

令和元年6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07012

研究課題名(和文)新規サルコペニア関連microRNAの生物学的機序の解明

研究課題名(英文)Biological mechanism of novel sarcopenia related microRNA

研究代表者

橋本 善隆 (Hashimoto, Yoshitaka)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：70806140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアはQOLおよび生命予後を著しく低下させるが、現在有効な治療はなく、早期診断や発症予測となるバイオマーカーもない。

本研究では申請者らが発見した筋萎縮関連microRNAであるmir-23に関して検討を行ったところ、マウスでは筋萎縮によりmir-23bが増加していること、作用機序としてmir23bがPTENを抑制することで筋萎縮に防衛的に働くことを明らかにした。さらにサルコペニアを呈する人血清ではmir23a、23bが共に増加していることを明らかにした。これらの結果からmir23はサルコペニアの新規の治療ターゲットおよび診断のバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニア(筋萎縮)はQOLおよび生命予後を著しく低下させるが、現在有効な治療はなく、サルコペニアの早期診断や発症予測となるバイオマーカーもない。

本研究では申請者らが発見した筋萎縮関連microRNAであるmir-23が筋萎縮に対して防衛的に働いていることおよび実際サルコペニアを呈する人血清ではmir-23が増加していることを明らかにした。これらの結果からmir23はサルコペニアの新規の治療ターゲットとなりうる可能性および早期診断のバイオマーカーになりうる可能性がある。

今後、mir23を用いて、サルコペニア予防とそれに伴うQOLおよび生命予後の改善を目指す一助になる。

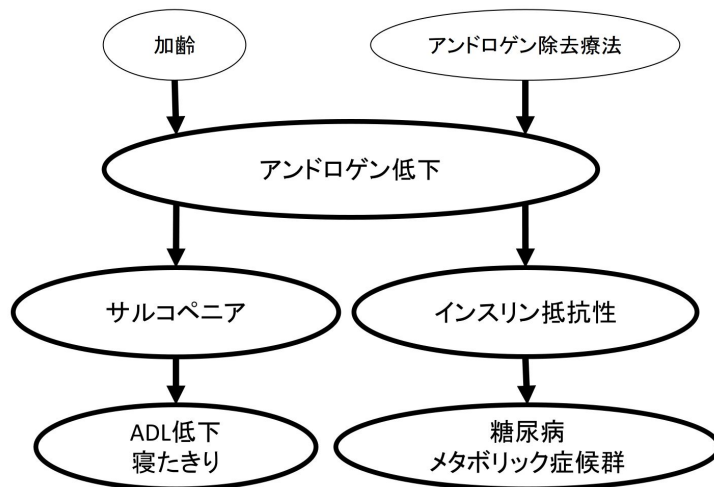
研究成果の概要(英文)：Although sarcopenia is known as a risk factor for quality of life decline and shortened life expectancy, there are currently no effective treatments and no bio-markers for sarcopenia. We focus on the role of microRNA on saropenia and previously revealed that mir-23 is increasing in muscle with muscle atrophy. Thus, we hypothesis that mir-23 has a role on sarcopenia. In this study, we examined the impact and the mechanisms of mir-23 on saropenia. We revealed that mir-23b was increased through muscle atrophy in the mouse model. In addition, we clarified that mir-23b acts as protectively on muscle atrophy through suppressing Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome and enhancing Akt-mTOR pathway. Furthermore, we showed that serums of mir-23a and mir-23b in people with sarcopenia were higher than those in people without sarcopenia. These results suggest that mir-23 might be a novel therapeutic target and diagnostic biomarker for sarcopenia.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：サルコペニア microRNA 筋肉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



近年、糖尿病に伴う ADL、生命予後にサルコペニア（筋萎縮）が強く関与していることが明らかとされている。

男性におけるアンドロゲン低下はインスリン抵抗性・糖代謝異常の原因となることは以前からの研究で明らかとしている。また、サルコペニアはインスリン抵抗性と関連があることも知られている。そのため、**アンドロゲン低下はサルコペニア発症・進展の危険因子であるが、詳細な機序は明らかでなかった。**

