化初期に反応を示し、大きく変動をするのに対し、microRNA は分化成熟に向かって徐々に変動していることを示している。事実、過去の文献でも miRNA の変化は組織によって大きく異なるが、薬剤刺激などにはそれほど影響を受けず細胞内での恒常性が強く保たれていることがわかっている<sup>13)14)</sup>。したがってコアファクターである *PPARγ* を起点とした microRNA の発現変動の解析は、脂肪分化の中心を捉えていると考えられる。

また、*PPARγ* の下流 miRNA として従来の配列解析に加え、発現変動を相関解析しことにより、miR-146b, miR-214, miR-210, miR-199b が下流の miRNA として予測された (Table 1)。この結果を確認するために、定量精度の高い TaqMan microRNA assay による検証実験を行った結果、miR-146b, miR-214 で有意な発現亢進が確認出来た (Figure 4)。特に最も発現が亢進した miR-146b は、*PPARγ* によ

**Table 1** The results of the correlation analysis and PPARE domain search (< 20 kb from the start site of miRNA).

| miRNA ID     | Correlation coefficient | Location                | Up      | Sequence       |
|--------------|-------------------------|-------------------------|---------|----------------|
| mmu-miR-322  | 0.9867                  | X : 50407526-50407432   | —       | —              |
| mmu-miR-146b | 0.9893                  | 19 : 46417252-46417360  | 2.7 kb  | AGGTCCAAAGTTCA |
| mmu-miR-199b | 0.9720                  | 2 : 32173980-32174089   | 3.8 kb  | AGGTCCAGAGTTCA |
| mmu-miR-214  | 0.9650                  | 1 : 164153499-164153608 | 11.5 kb | AGAAGCAAAGTTCA |
| mmu-miR-210  | 0.9603                  | 7 : 148407392-148407283 | 3.3 kb  | AGGTCCAGAGTTCA |
|              |                         |                         | 8.5 kb  | AGGTCAAAGGCCA  |



**Fig. 4** The expression analysis of miR-146b, 199b, 210, 214 by TaqMan qRT-PCR in differentiated adipocytes. We used miR-16 to normalize the signal intensity in each samples. The Y-axis represented the mean ration of the signal intensity for indicated microRNA/mir-16 expression in 0 and 7 days after induction of differentiation. Data represent three independent experiments performed in triplicate and error bars represented S.D. \*  $p$ -value < 0.05



**Table 2** Putative downstream genes of miRNA are downstream of PPAR $\gamma$  using correlation and sequence analyses.

| miRNA ID     | Gene Name | Correlation coefficient | NCBI Accession |
|--------------|-----------|-------------------------|----------------|
| mmu-miR-146b | Nap114    | -0.9653                 | NM_008672.1    |
|              | Tbc1d19   | -0.9686                 | NM_144517.2    |
|              | Baiap211  | -0.9860                 | NM_025833.2    |
|              | Wdfy4     | -0.9502                 | AA920216.1     |
|              | Ercc61    | -0.9801                 | NM_146235.2    |
|              | Als2cl    | -0.9643                 | NM_146228.3    |
|              | Glb1      | -0.9944                 | BB078134.2     |
|              | Txn1      | -0.9790                 | BQ044098.1     |
|              | Svs6      | -0.9883                 | NM_013679.1    |
| mmu-miR-214  | Cdca5     | -0.9800                 | NM_026410.1    |
|              | Slc6a12   | -0.9991                 | NM_133661.1    |
|              |           | -0.9796                 | CF750255.1     |
|              | Prc1      | -0.9875                 | NM_145150.1    |
|              | Prkrir    | -0.9896                 | NM_028410.1    |
|              | Sez6l2    | -0.9654                 | NM_144926.2    |
|              | Lat2      | -0.9975                 | NM_020044.2    |
|              | Mcm6      | -0.9693                 | NM_008567.1    |
|              | Kpna3     | -0.9506                 | BC026885.1     |
|              | Rasa1     | -0.9824                 | NM_145452.1    |
|              | Glb1      | -0.9865                 | BB078134.2     |
|              | Atp6v0a1  | -0.9562                 | AU018617.1     |
|              | Kif2c     | -0.9858                 | NM_134471.2    |
|              | Kif17     | -0.9964                 | NM_010623.2    |

り発現誘導されるアディポサイトカインの一種である adiponectin の下流で働くことが単球で証明されており、ここにも PPAR $\gamma$  を介した miRNA の制御が関わっている可能性が考えられる<sup>15)16)</sup>。また、Karbienerらは PPAR $\gamma$  を標的とする miR-27b が脂肪細胞分化の過程で減少することを明らかにし、PPAR $\gamma$  の上流にも miRNA の制御が関わる可能性を示した<sup>17)</sup>。Johnらは本年初頭に、PPAR $\gamma$  の結合領域をクロマチン免疫沈降法で単離してくる手法と microRNA microarray を用いて、PPAR $\gamma$  が発現制御する miRNA の同定を行っている<sup>18)</sup>。MicroRNA microarray の結果に PPAR $\gamma$  の結合領域の情報で絞り込みをかけている点は我々の手法と近く、実際に彼らが PPAR $\gamma$  の標的候補として挙げている 22 個の microRNA の中に、本研究で同定した miR-146b, miR-210 も入っている。一方で、PPAR $\gamma$  が転写因子として microRNA を制御するならば、下流の microRNA の発現は PPAR $\gamma$  に対して順相関するはずであり、PPAR $\gamma$  の発現との相関係数を用いてさらに絞り込みをかけた点で我々の結果と異なる (Figure 3)。

