

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17966

研究課題名(和文) microRNA/let-7の骨格筋萎縮・糖代謝における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNA/let-7 in skeletal muscle atrophy and glucose metabolism

研究代表者

岡田 博史 (Okada, Hiroshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30806831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の萎縮とmicro RNA Let-7の関連性を検討した。マウスの細胞実験では let-7e-5pはIgf2bp2をtarget geneとし、その発現を抑制していた。let-7e-5pを抑制すると、ミオシン重鎖の発現、グルコースの取り込み、ミトコンドリア機能、ATP活性が有意に上昇した。さらに、let-7e-5pの過剰発現は筋萎縮に関連する遺伝子の発現を増加させた。人ではサルコペニアにおいて代償的にlet-7e-5pの発現が低下していることも見出した。microRNA Let-7の抑制はIgf2bp2の発現を介して骨格筋萎縮を抑制す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

フレイル(虚弱状態)は精神・心理的脆弱性、社会的脆弱性に加え身体的脆弱性により要介護状態に至る前段階であり、ADLの低下や死亡のリスクとなる。本邦においてフレイルの対策は喫緊の課題である。本研究ではmicroRNA Let-7を抑制することでIgf2bp2の発現が上昇し、骨格筋萎縮が抑制されるという先行知見を得た。核酸医薬によりフレイルが予防しうる可能性を示し、Let-7がその標的となることを発信、提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the role of microRNAs (let-7e-5p) in muscle atrophy. The effect of let-7e-5p overexpression or knockdown on the expression of myosin heavy chain, glucose uptake, and mitochondrial function was investigated in C2C12 myotube cells. Moreover, we examined serum let-7e-5p levels among male subjects with type 2 diabetes. Suppression of let-7e-5p significantly upregulated the expression of myosin heavy chain, glucose uptake, and mitochondrial function. Real-time PCR revealed a possible regulation involving let-7e-5p and Igf2bp2 mRNA and protein in C2C12 cells. The serum let-7e-5p levels were significantly lower, which might be in compensation, in subjects with decreased muscle mass compared to subjects without decreased muscle mass. Let-7e-5p downregulates the expression of Igf2bp2 in myotube cells and inhibits the growth of the myosin heavy chain. Based on our study, serum level of let-7e-5p may be used as a potential diagnostic marker for muscle atrophy.

研究分野：内分泌・代謝内科学

キーワード：サルコペニア micro RNA let-7e

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の治療標的として骨格筋の重要性が認識されている。骨格筋は加齢のみならず、様々な病態で萎縮をきたし、ADLの低下に直結する。その対策は本邦において重要課題の一つであるが、骨格筋萎縮の分子生物学的機序は明らかでなく、その解明、創薬が期待されている。近年様々な病態での microRNA の障害の関与が報告されている。発現異常をきたした microRNA を正常状態に戻す治療は新たな創薬フロンティアとして期待されている。microRNA が調節する一連の mRNA 発現が障害されることで筋萎縮が発症する可能性が示唆されている。我々は骨格筋萎縮において microRNA let-7 クラスターの発現が低下するという独自知見を得ており、骨格筋の萎縮と let-7e-5p の関連性について注目している。

2. 研究の目的

筋萎縮における microRNA (let-7e-5p) の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

* 細胞実験

C2C12 筋管細胞を用いて、let-7e-5p の過剰発現またはノックダウンがミオシン重鎖の発現、グルコース取り込み、ミトコンドリア機能に与える影響を調べた。さらに、糖尿病をもつ男性被験者 32 名を選択し、年齢を一致させた筋肉量減少のある患者 16 名と筋肉量減少のない患者 16 名の 2 群で血清中の let-7e-5p の発現を調べた。

【マウス筋芽細胞 C2C12 の培養と遺伝子導入】

マウス筋芽細胞 C2C12 を 24well plate に散布。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し (Day0)、培地変更 24 時間後に 30nM の Let-7e-5p 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) に種々の項目を評価した。

【評価項目】

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同時に PTEN 及び GAPDH を duplex Taqman rt-PCR assay にて定量し評価した。

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した。

免疫染色: Day5 に MHC 抗体で染色を行った。

ATP 活性: Day5 に ATP assay を実施した。

活性を Berthold Detection Systems Orion L で測定した。

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 時間培養後に測定した。

細胞外フラックスアナライザー: Day5 にシーホースアナライザーと Cell Mito Stress Test アッセイキットを用いて測定した。

* ヒトを対象とした研究

2015 年 8 月から 2017 年 9 月の間に京都府立医科大学または亀岡市立病院の外来から募集した 65 歳以上の 2 型糖尿病の男性患者を対象とした。各患者の体組成は、生体インピーダンス体組成計 (InBody 720) を用いて評価し、骨格筋指数 (SMI) が $7.0\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の患者をサルコペニアとした。男性患者計 32 名を選択し、年齢を一致させたサルコペニアのある患者 16 名とない患者 16 名の 2 群で血清中の let-7e-5p の発現を調べた。

