

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700772

研究課題名(和文) 筋萎縮の予防・治療法の新規標的分子となるmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNAs as molecular targets for the prevention and treatment of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮に対する予防・治療法の新規標的分子を同定するために、細胞・動物モデルを用いて筋萎縮に関係するmicroRNAの探索を行った。本研究により、miR-503が筋萎縮関連遺伝子の発現誘導に關与すること、老齡ラット・マウスの骨格筋でmiR-196aの発現が低下し、酸化ストレス応答に關与している可能性が示唆された。今後の詳細な解析により、これらのmicroRNAが筋萎縮の予防・治療における新たな標的分子としての有用性が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 identify novel molecular targets for the prevention and treatment of skeletal muscle atrophy, we searched microRNAs associated with skeletal muscle atrophy using both cell culture and animal models. Our results showed that miR-503 regulated the expression of muscle atrophy-related genes and that miR-196a, whose expression was decreased in the skeletal muscle of aged rats and mice, was associated with oxidative stress response. More detailed analysis would reveal the usefulness of these microRNAs as molecular targets for skeletal muscle atrophy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：筋萎縮 microRNA

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の萎縮は、加齢、廃用(寝たきり)、ステロイドやスタチンなどの薬剤の副作用、悪性腫瘍による悪液質、神経筋疾患など様々な原因で引き起こされる病態であり、高齢者・患者の QOL (生活の質) を著しく低下させる。筋力トレーニングは筋萎縮に有効な数少ない予防・治療法であるが、対象者の状態により適用できないケースが多い。筋力トレーニングに代わるまたは併用できる予防・治療法が求められており、多くの企業・大学がその開発に取り組んでいるが、未だ実用化に至ったものはない。新たな予防・治療法の開発には新規標的分子を同定することが重要であると考えられる。

MicroRNA (miRNA) は低分子 RNA の一種であり、標的となる mRNA に結合し、mRNA の分解や翻訳抑制を介して、転写後のレベルで遺伝子発現を制御する。MiRNA は、細胞増殖、細胞死、分化など様々な生物学的プロセスに関与すると考えられ、癌や発生の分野で盛んに研究がなされてきた。最近では、糖尿病、肥満、リウマチ、変形性関節症など様々な疾患との関係も報告されている。しかしながら、筋萎縮と miRNA の関連についての報告は限られており、筋萎縮に係る miRNA は未だ多く存在するものと予想される。

これまで前立腺癌の抗癌剤耐性に関与する miRNA を同定してきた (Biochem Biophys Res Commun 2008 377:114、J Biol Chem 2010 285:19076) 経験から、筋萎縮に対する予防・治療法の新規標的分子として miRNA に着目することを着想した。また、これまでの成果として、miRNA マイクロアレイ解析により、マウス由来 C2C12 筋芽細胞で筋萎縮に伴い発現変化を示す miRNA を同定している。具体的には、筋萎縮モデルでよく使用されるデキサメタゾン (合成糖質コルチコイド) とロバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) 投与により、2つのモデルで共通して発現変化を示す miRNA を選別し、筋萎縮に係る可能性のある miRNA を数種類同定している。

2. 研究の目的

骨格筋の萎縮は、老化や疾患など様々な原因で引き起こされ、高齢者・患者の QOL を著しく低下させる。筋萎縮に対する新たな予防・治療法の開発には新規の標的分子の同定が重要である。本研究では、新規標的分子の候補として、近年様々な疾患との関係が明らかになってきている miRNA に着目し、細胞・動物モデルを用いて筋萎縮に係る miRNA を同定する。さらに、同定した miRNA のターゲット遺伝子の同定・機能解析を行い、筋萎縮における役割を明らかにし、筋萎縮の予防・治療法の新規標的分子としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞モデルを用いた筋萎縮に係る

miRNA の探索

miRNA マイクロアレイ解析で選別した miRNA について、定量 RT-PCR 法による再現性実験を実施し、筋萎縮誘導剤であるデキサメタゾンを曝露した C2C12 細胞で発現変化を示す miRNA を同定した。

