

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月14日現在

機関番号：82674

研究種目：若手（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700669

研究課題名（和文） 筋萎縮における microRNA の役割の解明およびその改善への応用研究

研究課題名（英文） Research on the role of microRNA in skeletal muscle atrophy

研究代表者

藤田 泰典（FUJITA YASUNORI）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30515888

研究成果の概要（和文）：筋萎縮の分子メカニズムの解明とその改善への応用研究を目的に、マウス筋芽 C2C12 細胞において、筋萎縮に関連する microRNA (miRNA) をマイクロアレイ解析により同定し、その機能解析を行った。本研究により、miRNA の1つである mmu-miR-148a が筋萎縮促進作用を有する可能性が示唆され、さらに詳細な機能解析を行うことにより、筋萎縮の予防や治療における分子標的としての有用性を検証できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）： In an attempt to reveal the molecular mechanism of skeletal muscle atrophy, we identified microRNAs (miRNAs) that were related to atrophy by microarray analysis and investigated their function in mouse myoblast C2C12 cells. Results suggested that mmu-miR-148a promotes muscle atrophy of differentiated C2C12 cells. It is necessary to verify its usefulness as a molecular target for the treatment and prevention of skeletal muscle atrophy by more detailed research.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：筋萎縮、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本整形外科学会は、運動器の障害による要介護の状態や要介護リスクの高い状態を表す新しい言葉として「ロコモティブシンドローム（運動器症候群）」を提唱し、高齢化社会を迎えた日本において、運動器（骨格筋・骨・関節）を健康な状態で維持することの重要性を唱えている。骨格筋の萎縮は、脳梗塞などの後遺症、加齢、癌、神経筋

疾患などにより引き起こされる。骨格筋の機能維持には、筋萎縮の予防・治療法の開発が不可欠であり、そのためには筋萎縮の分子機序を解明することが重要である。

萎縮した骨格筋では筋タンパクの合成低下、分解亢進による筋タンパクの減少が認められ、筋萎縮の主要な原因と考えられている。萎縮時の筋タンパク分解には細胞内のタンパク分解システムであるユビキチン・プロテ

アソーム系が関与することが解っている。IGF-1/AKT シグナル経路の抑制や、TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B シグナル経路の活性化が起こると、筋特異的ユビキチン結合酵素である Atrogin-1、MuRF1 の遺伝子発現が誘導され、筋タンパク分解が引き起こされる。実際に筋萎縮の動物モデルや培養細胞モデルにおいて、廃用・低栄養・悪液質・敗血症・糖尿病・薬剤（ステロイド・高脂血症薬）などにより、Atrogin-1 や MuRF1 の発現が誘導されることが報告されている。

MicroRNA (miRNA) は約 20 塩基からなる低分子 RNA であり、mRNA の 3' -非翻訳領域 (3' -UTR) に結合し、翻訳抑制・mRNA 分解により転写後の発現制御を行う。ヒトでは 700 以上の miRNA が見つかり、ヒト遺伝子の約 1/3 が miRNA による制御を受けていると考えられている。これまでに、様々な癌細胞において miRNA の発現異常が確認され、発癌や癌細胞の悪性化に関与することが報告されている。また、組織特異的な miRNA の同定や発生過程における miRNA の機能解明も進んでいる。このように、近年 miRNA に対する注目が集まっており、様々な疾患と miRNA に関する研究が行われている。骨格筋においては、miR-1、miR-206、miR-133 に関する研究報告が多く、これらの miRNA が筋分化に関与することが明らかにされている。しかしながら、筋萎縮と miRNA に関する報告は数例であり、未だ十分に研究が行われていない。

## 2. 研究の目的

(1) 筋萎縮に関連する miRNA の同定とその作用機序の解明：これまでに申請者は前立腺癌と miRNA に関する研究に従事し、2008 年に miRNA の 1 つである miR-34a の前立腺癌細胞における役割を報告し (Biochem Biophys Res Commun 2008 377:114-9)、また miR-148a が前立腺癌細胞の薬剤耐性に関与することを見出し、miR-148a の新規標的遺伝子として MSK1 を同定した。この研究経験をもとに、筋萎縮により発現変動を示す miRNA を同定し、その miRNA の機能解析、標的遺伝子の探索を行い、筋萎縮の分子メカニズムの解明を行う。