4. 研究成果

C2C12 細胞における let-7e-5p の発現は、mimic では有意に増加し、inhibitor で減少することを確認した (図 1A)。続いて、C2C12 細胞における Igf2bp2 の発現は、mimic で有意に減少し (図 1B)、Trim63、Fbxo32、Hdac4 などの筋萎縮に関連する遺伝子の発現は、mimic の C2C12 細胞では、inhibitor と比較して有意に増加した (図 1B)。さらに、ウェスタンブロット解析では、inhibitor における C2C12 細胞の Igf2bp2、ミオシン重鎖 (MHC) のタンパク質レベルは共に、mimic よりも高値であった (図 1C)。

続いて、免疫染色では、inhibitor の筋管細胞ではミオシン重鎖の蛍光強度、fusion index、筋管幅は、コントロールに比べて有意に高く、mimic ではコントロールに比べて有意に低い結果がえられた (図 1E-G)。

Let-7e-5p inhibitor の C2C12 細胞において、グルコース取り込み量は、コントロールと比較して、有意に増加し、mimic のグルコース取り込み量は、有意に減少した (図 2A)。ATP 活性は、mimic の C2C12 細胞では、コントロールと比較して、有意に低下したが、inhibitor においては ATP 活性は上昇した (図 2B)。細胞外フラックスアナライザーを用いて C2C12 細胞のミトコンドリア酸素消費量を調べたものでは、mimic の C2C12 細胞では、基礎呼吸が減少し、コントロールや inhibitor と比較して、ATP 産生量、プロトンリーク量、最大呼吸量、予備呼吸量が有意に減少した。その一方で、let-7e-5p の inhibitor においては、そのミトコンドリア機能は上昇した (図 2C-H)。

ヒトの検討ではサルコペニア群では、非サルコペニア群と比較して、血清中の let-7e-5p レベルが有意に低値であった (図 3A)。ROC 解析ではサルコペニアの有無に対する血清 let-7e-5p のカットオフ値は 1.302 であった (図 3B)。また、血清中の let-7e-5p 濃度は、多変量ロジスティック回帰分析において、サルコペニアの有無と負の相関が認められた (図 3C)。

Figure 1

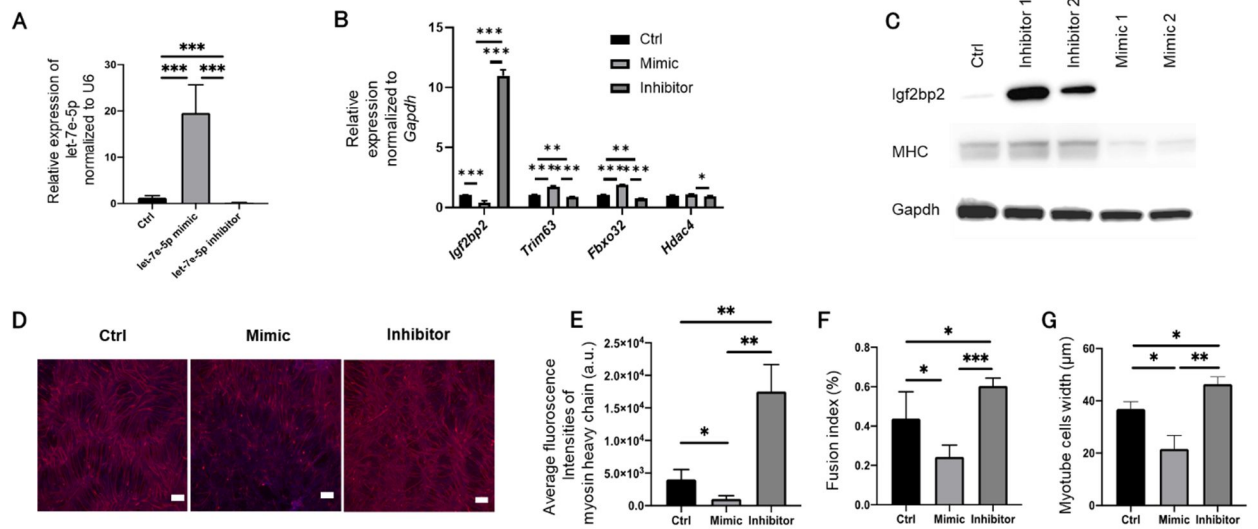


Figure 2

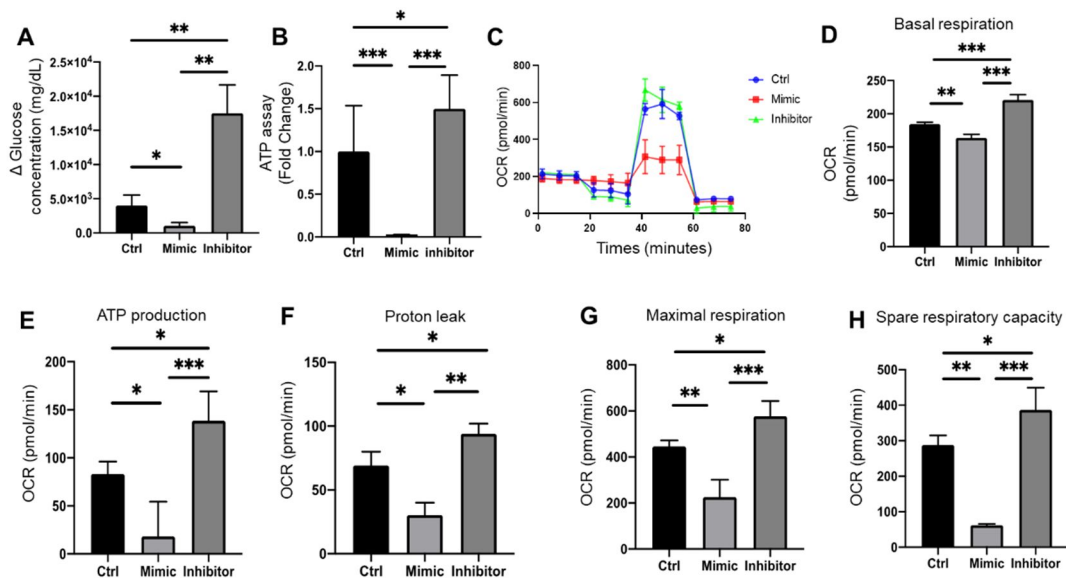
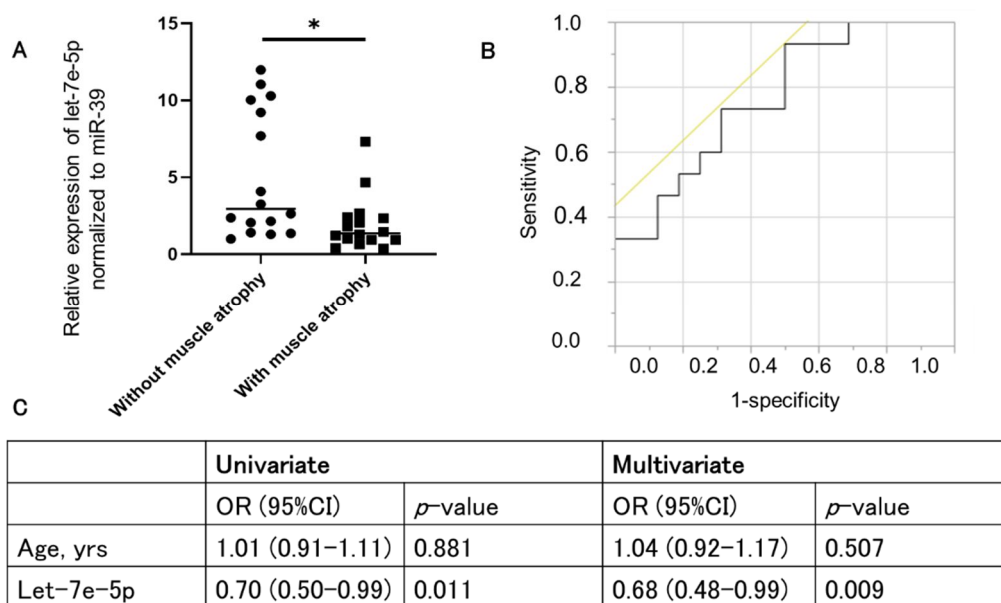


Figure 3



以上より、Let-7e-5p は筋管細胞における Igf2bp2 の発現を制御している可能性が示唆された。また、let-7e-5p 阻害により C2C12 細胞で Igf2bp2 を過剰発現させると、主に筋萎縮に関連する遺伝子の抑制とミトコンドリア機能の増強を介し、サルコペニアが改善する可能性があると考えられた。

ヒトを対象とした研究において、血清中の let-7e-5p 発現は、サルコペニアのある糖尿病患者では、サルコペニアのない患者に比べて有意に低値であった。サルコペニアのある糖尿病患者の血清 let-7e-5p の発現が低いことは、骨格筋の萎縮を代償するためである可能性が考えられた。核酸医薬によりフレイルが予防しうる可能性を示し、Let-7 がその標的となることを発信、提案できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura T, Okada H, Hashimoto Y, Majima S, Senmaru T, Nakanishi N, Asano M, Yamazaki M, Hamaguchi M, Fukui M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Let-7e-5p Regulates IGF2BP2, and Induces Muscle Atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Endocrinol	6. 最初と最後の頁 791363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.791363	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宗川ちひろ, 岡村拓郎, 岡田博史, 橋本善隆, 間嶋紗織, 千丸貴史, 牛込恵美, 中西尚子, 浅野麻衣, 濱口真英, 山崎真裕, 福井道明
2. 発表標題 マイクロRNA Let-7e-5pはIGF2BP2を制御することで筋萎縮を引き起こす
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------