同定した miRNA の阻害剤を C2C12 細胞に投与し、筋萎縮関連タンパクの遺伝子発現誘導に対する効果を調べた。

(2) 動物モデルを用いた筋萎縮に係る miRNA の探索

老齢ラット (25~28 ヶ月齢 Fischer344 ラット) 8 匹、若齢ラット (6~7 ヶ月齢 Fischer344 ラット) 8 匹から長指伸筋、ヒラメ筋を採取した。それぞれの骨格筋から RNA を抽出し、680 種類のラット miRNA のプローブが搭載されている Agilent Rat miRNA マイクロアレイ Rel.16.0 を用いて、マイクロアレイ解析を実施した。

マイクロアレイ解析結果から、若齢ラットと比較して老齢ラットで顕著に発現変化を示す数種類の miRNA を選別し、定量 RT-PCR 法による再現性実験を実施した。

老齢マウス (29 ヶ月齢 C57BL/6NCr マウス) 8 匹、若齢マウス (5 ヶ月齢 C57BL/6NCr マウス) 8 匹から長指伸筋、ヒラメ筋を採取した。それぞれの骨格筋から RNA を抽出し、老齢ラットで顕著に発現変動を示した miRNA について定量 RT-PCR を行った。

MiRNA 標的遺伝子予測アルゴリズム (TargetScan)、miRNA 標的遺伝子データベース (miRTarBase)、miRNA に関する文献を参照し、同定した miRNA の標的遺伝子の探索を行った。MiRNA の前駆体を C2C12 細胞に導入し、Western blot により候補標的遺伝子のタンパクレベルを調べた。また、miRNA 前駆体の導入による C2C12 細胞の表現型への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞モデルを用いた筋萎縮に係る miRNA の探索

これまでの研究成果により、筋萎縮誘導剤であるデキサメタゾンを、筋細胞に分化誘導した C2C12 細胞に曝露することにより、数種類の miRNA の発現が変動することを miRNA マイクロアレイ解析により明らかにしていた。これらの miRNA について定量 RT-PCR 解析を行った結果、マイクロアレイ解析と同様に、デキサメタゾン曝露により miR-503 の発現が増加していた (図 1)。このことから、デキサメタゾン曝露による筋萎縮に伴い、miR-503 の発現が誘導されることが分かった。

デキサメタゾン曝露による筋萎縮モデルでは、ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 の遺伝子発現が誘導され、タンパク質分解が亢進することで、筋細胞の萎縮が引き起こされる。そこで、筋萎縮における miR-503 の役割を明らかにするために、Atrogin-1 の遺伝子発現誘導に対する miR-503 の影響を調べた。

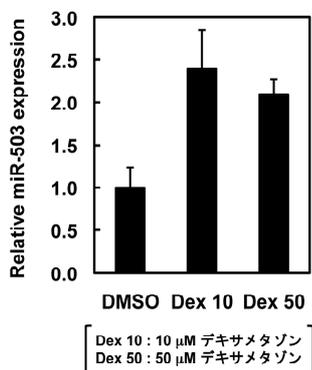


図1 デキサメタゾンによるmiR-503の発現変化

miR-503の阻害剤を導入したC2C12細胞にデキサメタゾンを曝露し、24時間後のAtrogin-1の遺伝子発現を調べた結果、miR-503阻害剤によってAtrogin-1の発現誘導が抑制されていた(図2)。このことから、miR-503がデキサメタゾンによるAtrogin-1の遺伝子発現誘導に関与することが明らかとなった。

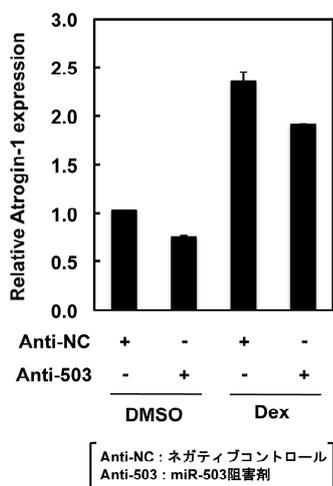


図2 miR-503の阻害剤によるAtrogin-1の発現抑制

これらの結果から、Atrogin-1の遺伝子発現誘導を伴う筋萎縮において、miR-503が新たな治療標的になる可能性が示唆された。(2)動物モデルを用いた筋萎縮に関するmiRNAの探索