本研究で同定された 2 つの miRNA の下流を配列

解析で標的遺伝子として候補に上がったもののうち、miRNA の発現に逆相関しているものを調べた結果、insulin の下流で活性化する Ras signal の抑制分子である Rasa1 (ras GTPase-activating protein 1) や、脂肪分化過程で厳密に制御される細胞増殖に関わる Cdca5 (cell division cycle associated 5), Mcm6 (minichromosome maintenance complex component 6) などの遺伝子が標的候補として挙げられた (Table 2)<sup>19)20)</sup>。

## 結 論

本研究の結果は、PPAR $\gamma$  とその下流 miRNA さらにはその下流 mRNA と続く脂肪分化機構の新たな経路の存在を示唆している。同定された miRNA およびその標的遺伝子に関する機能解析で有意な生理的機能が確認できれば、メタボリック症候群、糖尿病等の治療および創薬の標的となることも期待できる。

## 文 献

- 1) Mattick JS, Makunin IV: Non-coding RNA. Hum Mol Genet 15 Spec No 1: R17-29, 2006

- 2) Zamore PD, Haley B : Ribo-gnome : the big world of small RNAs. *Science* (New York, NY) **309** : 1519-1524, 2005
- 3) Bartel DP : MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116** : 281-297, 2004
- 4) Miska EA : How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* **15** : 563-568, 2005
- 5) Lewis BP, Burge CB, Bartel DP : Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120** : 15-20, 2005
- 6) Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ : miRBase : microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34** (Database issue) : D140-144, 2006
- 7) Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ : Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* **11** : 93-109, 2011
- 8) Farmer SR, Auwerx J : Adipose tissue : new therapeutic targets from molecular and genetic studies : IASO Stock Conference 2003 report. *Obes Rev* **5** : 189-196, 2004
- 9) Rosen ED, Spiegelman BM : Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16** : 145-171, 2000
- 10) Farmer SR : Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4** : 263-273, 2006
- 11) Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 4333-4337, 1998
- 12) John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS : Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* **3** : e264, 2005
- 13) Tiscornia G, Izpisua Belmonte JC : MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev* **24** : 2732-2741, 2010
- 14) Aprelikova O, Green JE : MicroRNA regulation in cancer-associated fibroblasts. *Cancer Immunol Immunother* **61** : 231-237, 2011
- 15) Hulsmans M, Van Dooren E, Mathieu C, Holvoet P : Decrease of miR-146b-5p in Monocytes during Obesity Is Associated with Loss of the Anti-Inflammatory but Not Insulin Signaling Action of Adiponectin. *PLoS One* **7** : e32794, 2012
- 16) Ing SW, Belury MA : Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology : proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutr Rev* **69** : 123-131, 2011
- 17) Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ, Scheideler M : microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* **390** : 247-251, 2009
- 18) John E, Wienecke-Baldacchino A, Liivrand M, Heinaniemi M, Carlberg C, Sinkkonen L : Dataset integration identifies transcriptional regulation of microRNA genes by PPARγ in differentiating mouse 3T3-L1 adipocytes. *Nucleic Acids Res* **40** : 4446-4460, 2012
- 19) Lapinski PE, Bauler TJ, Brown EJ, Hughes ED, Saunders TL, King PD : Generation of mice with a conditional allele of the p120 Ras GTPase-activating protein. *Genesis* **45** : 762-767, 2007
- 20) Fajas L : Adipogenesis : across-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* **35** : 79-85, 2003

## Correlation analysis between microRNAs and mRNAs regulated by *PPAR* $\gamma$ in 3T3-L1 adipogenesis

Takayuki MIZUTANI, Masami TANAKA, Rieko TANAKA,  
Masakatsu TAKANASHI, Masahiko KURODA

Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

### Abstract

Many scientists who specialize in the development or differentiation of cancer, focus on 20–25-nucleotides single-strand RNA called microRNA (miRNA or miR-). MiRNAs inhibit specific target genes having complementary sequences, and regulate many genes at once using degradation or translational blocks. Recently, some studies described methods to determine targets of miRNA but there was an issue that their results using *in silico* analysis have a high frequency of false-positive results.

In this study, we tried to find the target miRNAs of *PPAR* $\gamma$ , which is the core factor for adipogenesis, and target mRNAs of the miRNAs using correlation analysis of whole expression profiles of miRNA and mRNA in 3T3-L1 preadipocyte adipogenesis. As a result, miR-146b, miR-214, miR-210 and miR-199b are the targets of *PPAR* $\gamma$  and we could obtain the gene sets of the targets of the miRNAs.

These results suggested that unknown miRNA pathways such as miR-146b or miR-214 controlled by *PPAR* $\gamma$  contribute to adipogenesis. Our novel analytical method using the correlation between miRNAs and mRNAs may solve the difficulty caused by the high false positive rate, and the method appears useful for future miRNA studies.

---

〈Key words〉 : MicroRNA, Adipogenesis, Microarray, 3T3-L1, *PPAR* $\gamma$

---