

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282198

研究課題名(和文)骨格筋メカニカルストレス適応におけるマイクロRNAの役割

研究課題名(英文)The role of microRNAs in mechanical stress-induced muscle adaptation

研究代表者

秋本 崇之 (AKIMOTO, Takayuki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00323460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ほぼすべてのmiRNAを欠損する遺伝子改変マウス(Dicer1 KO)を対象に、メカニカルストレス除負荷/過負荷による骨格筋の変化を解析することにより、メカニカルストレス適応におけるmiRNAの役割を概観した。その結果、このマウスは心筋と横隔膜の異常により、6週齢までにすべて死亡する事が分かった。これは筋中のマイクロRNAが生後の生体恒常性維持機構に重要な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of microRNA on mechanical stress-induced muscle adaptation by using Dicer1 knock-out mice (Dicer1 KO). As a result, the muscle-specific Dicer1KO mice died by 6 weeks due to dysfunction of muscles, suggesting that microRNAs in muscle play important roles in homeostasis of muscles.

研究分野：筋生物学

キーワード：筋線維タイプ 転写後制御 ノンコーディングRNA 可塑性 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

生体には重力、身体運動、拍動、血流などにより様々な物理的刺激（メカニカルストレス）が負荷されており、それらのストレスに応答して生体機能が調節されていることや、長期的な生体組織の再構築（リモデリング）が行われていることが明らかになってきた。例えば、骨には重力により長軸方向への圧縮応力が負荷されており、関節軟骨では歩行などで生じる静水圧によってコラーゲンなどの細胞外マトリクス産生が影響を受けていると報告されている。逆にメカニカルストレスが負荷されない、あるいは激減する微重力環境、無動、不活動などでは廃用性萎縮が惹起され、骨量の減少（骨粗鬆）が起こる。これらの現象は非常にダイナミックであり、生物学的にも興味深いと同時に高齢社会を迎えた我が国における高齢者の寝たきりなどの今日的課題とも関係性が深い。このため、骨格筋等の運動器がメカニカルストレスを積極的に受容して組織の恒常性を維持する仕組みを理解することは、学術的にもまた社会的にも有意義であると考えられる。しかし、これらの組織を構成する細胞がどのようにメカニカルストレスを受容して、どのような細胞内情報伝達に変換し、特定の遺伝子（群）の発現を調節することによって、その表現型を変化させるかについては理解が進んでいない。申請者は、これまでに身体運動をモデルにメカニカルストレスによる骨格筋の遺伝子発現を解析し、メカニカルストレス依存性の細胞内情報伝達経路をいくつか特定してきた。またこの研究を遂行中に、メカニカルストレスによって発現が変化するマイクロRNA (miRNA) を見いだした。

miRNA は約 23 塩基長ほどのタンパク質をコードしない RNA で、主に標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に結合し、翻訳阻害もしくは標的遺伝子を直接分解するこ

とで、その標的遺伝子の発現を制御すると考えられている⁽¹⁾ (図 1)。バイオインフォマティクス解析によると、全遺伝子の約 1/3 が miRNA によって制御されていると推測されている。

我々は文部科学省 科学研究費 若手研究 (A) の助成を受け、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、メカニカルストレスによって発現が変化する miRNA をスクリーニングし、miR-23a/b, miR-140 を含む複数のメカニカルストレス誘導性 miRNA を同定した。これらメカニカルストレス誘導性 miRNA のうち、骨格筋における miR-23a の機能解析により、miR-23 は骨格筋萎縮に重要な 2 つの異なる分子 (MAFbx/atrogen-1 と MuRF1) の翻訳を同時に抑制することによって糖質コルチコイド依存性の筋萎縮を抑制することを報告した。続いて、患者の筋生検サンプルを用いて、miR-23a による転写コアクチベータ PGC-1 α の翻訳抑制が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態と関連する可能性を示した。

一方、メカニカルストレスによってその発現が変化する miR-140 は筋、骨、軟骨などに発現しており、最近、miR-140 が軟骨発生と恒常性維持に重要な役割を果たしていることが報告された。現在明らかになっている miR-23 や miR-140 の機能的な重要性から、これらの miRNA が骨格筋におけるメカニカルストレス適応においてどのような役割を果たしているかを詳細に検討することは、「身体運動による骨格筋の適応」に関する分子メカニズムを解明する上でブレイクスルーとなる可能性があると考えられる。また、これらの miRNA がどのような生理的条件下で、どのような発現制御を受けているかを明らかにすることは、骨格筋の適応メカニズムを明らかにする上で非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではメカニカルストレス誘導性 miRNA である miR-23 を中心に、メカニカルストレス誘導性 miRNA が骨格筋メカニカルストレス適応に果たす役割について、miRNA 遺伝子改変マウスを用いて解析するとともに、これらの miRNA の発現の調節に関する検討を行う。