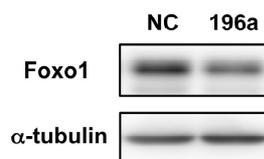
加齢に伴い骨格筋で発現変化を示すmiRNAを同定するために、老齢ラット(25~28ヶ月齢Fischer344ラット)および若齢ラット(6~7ヶ月齢Fischer344ラット)の骨格筋のmiRNAマイクロアレイ解析を実施した。解析の結果、加齢に伴い長指伸筋およびヒラメ筋で発現変化を示すmiRNAをそれぞれ9種類、4種類同定した。これらの内、3種類のmiRNAは、長指伸筋とヒラメ筋で共通して変化していた。

マイクロアレイ解析で同定したmiRNAの中から、顕著な発現変動を示した5種類のmiRNAを選抜し、定量RT-PCR法を用いて発現

変化の検証を行った。その結果、老齢ラットの長指伸筋およびヒラメ筋でmiR-34a、miR-29b、miR-21の発現が増加し、miR-196aの発現が低下していた。また、miR-206は長指伸筋でのみ発現が増加していた。このように、加齢に伴いラット骨格筋で発現変化を示すmiRNAとして、miR-34a、miR-206、miR-29b、miR-21、miR-196aを同定した。

次に、老齢ラットで同定したmiRNAが、他の生物種においても同様に発現変化を示すかどうかを明らかにするために、老齢マウス(29ヶ月齢C57BL/6NCrマウス)および若齢マウス(5ヶ月齢C57BL/6NCrマウス)から長指伸筋、ヒラメ筋を採取し、これら5種類のmiRNAについて定量RT-PCRを行った。解析の結果、老齢ラットと同様に、老齢マウスの長指伸筋およびヒラメ筋で、miR-34a、miR-29bの発現が増加し、miR-196aの発現が低下していた。また、miR-206の発現は長指伸筋で顕著に増加し、ヒラメ筋では僅かに増加していた。miR-21については、ラットとは異なり、いずれの筋においても発現変化を示さなかった。このように、加齢に伴いラットおよびマウスの骨格筋で発現変化を示すmiRNAとして、miR-34a、miR-206、miR-29b、miR-196aを同定した。

転写因子Foxo1がmiR-196aの標的遺伝子であることが報告されている。また、Foxo1を含むFoxoファミリーは骨格筋のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている。そこで、骨格筋におけるmiR-196aとFoxo1の関連を明らかにするために、C2C12細胞にmiR-196aの前駆体を導入したところ、Foxo1のタンパクレベルが低下した(図3)。この



NC: ネガティブコントロール
196a: miR-196a前駆体

図3 miR-196aの前駆体によるFoxo1の発現抑制

ことから、筋細胞においてもmiR-196aがFoxo1の発現を制御していることが分かった。Foxo1は抗酸化酵素の遺伝子発現を制御することから、miR-196aが酸化ストレス応答に関与している可能性が考えられた。そこで、C2C12細胞にmiR-196a前駆体を導入し、酸化ストレスに対する影響を調べた。その結果、miR-196aの導入によりH₂O₂処理に対する細胞生存率が低下し、miR-196aの増加により酸化ストレスに対する抵抗性が減弱することが分かった(図4)。以上の結果から、老齢ラット・マウスの骨格筋では、加齢により増大する酸化ストレスに適応するために、miR-196aの発現が低下している可能性が示

唆された。

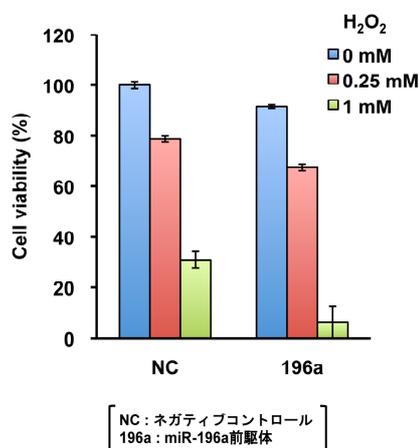


図4 酸化ストレスに対するmiR-196aの過剰発現の影響

まとめ

今後、本研究で同定した miRNA のより詳細な解析を行うことにより、筋萎縮の予防・治療の新たな標的分子としての有用性が検証できるものと期待される。

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)

[学会発表](計2件)

Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka. Identification of potential biomarkers for mitochondrial diseases by global gene expression analysis. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 2013.11.6-7.

Yasunori Fujita, Toshio Kojima, Kyojiro Kawakami, Taku Kato, Takashi Deguchi, Masafumi Ito miR-130a inhibits proliferation of paclitaxel-resistant prostate cancer cells. 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013.12.3-6.

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