(2) 筋萎縮に関連する miRNA の機能を指標とした筋萎縮を抑制するファイトケミカルの探索：申請者はファイトケミカル (植物に含まれる二次代謝産物) の機能性探索およびその作用機序の解明に関する研究にも従事してきた。これまでに、キク科植物由来のセスキテルペンラクトンが酸化ストレス応答を増強すること、ゴマ成分であるセサミンの代謝物が細胞内シグナル伝達の活性化を介して神経分化を誘導することを報告した (Biochem Biophys Res Commun 2008 368:948-54, J Neural Transm 2009 116:841-52)。最近になり、マウス C2C12 筋

芽細胞を用いて、骨格筋の分化誘導促進・筋萎縮抑制作用を持つファイトケミカルのスクリーニング系を確立し、骨格筋を対象とした研究も進めている。そこで、筋萎縮に関連する miRNA の機能を指標としたスクリーニング系を構築し、筋萎縮に効果を示すファイトケミカルの探索を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 筋萎縮に関連する miRNA の同定とその作用機序の解明

①培養細胞筋萎縮モデルにおける miRNA マイクロアレイ解析：筋芽細胞 C2C12 細胞を分化誘導した後、筋萎縮誘導剤として使用されるステロイド (デキサメタゾン)、高脂血症薬 (ロバスタチン) を処理し、6 時間後と 24 時間後にサンプリングを行った。これらのサンプルから miRNA を含む RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析を行った。次に、定量 RT-PCR を行い、マイクロアレイ解析結果の再現性を確認し、筋萎縮誘導剤で発現変動を示す miRNA の同定を試みた。

②実験条件の改良：サンプル間の分化誘導効率を一定にするために、培養器具、分化誘導培地、分化誘導条件の再検討を行った。評価方法として、定量 RT-PCR により、任意の 8 種類の miRNA の発現レベル調べ、サンプル間のバラツキを評価した。

③筋萎縮誘導剤で発現変動を示す miRNA の機能解析：筋萎縮誘導剤で発現変動を示す miRNA の precursor を C2C12 細胞に導入し、ミオシン重鎖のタンパクレベル、筋細胞の形態を評価した。また、筋萎縮を誘導した時の候補標的遺伝子のタンパクレベルを評価した。

(2) 筋萎縮に関連する miRNA の機能を指標とした筋萎縮を抑制するファイトケミカルの探索：筋萎縮誘導剤で発現変動を示す miRNA の機能を評価するルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。

## 4. 研究成果

筋萎縮で発現変動を示す miRNA を同定するために、分化誘導した C2C12 細胞を 2 種類の筋萎縮誘導剤 (ステロイド: デキサメタゾン、高脂血症薬: ロバスタチン) で処理し、miRNA マイクロアレイ解析を行った。解析の結果、デキサメタゾンでは、6 時間処理で 2 種類、24 時間処理で 9 種類の miRNA の発現が変動した。一方、ロバスタチンでは、6 時間処理で 5 種類、24 時間処理で 19 種類の miRNA の発現が変動した。6 種類の miRNA (mmu-miR-1224, mmu-miR-494, mmu-miR-193, mmu-miR-322, mmu-miR-188-5p, mmu-miR-183) がデキサメタゾンとロバスタチンで共通の変動を示した。この中で最も発現変動が大きかった mmu-miR-1224 は、デキサメタゾン処理 6 時間

で2.6倍、24時間で2.2倍に増加し、ロバスタチン処理24時間で2.0倍に増加していた。しかしながら、定量RT-PCRでは、これらのデータの再現性は十分には得られなかった。そこで実験条件の改良に取り組んだ結果、mmu-miR-148aの発現が、デキサメタゾン処理で低下することを見出した(図1)。

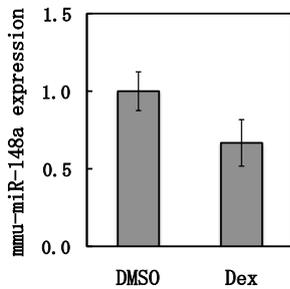


図1 デキサメタゾンによるmmu-miR-148aの発現変化

続いて、mmu-miR-148aの機能を明らかにするために、分化誘導したC2C12細胞にmmu-miR-148aのprecursorを導入し、Western blotで速筋型ミオシン重鎖と遅筋型ミオシン重鎖のタンパクレベルを調べた。その結果、mmu-miR-148aは速筋型ミオシン重鎖のタンパクレベルを低下させることが分かった(図2)。

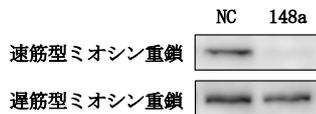


図2 mmu-miR-148a precursorによるミオシン重鎖タンパクレベルの変化

また、免疫蛍光染色により筋細胞の形態を調べた結果、筋細胞の減少と萎縮傾向が認められた(図3)。

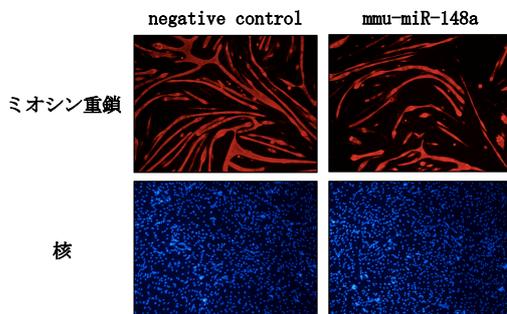


図3 mmu-miR-148a precursorによる筋細胞の形態変化

これらの結果から、デキサメタゾンによる筋萎縮の誘導に伴い、mmu-miR-148aの発現が代償的に抑制されているものと考えられた。

我々は先に、前立腺癌細胞でセリンスレオニンキナーゼである mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1) が miR-148a の標的遺伝子であることを報告しているが、分化誘導したC2C12細胞において、デキサメタゾン処理により MSK1 のタンパクレベルが増加し、それは mmu-miR-148a の発現と逆相関していた(図4)。

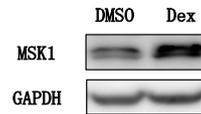


図4 デキサメタゾンによるMSK1タンパクレベルの変化

このように筋萎縮に関連する可能性が示された mmu-miR-148a の機能を評価するルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、筋萎縮を抑制するファイトケミカルの探索を可能とするシステムを構築した。

本研究により、mmu-miR-148aが筋萎縮促進作用を有する可能性が示唆され、さらに詳細な機能解析を行うことにより、筋萎縮の予防や治療における分子標的としての有用性を検証できるものと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Yasunori Fujita, Nanako Hamada, Toshio Kojima, Aya Kitamoto, Yukihiro Akao, Yoshinori Nozawa, Masafumi Ito. MicroRNA expression profiling of NGF-treated PC12 cells revealed a critical role for miR-221 in neuronal differentiation. *Neurochem Int*, 査読有, 60: 743-750, 2012. DOI:10.1016/j.neuint.2012.03.010

② Yasunori Fujita, Keitaro Kojima, Riyako Ohhashi, Nanako Hamada, Yoshinori Nozawa, Aya Kitamoto, Akira Sato, Shinji Kondo, Toshio Kojima, Takashi Deguchi, Masafumi Ito. MiR-148a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem*, 査読有, 285: 19076-84, 2010. DOI:10.1074/jbc.M109.079525

[学会発表] (計2件)

① Yasunori Fujita, Toshio Kojima, Keita Nakane, Taku Kato, Keitaro Kojima, Nanako Hamada, Riyako Ohhashi, Takashi Deguchi,

Yoshinori Nozawa, Masafumi Ito. MiR-130a attenuates paclitaxel resistance of drug-resistant prostate cancer PC3 cells through post-transcriptional regulation of MSK1 expression. 第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2011.12.14

②Nanako Hamada, Yasunori Fujita, Toshio Kojima, Yukihiro Akao, Yoshinori Nozawa, Masafumi Ito. MicroRNA expression profiling of NGF-treated PC12 cells revealed critical roles of miR-221 in neuronal differentiation. 第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2011.12.13

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 泰典 (FUJITA YASUNORI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 30515888