一方で、microRNA が骨格筋のホメオスタシスに関与していることが報告されており、これまでに miR-1/miR-206, miR-133a, miR-133b, miR-499 などの様々な miRNA が骨格筋において筋分化、肥大、萎縮に関与することが報告されている。しかし、それらの多くは遺伝性筋疾患や心筋梗塞などを対象とした研究であり、サルコペニアを対象としては報告されていなかった。

我々の研究グループでは男性のアンドロゲン低下モデルマウスである睾丸摘出マウスにおいてヒラメ筋が萎縮しており、サルコペニアの病態を呈していることを明らかとした。睾丸摘出モデルと偽手術群のヒラメ筋の microRNA でのトランスクリプトーム解析を実施し、筋萎縮に関与する microRNA として miR-23a、miR-23b があることを明らかとした。一方これらの **サルコペニアにおける分子生物学的機能は明らかでなかった。**

2. 研究の目的

我々の研究グループが明らかとした筋関連 microRNA である miR-23 の筋萎縮にけるメカニズムを明らかにするとともに、血清 miR-23a、miR-23b がヒトのサルコペニアのバイオマーカーとなり、臨床上的アンメットニーズを充足することを証明する。

3. 研究の方法

サルコペニア関連 microRNA である miR-23a、miR-23b の生物学的機序を明らかとするために以下の研究を実施した。

1. miR-23b-3p が筋芽細胞から筋管細胞への分化・筋管細胞の機能発現に与える影響 (In vitro)

マウス筋芽細胞 C2C12 を 24well plate に散布し、基本培地で培養(Day-2)、80%コンフルエントとなった時点で分化培地へ変更(Day0)、培地変更 24 時間後に 30nM の miR-23b-3p の mimic/inhibitor、スクランブル配列を X-treme GENE siRNA トランスフェクション試薬にて遺伝子導入し、96 時間後(Day5)に下記の項目を評価した。

遺伝子発現：Total RNA を miRNeasy mini kit(Qiagen 社)により抽出し、rt-PCR で miR-23b-3p 及び U6 small nucleolar RNA を CT 法により定量し評価。また PTEN 及び GAPDH を duplex Taqman rt-PCR assay にて定量し評価。

免疫染色：Day5 に MHC、MyoD、Myogenin 抗体で染色し評価。

ATP 活性：Day5 に ATPassay を実施。活性を Berthold Detection Systems Orion L で測定。

グルコース取り込み能：Day5 に分化培地に 3H で標識した 2DG を加え、24 時間培養後に測定。

細胞内シグナル：Day5 にインスリン(100ng/ml)刺激を実施、細胞抽出物を回収。ウェスタンブロット法により蛋白量を測定。

ルシフェラーゼアッセイ：Day1 の遺伝子導入時に PTEN 及び Neg-Ctrl コンストラクトを同時に導入し、Day5 にルシフェラーゼアッセイにて遺伝子発現の調節を確認。

2. miR-23b-3p のサルコペニアモデルマウスでの発現 (In vivo)

C57BL/6 マウスに 6 週齢で偽手術 (SHAM) を施行した群、睾丸摘出術(ORX)を施行した群、および 6 週齢に ORX 施行のうえアンドロゲン補充を補充 (ORX+A) した群の 3 群を 12 週齢まで飼育のうえサクリファイスを施行し、ヒラメ筋を摘出。

筋重量、筋面積などの測定とともに、miR-23b-3p の発現量を rt-PCR を用いて測定した。

3. ヒトにおける miR-23b および miR-23a のバイオマーカーとしての診断能の評価 (Human study)

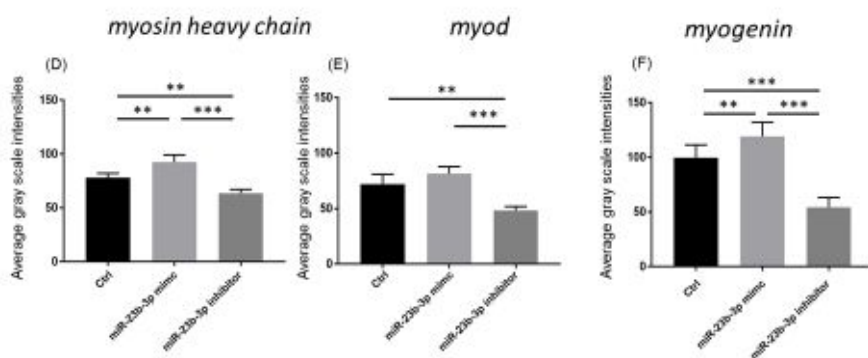
対象 KAMOGAWA-DM コホートに参加している 2 型糖尿病患者。
サルコペニアはバイオインピーダンス法を用いて四肢筋量を測定し、skeletal muscle index (SMI, kg/m²)を算出した。男性 SMI<7.0kg/m²、女性 SMI<5.7kg/m² と定義した。
血清 miR-23a, miR-23b は KAMOGAWA-DM コホートの登録患者の血清サンプルより miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen 社)を用いて Total RNA を抽出した。
比較定量法で miR-23a および miR-23b を評価：cell-miR-39 をコントロールとして miR-23a および miR-23b の Ct 値を測定した。

4. 研究成果

申請者らが発見したアンドロゲン欠乏による筋萎縮に關与する候補 microRNA として筋萎縮関連 microRNA である miR-23a, miR-23b について以下の検討を実施した。

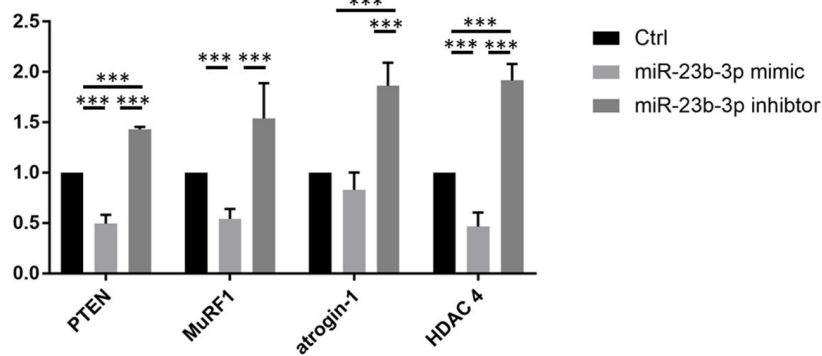
1. miR-23b-3p が筋芽細胞から筋管細胞への分化・筋管細胞の機能発現に与える影響 (In vitro)

まず、miR-23b-3p のミミックによって、筋管細胞内で miR-23b-3p の発現が増強していること、反対にインヒビターにより発現が低下していることを確認した。



そのうえで、ミオシン重鎖、MyoD、ミオジェニンによる免疫染色を実施したところ、miR-23b-3p のミミック群では他群での発現の上昇および細胞数の増加を確認した(左図)。

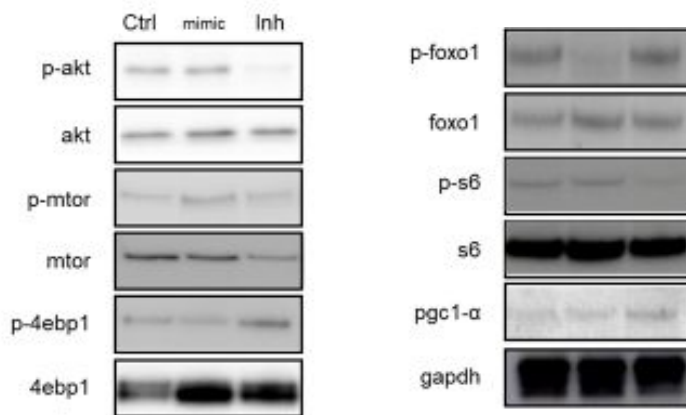
さらに、既報にて miR-23b-3p が PTEN を target gene としていることが報告されているため、



PTEN の活性を抑制し、Akt/mTOR pathway を調節していると考え、miR-23b-3p の PTEN への影響を確認したところ左図のようにミミック群では、PTEN の発現が減弱、反対にインヒビター群では PTEN の発現がコントロール群と比較しても上昇を認めた。また、筋萎縮に關わる遺伝子発現はイン