3. 研究の方法

ほぼすべての miRNA を欠損する遺伝子改変マウス (Dicer1 KO) を対象に、メカニカルストレス除負荷/過負荷による骨格筋の変化を解析することにより、メカニカルストレス適応における miRNA の役割を概観する。メカニカルストレス除負荷のモデルとして、座骨神経切断、後肢懸垂、下肢固定を、メカニカルストレス過負荷のモデルとして、自発走とトレッドミルを用いる。Dicer1 の欠損マウスは胎生致死であるため、本研究では Dicer1 floxed マウスを用いたコンディショナルノックアウトマウスを実験に供する。Dicer1 floxed マウスはすでに B. Harfe 准教授 (University of Florida) より供与され、当研究室で維持されている。Harfe のグループからの報告⁽³⁾では、Dicer1 floxed と MyoD-Cre を交配して得られた骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスは生後すぐに死亡するとされている。このため我々は、骨格筋特異的かつ、成体になりうる個体を得るため、各種 Cre リコンビナーゼのトランスジェニックマウスとの交配を試行し、Ckmm-Cre マウス (Harvard Medical School の Kahn 教授より分与) との交配で、Dicer1 を骨格筋において欠損させたマウスが生存可能であることを確認している。

その後、バイオインフォマティクスを用いて責任 miRNA / ターゲット遺伝子を同定し、これらを欠損したマウスおよび、in vitro の実験系を用いて、その詳細なメカニ

ズムを明らかにする

4. 研究成果

骨格筋においてほぼすべての miRNA を欠損する遺伝子改変マウス (Dicer1 筋 KO) は心筋と横隔膜の異常により、6 週齢までにすべて死亡する事が分かった。これは筋中のマイクロ RNA が生後の生体恒常性維持機構に重要な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えられた。

また miR-23 を欠損するマウスはメンデル比に従って生まれてくるが、その骨格筋の適応に野生型マウスとの差が認められた。今後、この詳細なメカニズムを検討する必要があると考えられた。

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 6 件)

1. A. P. Russell, S. Lamon, H. Boon, S. Wada, I. Guller, E. L. Brown, A. V. Chibalin, J. Zierath, R. J. Snow, N. K. Stepto, G. D. Wadley, T. Akimoto. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short term endurance training. *J Physiol*, 591(Pt 18):4637-4653, 2013
2. S. Sawada*, M. Kon*, S. Wada, T. Ushida, K. Suzuki, T. Akimoto#. Profiling of circulating microRNAs after a bout of acute resistance exercise in humans. *PLoS ONE*, 8(7):e70823, 2013
3. S. Sawada, T. Akimoto, M. Takahashi, R. Sakurai, S. Shinkai, T. Ushida, Y. Fujiwara, K. Suzuki. Effect of aging and sex on circulating microRNAs in humans. *Adv Aging Res*, 3, 152-159, 2014
4. S. Wada, Y. Kato, S. Sawada, K. Aizawa, J. H. Park, A. P. Russell, T. Ushida, T. Akimoto#. MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle. *Pflügers Archiv*, 467(2), 389-398, 2015
5. J. H. Park*, S. Wada*, T. Ushida, T. Akimoto#. The microRNA-23a has limited roles in bone formation and homeostasis in vivo. *Physiol Res*,

- 64(5):711-719, 2015
6. Y. Nakamura*, S. Miyaki*, H. Ishitobi, S. Matsuyama, T. Nakasa, N. Kamei, T. Akimoto, Y. Higashi, M. Ochi. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes containing microRNAs accelerate skeletal muscle regeneration. FEBS Letters, 589(11):1257-1265, 2015

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 秋本崇之. 骨格筋可塑性に関わるマイクロ RNA. 第 5 回分子骨格筋代謝研究会, 京都, 2013.6
2. S. Wada, Y. Kato, M. Okutsu, S. Miyaki, K. Suzuki, Z. Yan, S. Schiaffino, H. Asahara, T. Ushida, T. Akimoto. Translational suppression of atrophic regulators by miR-23 integrates resistance to skeletal muscle atrophy. 35th Naito conference, Sapporo, 2013.7
3. 秋本崇之. メカニカルストレスと細胞分化. 第 21 回日本運動生理学会, 川越, 2013.7
4. 秋本崇之. 運動によるヘルス・ベネフィットに関する骨格筋マイクロ RNA. 立命館大学総合科学技術研究機構生活習慣病治療の最適化プロジェクト. 草津, 2013.8
5. T. Akimoto. MicroRNAs in muscle plasticity. Brain Korea 21 plus conference in Dankook University. Cheonan, 2014.6 (invited)
6. 秋本崇之, 和田正吾, 加藤義雄, 沢田秀司, 相澤勝治, 朴鐘薫, 牛田多加志. MicroRNA-23a は持久性運動による筋適応に関与しない. 第 69 回日本体力医学会学術総会, 長崎, 2014.9
7. T. Akimoto. Young researchers lead the way in Sports Science. Brain Korea 21 plus conference in Dankook University. Cheonan, 2014.11 (invited)
8. 秋本崇之. 細胞間コミュニケーションツールとしてのマイクロ RNA. シンポジウム「骨格筋からのメッセージ - 内分泌臓器としての骨格筋 -」. 第 66 回日本体育学会, 東京, 2015.8 (invited)

〔図書〕(計 1 件)

1. 秋本崇之. 骨格筋(筋線維タイプ移行). (分担執筆: 正田純一編)分子スポーツ医学. 医学のあゆみ増刊, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

<http://www.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/research/03.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋本崇之 (AKIMOTO, Takayuki)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 00323460

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: