

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22815

研究課題名（和文）骨格筋細胞に備わっている「筋萎縮抵抗性プログラム」の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the resistant gene program against muscle atrophy in skeletal muscle cells

研究代表者

近藤 茂忠（KONDO, Shigetada）

大阪公立大学・大学院生活科学研究科 ・教授

研究者番号：40304513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、筋萎縮ストレスに対する骨格筋細胞独自の適応メカニズムを明らかにした。具体的には、申請者が見出した骨格筋特異的な新規長鎖非コードRNA（Irs1 lncRNA）の標的mRNAがRBおよびp16であることを同定した。さらに、Irs1 lncRNAが相補的な配列を介してこれら標的mRNAをサイレンシングすること、その結果筋管細胞の脱分化を誘導し、筋萎縮抵抗性の表現型を獲得することを見出した。さらに、Irs1 lncRNAとホスト遺伝子（Irs1 mRNA）の転写調節機構について検討し、これら2つは筋細胞の分化段階特異的に転写制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、廃用性筋萎縮を引き起こすメカニズムについては、筋特異的な蛋白質分解システムの活性化（Atrogenesシステム）が国内外で精力的に研究され、分子レベルでその詳細が明らかにされてきている。一方、筋細胞がもつ「萎縮ストレスに対する適応能力」という観点から、筋萎縮を捉えた研究は未だない。本研究成果の学術的意義は、骨格筋細胞に備わった筋萎縮抵抗性プログラムを明らかにし、廃用性筋萎縮の解決へ向けた新たな可能性を示したことである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarified the adaptive mechanism of skeletal muscle cells (myotubes) against muscle atrophy stress. We identified the skeletal muscle-specific novel long non-coding RNA (Irs1 lncRNA). We demonstrated that the target mRNAs of Irs1 lncRNA are RB and p16. Furthermore, we found that Irs1 lncRNA silences these target mRNAs through complementary sequences, resulting in the dedifferentiation of myotube cells and the acquisition of a phenotype resistant to muscle atrophy stress. Furthermore, we investigated the transcriptional regulatory mechanism of Irs1 lncRNA and the host gene (Irs1 mRNA), and revealed that these two RNAs are transcriptionally regulated in a stage-specific manner in muscle cell differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋細胞 廃用性筋萎縮 萎縮ストレス

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国では、寝たきり患者が急増している。寝たきりによって骨格筋への機械的負荷が減少（筋萎縮ストレス）するため、骨格筋量は著しく減少し（廃用性筋萎縮）、その結果、寝たきり状態の回復が妨げられることが医療的・社会的に大きな問題となっている。しかしながら、運動を除けば廃用性筋萎縮に対する有効な予防法や治療法は未だ確立されていない。現在、廃用性筋萎縮を引き起こすメカニズムについては、筋特異的な蛋白質分解システムの活性化(Atrogenes システム)が国内外で精力的に研究され、分子レベルでその詳細が明らかにされてきている。一方、筋細胞がもつ「筋萎縮ストレスに対する適応能力」という観点から、筋萎縮を捉えた研究は未だない。本研究では申請者が見出した骨格筋特異的な新規の長鎖非コード RNA が筋萎縮抵抗性を獲得させる分子メカニズムを明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、筋萎縮ストレスに対する骨格筋細胞独自の適応メカニズムを明らかにする。具体的には、申請者が見出した骨格筋特異的な新規の長鎖非コード RNA (Irs1-lncRNA) が最終分化した筋管細胞に脱分化を誘導して、筋萎縮抵抗性を獲得させるメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Irs1-lncRNA の標的 mRNA の同定と機能解析

In vitro 転写システムで作製した Irs1-lncRNA を用いて、萎縮抵抗性を獲得した筋管細胞抽出液から RNA プルダウン法により Irs1-lncRNA の標的 mRNA を取得する。Irs1-lncRNA と共沈降した mRNA を鋳型に逆転写反応を行い cDNA を得たのち、PCR 法で増幅し、DNA シークエンス解析によって標的 mRNA を同定する。

Irs1-lncRNA が標的 mRNA 発現に及ぼす影響を検討するために、Irs1-lncRNA と標的 mRNA を発現するプラスミドを作製し、骨格筋細胞に共発現させた後、標的 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により解析する。

Irs1-lncRNA と標的 mRNA の結合を検討するために、Irs1-lncRNA と標的 mRNA の 2 次構造予測と相補的配列予測を行う。予測された相補的配列に変異を導入し、RNA プルダウン解析によって Irs1-lncRNA と標的 mRNA の結合への影響を検討する。

#### (2) Irs1-lncRNA による標的 mRNA のサイレンシング機構の解析

種々の非コード RNA が標的 mRNA をサイレンシングする際に利用する分子群(SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, Stau1, AGO1, AGO2, Dicer, UPF-1, UPF-2) の関与について検討するために、これら分子の siRNA を用いてノックダウン解析を行い、Irs1-lncRNA による標的 mRNA のサイレンシングへの影響を解析する。また、Irs1-lncRNA から新たに小分子の非コード RNA が創出されるかについて解析するために、NuSieve3:1 アガロースゲルを用いたノーザンブロット解析を行う。

#### (3) Irs1-lncRNA による遺伝子発現解析

筋管細胞を用いた Irs1-lncRNA の機能獲得系（過剰発現）と、萎縮抵抗性の筋管細胞を用いた Irs1-lncRNA の機能喪失系（ノックダウン）を行い、Irs1-lncRNA によって制御される遺伝子群をマイクロアレイ解析により網羅的に解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Irs1-lncRNA の標的 mRNA の同定

最終分化させた筋管細胞に萎縮ストレスを与え、細胞周期の再活性化を指標にして萎縮抵抗性の筋管細胞を誘導する細胞モデルを構築した。萎縮抵抗性を獲得した筋管細胞を用いて、RNA プルダウン法により Irs1-lncRNA の標的 mRNA を 2 つ (RB および p16) 同定した。これら 2 つの遺伝子産物は、骨格筋細胞の脱分化制御において中心的な役割を果たす分子であった。

次に Irs1-lncRNA がこれら 2 つの標的 mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。Irs1-lncRNA と標的 mRNA を発現するプラスミドを作製し、骨格筋細胞に共発現させた結果、各標的 mRNA の発現量は著しく低下した。

次に、Irs1-lncRNA と標的 mRNA の配列解析を行った結果、Irs1-lncRNA は各標的 mRNA に対して短い相補鎖配列をもつことが分かった。そこでこれら相補鎖配列に変異を導入し RNA プルダウン解析を行ったところ、Irs1-lncRNA は各標的 mRNA に対して相補鎖配列に依存して結合すること、および相補鎖配列に依存して標的 mRNA をサイレンシングすることが分かった。

##### (2) Irs1-lncRNA による標的 mRNA のサイレンシング機構の解析

Irs1-lncRNA による各標的 mRNA のサイレンシングの分子メカニズムについて検討を行った。種々の非コード RNA が標的 mRNA をサイレンシングする際に利用する分子群 (SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, Stau1, AGO1, AGO2, Dicer, UPF-1, UPF-2) の関与について検討を行ったが、骨格筋特異的長鎖非コード RNA による各標的 mRNA のサイレンシングはこれら因子には依存していなかった。次に各分化段階の骨格筋細胞 (筋芽細胞、筋細胞、筋管細胞) において、Irs1-lncRNA から新たに小分子非コード RNA が創出されるかについて解析を行った。その結果、Irs1-lncRNA のプロセッシングはどの分化段階の骨格筋細胞でも起っていないことが分かった。

##### (3) Irs1-lncRNA による遺伝子発現解析

筋管細胞を用いた Irs1-lncRNA の機能獲得系 (過剰発現) 解析と、萎縮抵抗性の筋管細胞を用いた機能喪失系 (ノックダウン) 解析により、Irs1-lncRNA によって制御される遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、Irs1-lncRNA によって発現が変動する遺伝子群は標的 mRNA (RB および p16) の制御遺伝子群と相関することが分かった。これら変動遺伝子群は骨格筋細胞の分化と脱分化に関係する一連の遺伝子群であることが解った。