ヒビター群で有意に発現が上昇していることを確認した。

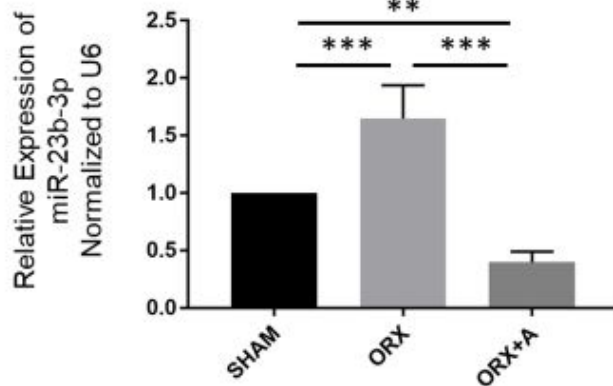
さらに Luciferase assay により miR-23b-3p が直接 PTEN の発現を抑制していることを確認した。



Akt-mTOR pathway に関してウエスタンブロッティングを実施した。正の働きをするシグナルはミミック群で有意にリン酸化が進んでおり、反対に pathway に対して負の働きを示すものについては減弱していることを確認した。

2. miR-23b-3p のサルコペニアモデルマウスでの発現 (In vivo)

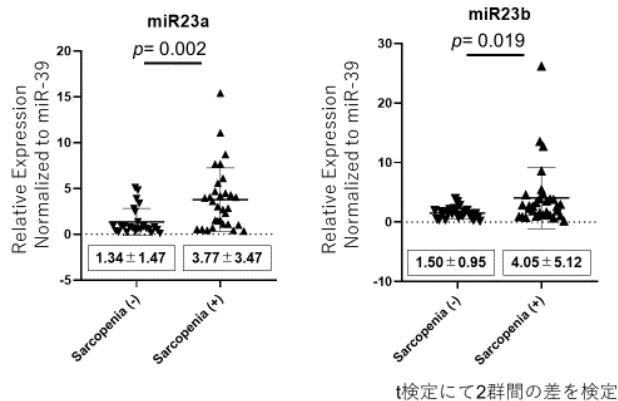
サルコペニア関連 miR-23b-3p のサルコペニアモデルマウスでの発現についてヒラメ筋を用いて評価した。



コントロールである SHAM(偽手術)群と比較してサルコペニアモデルマウスである ORX(睾丸摘出)群ではヒラメ筋の筋量低下をきたし、睾丸摘出にアンドロゲン補充(ORX+A)群では筋量が改善していることを明らかにしたうえで、miR-23b-3p の発現についても確認したところ(左図)、SHAM と比較して ORX で発現が亢進していることおよび ORX+A 群で発現が低下していることを明らかとした。

3. ヒトにおける miR-23b および miR-23a のバイオマーカーとしての診断能の評価 (Human study)

血清サンプルより microRNA を抽出し、cell-mir 39 を spike in コントロールとして miR-23a および 23b の Ct を測定した。



サルコペニア群(31名)では非サルコペニア群(25名)と比較して有意に血清 miR-23a(3.33 ± 3.49 vs. 1.18 ± 1.28, p=0.006) および miR-23b(3.05 ± 3.63 vs. 1.42 ± 0.89, p=0.036)が高値であった。年齢、性別で補正後の miR-23a および miR-23b のサルコペニアのオッズ比はそれぞれ 1.81(95%CI 1.18-2.79, p<0.001)、1.90(95%CI 1.04-3.49, p=0.038)であった。

ROC 解析では miR-23a のサルコペニアのカットオフ値は 1.00 (AUC 0.76、感度 0.79、特異度 0.82)、

miR-23b のカットオフ値は 2.33 (AUC 0.71、感度 0.55、特異度 0.88)であった。

これらの結果からは血清 miR-23a, miR-23b はサルコペニア合併糖尿病で有意に高値であり、サルコペニアのバイオマーカーとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

橋本善隆、鍛冶亜由美、濱口真英、大坂貴史、北江彩、岡村拓郎、福田拓也、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明 2 型糖尿病患者において血清 miR-23 はサルコペニアと関連する 第 92 回日本内分泌学会学術総会 2019 年

岡村拓郎、濱口真英、大坂貴史、橋本善隆、福田拓也、牛込恵美、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明 筋管細胞において miR-23b-3p は PTEN 発現を調整し、糖代謝、ミオシン重鎖形成を調整する 第 55 回日本糖尿病学会近畿地方会 2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし