

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19003

研究課題名(和文) 老化がもたらす骨格筋特異的miRNAの血中分泌量減少の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Research for physiological significance of the decrease in the level of muscle-related miRNAs by aging

研究代表者

福岡 聖之 (Fukuoka, Masashi)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教

研究者番号：60712669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、老齢個体において減少する血中miRNAの生理学的な意義を明らかにすることである。老齢マウスおよび若齢マウスを用いた血中および組織におけるmiRNA発現プロファイル解析から、老齢マウスの血中で減少しかつ筋組織においても減少するmiRNAとしてmiR-199a-3pを見出すことに成功した。またin vitroおよびin vivoでのmiRNA導入実験を行ったところ、当該miRNAが筋分化や筋再生を促進することを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで老化と血中miRNAとの関わりについてほとんど不明であった。本研究では、若齢マウスに豊富に含まれるmiRNAの一つとしてmiR-199a-3pを見出すこと、そして、当該miRNAが筋分化促進性miRNAであることを明らかにすることができた。本成果は老化関連性の血中miRNAを新たに発見したという点、筋分化制御機構に関わる新たなmiRNAを見出したという点から学術的意義は高いと考えられる。また、当該miRNAについてより詳細な作用機序の解明を進めていけば、将来的に、筋損傷後の回復を早めるための補助剤としての応用が期待できる。したがって、本研究成果は社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular miRNAs, such as plasma circulating miRNAs, have been studied as a cell-cell communication factor and a useful biomarker. However, it remains unknown about plasma miRNAs involving aging and physiological significance of the miRNAs.

In this study, we revealed that many miRNAs involving muscle differentiation were preferentially present in young mice plasma, compared to older mice plasma. Additionally, miR-199a-3p, a miRNA that were decreased in older mice plasma and muscle tissue, had the potential of inducing myogenic differentiation. In vivo analysis using miR-199a-3p mimic suggested that this miRNA might have potential for acceleration of muscle regeneration and control of muscle hypertrophy.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：マイクロRNA miRNA 細胞外分泌小胞 骨格筋 筋分化 血中セル・フリー核酸 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は約 20 塩基長の機能性 RNA の一つであり、主に標的遺伝子の翻訳抑制を仲介することで遺伝子発現制御に関わっている。これまで国内外の多くの研究から、組織特異的に発現する miRNA や分化ステージで時期特異的に発現する miRNA が明らかとなってきた。それらの知見に加え、近年 miRNA は細胞外に分泌され血液などの体液中に含まれることもわかっており、細胞間の情報伝達分子やバイオマーカーとして注目を浴びている。

しかしながら、老化と血中 miRNA との関係性については未解明な部分が多い。老化は様々な組織機能の低下をもたらし、それが各組織で合成される分子の血中量に反映されると予想される。老化により血中で減少する組織特異的 miRNA を見出すことができれば、それらを特定の組織機能低下を反映する老化の指標として活用できるかもしれない。この点に着目して実施したパイロット実験により、骨格筋で高発現する miRNA (e.g. miR-1) が老化マウスの血中で減少することをこれまで見出している。しかしながら、一部の miRNA を対象とした発現解析にとどまっており、どのような組織で発現する miRNA が老化によって血中量の減少が見られるのか、その全体像は不明であった。また、老齢個体で変動する血中 miRNA の生理学的な意義についてはほとんど解析がなされていない。血中 miRNA の生理学的な意義を明らかにすることが出来れば、個体レベルでの老化制御の更なる理解に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、老化による特定組織の機能低下を感知する血中 miRNA を見出すこと、そして老化によってその miRNA の血中量が減少する原因ならびに生理学的な意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 老齢個体の血中において減少する miRNA の特定とその働き

若齢マウス (6 ~ 7 週齢) および老齢マウス (2 年齢) の血漿から抽出した RNA を用いて、miRNA を対象としたマイクロアレイ実験により発現プロファイル解析を行った。そして、老齢マウスで減少した (若齢マウス血漿中で多く含まれていた) miRNA の導入効果について、マウス培養細胞株を用いた *in vitro* 実験により解析した。

2) マウスを用いた個体レベルでの解析

老齢マウス血漿で減少した miRNA の中でも、1) で細胞株に対し強い作用を示した miRNA に着目した。該当する miRNA の中でも老齢マウスの特定組織において減少する miRNA を対象とし、マウス個体への投与実験など *in vivo* での解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 血中 miRNA の発現プロファイル解析

血中 miRNA の発現プロファイル解析から、老齢マウスと比べ、若齢マウスで発現レベルが高い miRNA の中には、miR-1, miR-133a, miR-26a, miR-214 といった筋分化に関わる miRNA が多く含まれることを見出すことができた。

この結果から、若齢マウス血清は、老齢マウスの血清と比べて、筋分化誘導能を有するのではないかと推察した。そこで、若齢マウスあるいは老齢マウスの血清を含ませた分化用培地で C2C12 細胞を筋芽細胞への分化を誘導させたところ、若齢マウス血清で培養した方が筋分化マーカー *Myog* の発現が誘導されることがわかった。

(2) 若齢マウス血漿中に多く含まれていた miRNA の筋芽細胞株への導入実験による評価

若齢マウス血漿中に多く含まれていた miRNA の mimic を C2C12 細胞に導入し、低血清培地において分化誘導させた。その結果、miR-1 といった既知の筋分化誘導性の miRNA の導入によって筋分化マーカーの発現上昇が認められた。加えて、興味深いことに、これまで筋分化誘導能を持つことが知られていなかった miR-199a-3p を導入した場合、既知の筋分化誘導性 miRNA よりも筋分化マーカーの発現が強く誘導されることを見出した。さらに解析を進めたところ、miR-199a-3p は *Lin28b* や *Suz12* を標的とすることで筋分化の促進に寄与することが示唆された。

(3) マウス損傷筋への miRNA 局所投与実験

当初、以前の研究から老齢マウスの血漿で減少が見られることが既に分かっていた miR-1 についてマウスへの投与実験を実施する予定であった。しかし、本研究の miRNA 発現プロファイル解析から miR-199a-3p が老齢マウス血漿で減少すること、そして、*in vitro* 実験から当該 miRNA が強い筋分化誘導能を有することがわかった。また、若齢マウスと老齢マウスの各組織における miR-199a-3p の発現レベルを調べたところ、当該 miRNA は筋組織で高い発現レベルを示し、老齢マウスの同部位においてはその発現が顕著に低下することも明らかとなった。一方、筋分化に関わる代表的な miRNA である miR-1, miR-133a は老齢マウスの筋組織でもほとんど発現に変化が

見られなかったことから、筋組織で高発現する miRNA の中でも miR-199a-3p は老化によって減少する miRNA であるといえる。さらに、in vitro 実験から、筋細胞の培養上清中には miR-199a-3p が含まれることも確認することができた。したがって、老齢マウスの血漿で miR-199a-3p が減少する原因として、筋組織における miR-199a-3p の発現低下とそれともなう miRNA 分泌量の低下が可能性として考えられる。老化によって組織からの当該 miRNA の血中分泌量が低下しているのかどうかは今後さらに解析していく必要はあるが、miR-199a-3p は少なくとも老化によって血中だけでなく筋組織においても減少する細胞分泌性 miRNA であると考えられる。そのため、当初の方針を転換し、今後は miR-199a-3p について解析を進めていくこととした。

筋組織は、損傷を受けた後に筋分化を伴う筋再生によって回復する。そこで、筋再生過程において、miR-199a-3p が寄与するかどうか miRNA 局所投与実験によって調べた。具体的には、塩化バリウム溶液によって若齢マウスの前脛骨筋に損傷を起こした翌日、miR-199a-3p を同部位に注射し、その後の経過を調べた。結果、miR-199a-3p を投与した方が、コントロール RNA に比べて、損傷 3 日目の同部位における筋分化マーカー *Myog* の mRNA レベルが上昇していた。また、損傷 10 日目において前脛骨筋を摘出し筋横断面積を調べたところ、miR-199a-3p 投与マウスで筋横断面積の増大も見られた。以上のことから、miR-199a-3p は筋再生の促進に寄与する可能性が示唆された。

(4) 老齢マウスへの miRNA 投与実験

前述の通り、若齢マウスと比べて老齢マウスでは血漿中および筋組織における miR-199a-3p が減少している。そこで、老齢マウスへの miR-199a-3p 全身投与実験を行いその効果を調べた。全身投与 1 週間後に前脛骨筋を摘出し筋横断面積を調べたところ、コントロール RNA を投与した場合と比べ、筋横断面積の増大が見られた。また老齢マウス前脛骨筋への miR-199a-3p 局所投与実験も行った。投与 2 日目の同部位における筋横断面積を調べたところ、同様に筋横断面積の増大が見られた。このことから、血中ならびに筋組織における miR-199a-3p 量の調節は、筋組織の肥大化の制御に関わる可能性が示唆された。

今回の研究をまとめると、老齢マウス血中では筋分化関連 miRNA をはじめとする miRNA の発現レベルは減少し、その中の一つである miR-199a-3p は筋分化制御において寄与することが示唆された。また、miR-199a-3p は老齢マウスの血中だけでなく筋組織においても発現低下していること、そして、筋細胞は miR-199a-3p を分泌するポテンシャルを持つこともわかった。さらに、老齢マウスへの局所投与・全身投与実験によって、miR-199a-3p は筋組織に作用することが示唆された。今後、この当該 miRNA による筋組織への作用がどのような遺伝子の発現を制御することで生じているのか、そして、当該 miRNA が老齢マウス個体の前脛骨筋以外の筋組織にも作用するのかについてさらに研究を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shunya Goto, Masashi Takahashi, Narumi Yasutsune, Sumiki Inayama, Dai Kato, Masashi Fukuoka, Shu-ichiro Kashiwaba, Yasufumi Murakami	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of GA-Binding Protein Transcription Factor Alpha Subunit (GABPA) as a Novel Bookmarking Factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20051093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Fukuoka, Katsuji Yoshioka, Hirohiko Hohjoh	4. 巻 13
2. 論文標題 NF- B activation is an early event of changes in gene regulation for acquiring drug resistance in human adenocarcinoma PC-9 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201796. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukuoka Masashi, Takahashi Masaki, Fujita Hiromi, Chiyo Tomoko, Popiel H. Akiko, Watanabe Shoko, Furuya Hirokazu, Murata Miho, Wada Keiji, Okada Takashi, Nagai Yoshitaka, Hohjoh Hirohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Supplemental Treatment for Huntington's Disease with miR-132 that Is Deficient in Huntington's Disease Brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy-Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 79 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Kimitoshi, Hohjoh Hirohiko, Fukuoka Masashi, Sato Wakiro, Oki Shinji, Tomi Chiharu, Yamaguchi Hiromi, Kondo Takayuki, Takahashi Ryosuke, Yamamura Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02406-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuoka Masashi、Hohjoh Hirohiko	4. 巻
2. 論文標題 Comprehensive Measurement of Gene Silencing Involving Endogenous MicroRNAs in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MicroRNA Protocols	6. 最初と最後の頁 181 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7601-0_15	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Takahashi, Masashi Fukuoka, Katsuji Yoshioka, Hirohiko Hohjoh	4. 巻 479
2. 論文標題 Neighbors' death is required for surviving human adenocarcinoma PC-9 cells in an early stage of gefitinib treatment	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 393-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.09.092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 吉田 恵子、風間 大毅、柏葉 脩一郎、福岡 聖之、村上 康文
2. 発表標題 マウス温度感受性変異株 tsFT101 細胞の原因遺伝子である遺伝子 A の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Fukuoka, Naoki Ito, Shin'ichi Takeda, Hirohiko Hohjoh
2. 発表標題 Effects of miRNAs that are predominantly present in young mouse plasma on myogenic differentiation and muscle regeneration.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福岡 聖之、北條 浩彦
2. 発表標題 若齢マウス血漿で高発現するmiRNAの筋細胞分化および筋再生における効果
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福岡聖之、伊藤 尚基、武田 伸一、北條浩彦
2. 発表標題 若齢および老齢マウスの血中miRNA解析：若齢マウス高発現miRNAがマウス筋芽細胞に与える筋分化誘導効果
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会(生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北條浩彦、福岡聖之、高橋理貴、藤田寛美、千代智子、ポピエル明子、渡邊莊子、古谷博和、村田美穂、和田圭司、岡田尚巳、永井義隆
2. 発表標題 ハンチントン病の脳内で不足しているマイクロRNAを用いた補充療法
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北條浩彦、福岡聖之、善岡克次
2. 発表標題 早期薬剤耐性獲得に関わるシグナル伝達経路と遺伝子発現の解析
3. 学会等名 平成29年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masashi Fukuoka, Masaki Takahashi, Hiromi Fujita, Tomoko Chiyo, H. Akiko Popiel, Shoko Watanabe, Hirokazu Furuya, Miho Murata, Keiji Wada, Takashi Okada, Yoshitaka Nagai, Hirohiko Hohjoh
2. 発表標題 Supplemental treatment for Huntington disease (HD) with miR-132 that is deficient in HD brain
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福岡聖之, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 北條浩彦
2. 発表標題 若齢および老齢マウスの血中miRNA発現解析から見出された筋分化誘導性miRNAに関する研究
3. 学会等名 第3回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北條浩彦, 福岡聖之, 高橋理貴, 善岡克次
2. 発表標題 早期薬剤耐性獲得に関わるシグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福岡聖之, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 北條浩彦
2. 発表標題 若齢および老齢マウスの血中miRNAの解析: 若齢マウスで見出された高発現miRNAがC2C12細胞およびマウス初代筋芽細胞に与える筋分化誘導効果
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Masashi Fukuoka, Naoki Ito, Shin'ichi Takeda, Hirohiko Hohjoh
2. 発表標題 Difference in plasma circulating cell-free microRNAs between young and aged mice: Effects of miRNAs that are predominantly present in young mouse serum on myogenic differentiation in C2C12 cells and primary myoblasts.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 木村公俊, 北條浩彦, 福岡聖之, 佐藤和貴郎, 高橋良輔, 山村隆
2. 発表標題 多発性硬化症ではエクソソームが制御性T細胞を抑制する
3. 学会等名 第28回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 木村公俊, 北條浩彦, 福岡聖之, 佐藤和貴郎, 高橋良輔, 山村隆
2. 発表標題 エクソソームによる制御性T細胞の抑制; 多発性硬化症における新たな疾患メカニズム
3. 学会等名 第44回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 木村公俊, 北條浩彦, 福岡聖之, 佐藤和貴郎, 高橋良輔, 山村隆
2. 発表標題 エクソソームによる制御性 T 細胞の抑制; 多発性硬化症の新たな病態
3. 学会等名 第8回日本RNAi研究会 / 第3回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kimura K., Fukuoka M., Sato W., Takahashi R., Hohjoh H., and Yamamura T
2. 発表標題 Suppression of Regulatory T Cells: a Pathogenic Role of Exosomes in Multiple Sclerosis
3. 学会等名 FOCIS 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 木村公俊, 北條浩彦, 福岡聖之, 佐藤和貴郎, 村田美穂, 高橋良輔, 山村隆
2. 発表標題 Suppression of regulatory T cells by exosomes in multiple sclerosis
3. 学会等名 第57回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 筋分化誘導剤	発明者 北條浩彦、福岡聖之	権利者 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究セン
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/037120	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 筋分化誘導剤	発明者 北條浩彦、福岡聖之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-201786	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----