

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500770

研究課題名(和文) マイクロRNAによる組織酸素センシング機構の修飾作用に関する研究

研究課題名(英文) Changes in microRNAs during hypoxia-induced physiological adaptation

研究代表者

鈴木 淳一 (Suzuki, Junichi)

北海道教育大学・教育学部・教授

研究者番号：80261379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸素が足りない状態に陥ると、生体ではHIF-1 $\alpha$ というタンパク質が安定化し、酸素不足に適応するような変化が生じる。激しい運動をすると、活動中の筋肉では酸素濃度が安静時の10分の1程度まで減少し、様々な適応反応が生じる。本研究では、急性運動や慢性的な運動トレーニング後、血管新生に関するmicroRNAの顕著な変化が観察され、骨格筋の適応性変化にmicroRNAが関与する可能性が示唆された。また、中年期のラットではそのような適応能力の低下が観察された。

研究成果の概要(英文)：During exercise, oxygen tension in the active muscle falls to 1/10 of resting value. This hypoxic stimulus facilitates an accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ), and causes various adaptive changes in skeletal muscle. This study was designed to examine how microRNAs react to acute and/or chronic exercise. The present results suggest that exercise training suppresses expression of anti-angiogenic microRNAs, thus facilitate capillary growth, in young rats. However, in aged-rats, exercise training upregulates both anti- and pro-angiogenic microRNAs, thereby exercise-induced capillary growth may be slightly suppressed.

研究分野：運動生理学

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：運動生理学 スポーツ生理学 酸素センシング機構 血管新生 マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素環境への暴露, 運動, 虚血などによる組織への低酸素刺激は, 組織酸素センサーを介して低酸素誘導因子 (HIF)  $-1\alpha$  の発現を引き起こし, エリスロポエチンの分泌増加, 無氣的解糖系酵素活性増加, 毛細血管網の再構築等の適応性変化を惹起することが知られている. この「組織酸素センサー」に関しては, 以前から様々なモデルが考えられてきたが, 現在は2001年にKaelinとRatcliffeのグループが発表したモデルが有力とされている. そのモデルでは, 通常の状態では, HIF- $1\alpha$  は HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase (HIF-PH) の作用によって hydroxylation され, それが von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) の修飾するユビキチン化プロセスを活性化するため, HIF- $1\alpha$  は常に ubiquitin-proteasome pathway で分解されている状況にある. 一方, HIF-PH が作用するには酸素分子と  $Fe^{2+}$  が必要であるため, 低酸素状態やキレーター存在下では, HIF-PH の作用が抑制されることによって HIF- $1\alpha$  が安定化し, 様々な適応性変化が惹起される. 骨格筋における運動時の局所的な低酸素状態や低酸素暴露時に生じる適応反応もこのモデルで説明できると考えられる.

近年, マイクロ RNA が生体の適応反応を調節する役割を果たすことが報告され, 数多くの研究がなされている. 組織酸素センシング機構にもマイクロ RNA の関与が報告され, それらは hypoxia-regulated microRNAs と総称されている. マイクロ RNA [miR-92-1] の発現が多いと酸素センシング機構における VHL タンパクの発現量が増加し, それに伴って HIF- $1\alpha$  と VEGF 発現が増えることが報告されている. また, HIF- $1\alpha$  のターゲットとなる [miR-210] は, 低酸素刺激による細胞増殖作用に関与すると考えられている. しかしながら, これまでの報告は腫瘍細胞などを用いた生体外実験によるものであり, 生体内特に骨格筋や心筋において, 低酸素刺激による適応反応にマイクロ RNA が関与するかどうかは報告されていない.

### 2. 研究の目的

本研究では, ラットにおいて EDHB 投与による低酸素刺激が, 骨格筋及び心筋におけるマイクロ RNA 発現に及ぼす影響を観察し, さらに運動トレーニングとの相互作用, 加齢による影響も検討することを目的とした.

### 3. 研究の方法

(1) 実験 1 : prolyl hydroxylase (PHD) 抑制による低酸素刺激が, 骨格筋における低酸素誘導因子 (HIF)  $-1\alpha$  の発現に及ぼす影響

ラットに ethyl-3, 4-dihydroxybenzoate

(EDHB) を 100mg/Kg 腹腔内に投与した. また, トレーニング群のラットには, 10 日間の自発走行運動を負荷した. トレーニング期間の 3 日目から 5 日目及び 8 日目から 10 日目に EDHB の投与を行った. 投与及びトレーニング終了後, ヒラメ筋を摘出し, 細胞質画分および核画分のタンパク質を抽出し, ウェスタンブロット法によってタンパク質の発現を分析した. また, 筋の横断切片を酵素組織化学的手法によって毛細血管を染色し, 毛細血管分布を分析した.

(2) 実験 2 : 持久的トレーニング初期段階における低酸素誘導因子 (HIF)  $-1\alpha$  とその標的遺伝子の発現動態, および microRNA の関与.

12 週令の Wistar 系雌ラットを用い, 運動群にはトレッドミル走行運動 (25m/min, 15-42min/day, 20% grade) を 3, 6, 10 日間負荷した. ヒラメ筋 (SO), 腓腹筋の赤筋部位 (Gr), 及び左心室 (LV) の RNA を抽出し, RT-PCR 法により mRNA と microRNA の発現量を分析した.

(3) 実験 3 : 高齢のラットにおける急性運動および運動トレーニングによる HIF- $1\alpha$  とその標的遺伝子の発現動態, および microRNA の発現.

12 ヶ月令の Wistar 系雌ラットを用い, 運動トレーニング群にはトレッドミル走行運動 (18-20 m/min, 40-60 min/day, 5% grade, 5 days/week) を 3 週間負荷した. 急性運動群には, 18m/min, 40 min, 5% grade のトレッドミル走行運動を負荷した. 急性運動及び最終トレーニング終了の 5 時間後に, 筋サンプルを摘出した. 筋横断切片を作成し, 酵素組織染色により毛細血管分布を分析した. 腓腹筋外側頭内側の赤筋を多く含む部位 (Gr) より RNA を抽出し, RT-PCR 法により mRNA と microRNA の発現量を分析した.

### 4. 研究成果

#### (1) 実験 1

PHD 投与及びトレーニングによって, 有意な毛細血管新生が観察され, 投与+トレーニング群で最も大きな増加を示した. EDHB 投与によって HIF- $1\alpha$  タンパク発現が有意に増加 (3.1 倍) したが, トレーニング群 (2.7 倍) とトレーニング+投与群 (2.6 倍) では増加がみられたものの, 有意差は観察されなかった. HIF- $1\alpha$  の標的遺伝子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は, EDHB 投与群 (2.5 倍), トレーニング群 (2.3 倍) およびトレーニング+投与群 (2.3 倍) すべてにおいて有意な増加が観察された. VEGF の受容体である VEGFR-1 と VEGFR-2 の発現には有意な変化が観察されなかった. これらのことから, EDHB による PHD の抑制によって HIF- $1\alpha$  と VEGF の

発現が顕著に増加すること、また運動依存性血管新生を促進することが示唆された。

### (2) 実験 2

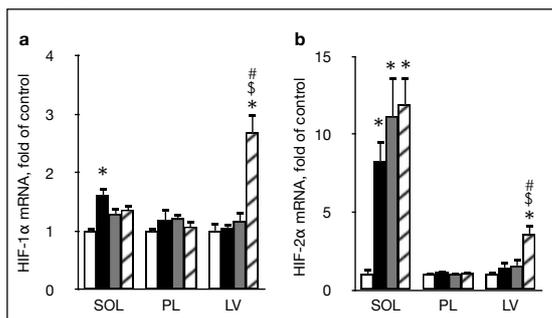


図 1 運動トレーニング初期段階における HIF-1 $\alpha$  (a) と HIF-2 $\alpha$  (b) mRNA の変化

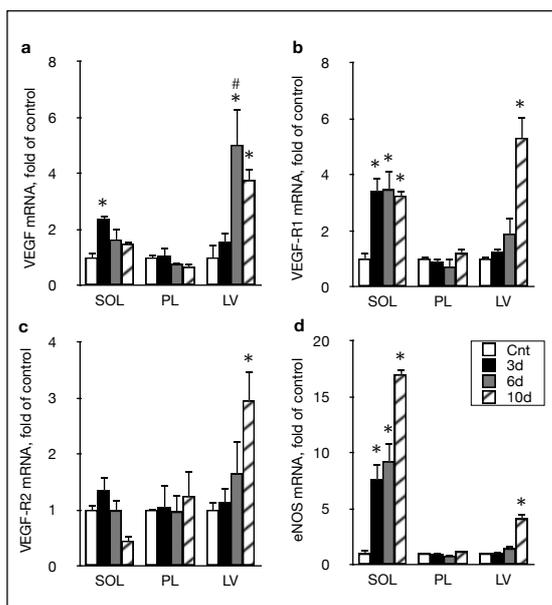


図 2 運動トレーニング初期段階における VEGF (a), VEGF-R1 (b), VEGF-R2 (c), eNOS (d) mRNA の変化

HIF-1 $\alpha$  mRNA は S0 で 3 日後, Gr で 3, 10 日後, LV で 10 日後に有意に増加した(図 1)。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) (図 2) と転写因子 PU. 1 の mRNA もこれとほぼ同様の变化を示した。HIF の分解酵素である PHD2 の mRNA は S0 で 6, 10 日後, Gr と LV では 10 日後に有意な増加がみられた。LV では miR-20b が 6, 10 日後に有意に減少していた (図 3)。以上のことから、トレーニング初期段階において、HIF-1 $\alpha$  とその標的遺伝子の発現が顕著に増加するとともに、PHD2 による HIF-1 $\alpha$  タンパクの分解を促進する negative feedback が進行していることが示唆された。また、運動によるこれらの適応性応答には、PU. 1 の発現増加と miR-20b の発現抑制が関与する可能性が示唆された。