##### (4) Irs1-lncRNA の転写制御機構の解析

最終分化させた筋管細胞に筋萎縮ストレスを暴露し、脱分化を誘導する環境下での Irs1-lncRNA の転写制御機構について検討を行った。Irs1-lncRNA のプロモーター解析を行い、Irs1-lncRNA の転写に関与する候補転写因子の絞り込みを行った結果、MyoD, MyoG, Sp1 が候補であることが分かった。次に、候補転写因子の結合領域を阻害するために各配列を含むデコイ LNA 2 本鎖 DNA を合成し解析を行った。加えて、候補転写因子のノックダウン解析も同時に行った。その結果、筋管細胞に筋萎縮ストレスを暴露すると、Sp1 が活性化して Irs1-lncRNA の転写が誘導されることを明らかにした。また、未分化な筋芽細胞や筋細胞に筋萎縮ストレスを暴露しても Sp1 は活性化せず、Irs1-lncRNA の転写活性化はおこらないことを明らかにした。

次に、宿主遺伝子 (Irs1 mRNA) の転写制御機構について検討を行った。Irs1 mRNA のプロモーター領域には 6 つの代表的な転写因子結合サイトがあり、転写因子について解析した結果、宿主遺伝子の転写には GRE, ERE 領域と C/EBP が重要であることが解った。以上の結果から、Irs1-lncRNA とその宿主遺伝子の転写制御は異なることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nonaka M, Kanouchi H, Torii S, Nagano H, Kondo S, Fujii A, Nagano M, Takenaka S.	4. 巻 87
2. 論文標題 Lactic acid induces HSPA1A expression through ERK1/2 activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 191-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac192.	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 -
1. 著者名 永野ひかる, 松山知菜未, 間部由佳理, 砂川実乃莉, 檜垣七菜子, 吉田萌恵, 近藤茂忠	4. 巻 18
2. 論文標題 大腸がん細胞における分子標的薬foretinib 抵抗性獲得メカニズムの解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Life Sci Res	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 間部由佳理, 永野ひかる, 吉田萌恵, 檜垣七菜子, 近藤茂忠	4. 巻 18
2. 論文標題 がん分子標的薬耐性化に対するエピガロカテキンガレートの効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Life Sci Res	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Nagano H, Tomida C, Yamagishi N and Teshima-Kondo S.	4. 巻 20
2. 論文標題 VEGFR-1 regulates EGF-R to promote proliferation in colon cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E5608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225608	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野ひかる, 間部由佳理, 近藤茂忠
2. 発表標題 食品機能性成分エピガロカテキンガレートによるがん分子標的薬抵抗性の克服
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田萌恵, 檜垣七菜子, 近藤茂忠
2. 発表標題 緑茶カテキン類によるがん悪性化関連分子群の阻害効果の検討
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 檜垣七菜子, 吉田萌恵, 近藤茂忠
2. 発表標題 フラボノイド類によるがん悪性化関連分子の阻害効果の検討
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田 知里, 山岸直子, 永野 ひかる, 近藤 茂忠
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanism by which VEGF-R inhibitor enhances migration of colon cancer cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永野 ひかる, 富田 知里, 近藤 茂忠
2. 発表標題 VEGF経路とEGF経路のクロストーク 大腸がん細胞の悪性化進展機構への寄与
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukari Manabe, Minori Sunagawa, Nanako Higaki, Moe Yoshida, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Elucidation of the acquired resistance mechanism to Epidermal growth factor receptor (EGF-R) targeted drug in human colon cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minori Sunagawa, Yukari Manabe, Nanako Higaki, Moe Yoshida, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Elucidation of the acquired resistance mechanism to HGF-R targeted drug in human colon cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moe Yoshida, Nanako Higaki, Yukari Manabe, Minori Sunagawa, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Anti-cancer effect of green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanako Higaki、Yukari Manabe、Minoru Sunagawa、Moe Yoshida、Hikaru Nagano、Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Anti-cancer effect of apigenin by targeting cancer-associated kinases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020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