### (3) 実験 3

トレーニングにより、Gr 部位の毛細血管分布 (capillary-to-fiber ratio) が約 5%と僅

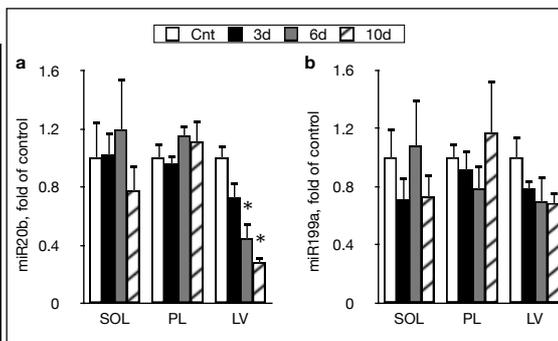


図 3 運動トレーニング初期段階における microRNA20b (a) 199a (b) 発現の変化

かであるが統計的に有意な増加を示した。トレーニング後、クエン酸合成酵素活性は約 22%の増加傾向 (P=0.07)、ヘキソキナーゼ活性は約 62%有意な増加を示した。HIF-1 $\alpha$ 、-2 $\alpha$  mRNA とともに、トレーニング後に増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) (図 4)、VEGF 受容体 (VEGF-R1)、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) mRNA も同様の傾向を示し、有意な変化は見られなかった。VEGF-R2 mRNA の発現は、トレーニング後に約 2 倍の有意な増加を示した (図 4)。血管新生を促進すると考えられている miR-194、-199a、-210、また血管新生を抑制すると考えられている miR-20a、-20b、-195 の発現が、トレーニング後有意に増加していた。急性運動では、本研究で観察した全ての mRNA と microRNA に有意な変化は認められなかった。以上のことから、高齢のラットにおいても、持続的トレーニングによって骨格筋毛細血管の新生が顕著に生じるが、それは VEGF の発現増加よりもその受容体 VEGF-R2 の発現増加に起因することが示唆された。研究代表者の先行研究では、若年ラットでは急性運動によって VEGF mRNA 発現が 1.6 倍有意に増加することが観察されていることから、加齢によって急性運動に対する VEGF 発現応答が減弱することが示唆された。また高齢ラットでは、トレーニング後に血管新生を促進する microRNA と抑制する microRNA 両者の発現が亢進していることから、さらなる血管新生が起りにくい

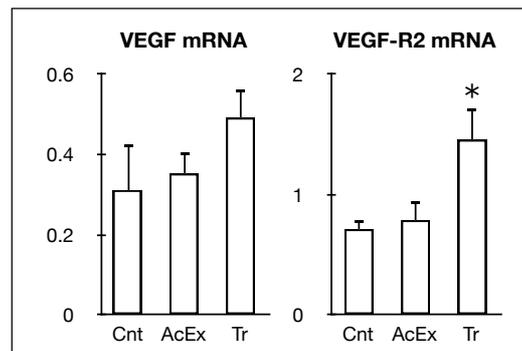


図 4 中年期ラットにおける VEGF, VEGF-R2 mRNA 発現の変化

環境になっていることが示唆された。

#### 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3件)

(1) Suzuki J: Influences of amino acid supplementation on capillary growth in the heart and skeletal muscles. Journal of Physical Fitness and Sports Medicine 2(2), 237-241, 2013. (査読有)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/2/2/2\\_237/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/2/2/2_237/_article)

(2) Suzuki J: Changes in HIF $\alpha$  and angiogenic gene expression in the initial phase of exercise training in rat skeletal and cardiac muscles. Advances in Exercise and Sports Physiology 19(1), 7-13, 2013. (査読有)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009611438>

(3) Suzuki J: The effects of prolylhydroxylase inhibitor treatment on capillarization in rat soleus muscle. Advances in Exercise and Sports Physiology 18(2), 39-46. (査読有)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009553563>

[学会発表] (計4件)

(1) 鈴木淳一: 骨格筋における毛細血管新生  
日本体育学会第64回大会(立命館大学)  
2013年8月

(2) 鈴木淳一: フェルラ酸の投与が骨格筋毛細血管網及び運動による低酸素誘導因子(HIF)とmicroRNAの発現におよぼす影響.  
第21回日本運動生理学会大会(東京国際大学) 2013年7月

(3) 鈴木淳一: 運動による骨格筋毛細血管網の適応性変化: シンポジウム II 「骨格筋組織の酸素代謝・微小循環の動態と適応」  
第21回日本運動生理学会大会(東京国際大学) 2013年7月

(4) 鈴木淳一: 持久的トレーニング初期段階における低酸素誘導因子(HIF)-1 $\alpha$ とその標的遺伝子及びmicroRNAの発現. 日本運動生理学会第20回大会(筑波大学) 2013年7月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 淳一 (SUZUKI, Junichi)

北海道教育大学・教育学部・教授

研究者番号: 80261379

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: