

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03239

研究課題名(和文) 運動による骨格筋毛細血管ネットワーク再構築におけるマイクロRNAの役割

研究課題名(英文) Role of microRNAs in exercise-induced angiogenesis

研究代表者

秋本 崇之 (AKIMOTO, Takayuki)

早稲田大学・スポーツ科学大学院・教授

研究者番号：00323460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロRNA(miRNA)のプロセシングに必須の酵素であるDicerを欠損させることで、ほぼ全てのmiRNAを欠損するマウスと、特定のmiRNAを欠損するマウスを対象に、運動による骨格筋毛細血管ネットワーク再構築におけるmiRNAの役割についての解析を行った。

まず、薬剤誘導性にDicerを欠損させたマウスは、5週間以内に死亡したため、生命の維持においてmiRNAが重要な役割を果たしていることが示唆された。

一方、miR-23クラスターを欠損するマウスでは、運動による血管新生は正常であったため、血管新生におけるmiR-23クラスターmiRNAの役割は限定的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってマイクロRNAが生命維持に必須であることが示唆された。このため、マイクロRNAの機能を解析することは学術的にも社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined exercise-induced angiogenesis in mice lacking almost all miRNAs by deleting Dicer, an enzyme essential for microRNA (miRNA) processing and in mice lacking specific miRNAs.

First, the tamoxifen-induced Dicer knockout mice died within 5 weeks after tamoxifen administration, suggesting that miRNAs play an important role in maintaining life.

With regard to analysis using specific miRNA-deficient mice, even in the mice lacking miR-23 cluster miRNAs showed normal exercise-induced angiogenesis in response to endurance exercise training. These findings suggest that the role of miR-23 cluster miRNAs in exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle is limited.

研究分野：筋生物学, メカノバイオロジー

キーワード：骨格筋 メカニカルストレス 可塑性 血管新生 マイオカイン 適応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

身体運動が主に骨格筋の代謝を改善する事によって、糖尿病やメタボリックシンドローム等の代謝性疾患の予防や治療に効果をもたらすことは一般に認知されているが、そのメカニズムに関してはあまり理解が進んでいない。

骨格筋はヒトの体重の約 40% をも占める人体最大の組織であり (Rolfe & Brown, *Physiol Rev*, 1997), 基礎代謝に要するエネルギーの約 30% が筋組織において消費され、運動時に増加するエネルギーのほぼ 100% が消費される (Gallagher et al., *Am J Physiol*, 1998)。

骨格筋を構成する筋線維はその収縮・代謝特性によって遅筋と速筋に大別される (Schiaffino, *Acta Physiol*, 2010)。遅筋は速筋に比べ、インスリン感受性、糖・脂質をエネルギー源とする好氣的代謝に優れ、またこれらを栄養する毛細血管やミトコンドリアに富んでいるため、運動がインスリン抵抗性を示す代謝性疾患の予防や治療に有効であるエビデンス (すなわち代謝性疾患に対する運動療法の科学的根拠) は、持久的な運動による筋線維タイプの遅筋化に帰する事ができると考えられる。

図 1 に持久性運動による骨格筋遅筋化に関連する表現型の時系列変化を示す。遅筋型ミオシンやミトコンドリア関連タンパクの増加は運動開始 2 週間後から認められるのに対し、骨格筋中毛細血管新生は運動開始 1 週間後よりすでに認められている (Waters et al., *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004)。これらのことから、遅筋型骨格筋を誘導するためには、遅筋型骨格筋を取り巻く毛細血管新生が必要である可能性が示唆される。しかし、骨格筋組織を構成する、筋線維、筋衛星細胞、血管内皮細胞等の細胞がどのような相互作用をすることによって、その表現型を変化させるかについてはあまり理解が進んでいない。

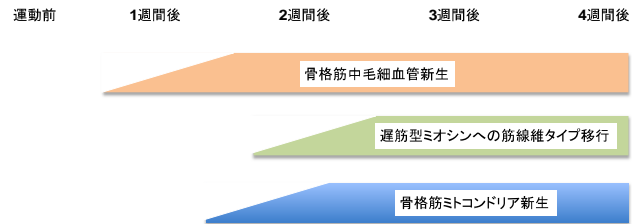


図 1. 持久性運動による骨格筋の時系列変化の概念図
持久性運動トレーニングによって骨格筋には様々な変化が起こる。まず、運動開始約 1 週間後に骨格筋中の毛細血管の新生が観察される。次いで、運動開始 2 週間以降に骨格筋線維のミトコンドリア新生、遅筋型ミオシンへの筋線維タイプ移行が起こる。骨格筋自体の機能的変化に先行して、骨格筋を取り巻く毛細血管の新生が起こる事に注目した。

申請者らは、これまでに運動をモデルに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 (Akimoto et al., *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004; Akimoto et al., *J Biol Chem*, 2005)。またこの一連の研究を遂行中に、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 (Wada et al., *J Biol Chem*, 2011; Russell et al., *J Physiol*, 2012)。

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 mRNA 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 (Bartel, *Cell*, 2004) (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。

従来 RNA は細胞外に存在しえないと考えられていたが、最近、血液や尿をはじめとした体液中において miRNA が安定して存在することが明らかにされ、細胞外に存在する分泌型の miRNA が注目されるようになった。分泌型 miRNA はエクソソームと呼ばれる小胞や RNA 結合タンパク質複合体に内包されて細胞外へ分泌され、周辺に存在する細胞や組織液を介して移動し、標的細胞の遺伝子発現を制御することが示唆されている。これらのことから、分泌型 miRNA はホルモンやサイトカインと同様に細胞間コミュニケーションを担っていることが推察される。

2. 研究の目的

本研究では miRNA が骨格筋適応に果たす役割について、骨格筋組織中に張り巡らされている毛細血管網と骨格筋の相互作用に着目し、これらの組織に由来する miRNA が持久性運動による骨格筋中の毛細血管ネットワークの再構築および骨格筋の遅筋化に果たす役割について、遺伝子改変マウスを用いて解析するとともに、血管および骨格筋におけるこれらの miRNA の毛細血管ネットワークの再構築と骨格筋の遅筋化への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではまず、骨格筋の持久性運動適応における miRNA の関与を概観するため、ほぼすべての miRNA を血管内皮細胞において欠損するマウス (Dicer1 血管 KO) および骨格筋においてそれらを欠損するマウス (Dicer1 筋 KO) を対象に、持久性運動による骨格筋適応を解析する。特に本研究では、持久性運動による骨格筋における毛細血管ネットワーク再構成について詳細に検討するため、抗 CD31 抗体を用いて毛細血管を染色した骨格筋切片を対象として、骨格筋毛細血管密度、骨格筋毛細血管新生 (BrdU 使用)、について蛍光顕微鏡を用いて観察する。また、動

脈リングアッセイを用いて血管内皮細胞の分化増殖活性を定量する。持久性運動適応のモデルとして、一過性のトレッドミル走行と持久性運動トレーニングを模した自発走を用いる。

全身性の *Dicer1* の欠損マウスは胎生致死である (Harfe et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005) 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 (O'Rourke et al. Dev Biol, 2007) 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 *Tie2-Cre* マウス (熊本大学山村研一先生より分与され、当教室で維持) あるいは、*VE-cadherin-Cre* マウス (医薬基盤・健康・栄養研究所より寄託済) との交配によって、血管特異的 *Dicer* 欠損マウスを得る。一方、骨格筋特異的 *Dicer* 欠損マウスでは、*Ckmm-Cre* (当研究室で維持) と交配を行う。同時にタモキシフェン誘導性に *Cre* リコンビナーゼ活性を発現する *CAG-cre/Esr1** マウス (当研究室で維持) と *Dicer1* floxed マウスを交配し、成熟後タモキシフェンで全身性に *Dicer1* を欠損させ、血管と骨格筋の miRNA による相互作用を排除した実験に供する。タモキシフェン誘導性の *Dicer1* 欠損については当教室において、5 日間、3 mg のタモキシフェンの投与により 80% 以上の *Dicer1* 欠損を認めている。

これら *Dicer1* 血管 KO マウスと *Dicer1* 筋 KO マウスを対象に、持久性運動による骨格筋適応を解析する。具体的には、それぞれの欠損マウスおよびコントロールマウス対象に自発走を行わせ、自発走前、1 週間後、2 週間後、4 週間後にマウスを解剖し、骨格筋持久性運動適応の表現型の時系列変化を解析する。

4. 研究成果

マイクロ RNA (miRNA) のプロセッシングに必須の酵素である *Dicer* を欠損させることで、ほぼ全ての miRNA を欠損するマウスと、特定の miRNA を欠損するマウスを対象に、持久性運動による骨格筋適応についての解析を行った。

まず、*Dicer1* floxed マウスと *Tie2-Cre* マウスとの交配によってごく少数の血管特異的 *Dicer* 欠損マウスを得たが、ほぼすべては胎生致死であった。このため、タモキシフェン誘導性に *Cre* リコンビナーゼを機能させる *CAG-Cre-ESR* マウスと *Dicer1* floxed マウスを交配し、産後全身性に *Dicer* を欠損させることが可能なマウスを作出した。このマウスでは、全身の組織において著名な *Dicer1* mRNA の減少を認め、ほとんどすべての miRNA について、その減少を認めたものの、ほぼ全ての miRNA について、その減少は 10-50% であった。これまでの *in vitro* の研究では、miRNA の半減期は 24-48 時間とされている。これらのことから、miRNA を生体内に長期間維持させる仕組みがあることが示唆された。また、このマウスはタモキシフェン投与後 5 週間以内に死亡したため、生命の維持において miRNA が重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、このマウスを用いて、運動による骨格筋毛細血管ネットワーク再構築における miRNA の役割について検討したところ、予想に反して、運動による毛細血管新生は野生型マウスと同程度であった。

一方、特定の miRNA 欠損マウスを用いた解析に関して、miR-23 クラスター floxed マウスと *Ckmm-Cre* マウスとの交配により、骨格筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損マウスを、*Tie2-Cre* マウスとの交配により、血管特異的に miR-23 クラスターを欠損するマウスを得た。これらのマウスを用いて、骨格筋持久性運動適応におけるこれらの miRNA の役割についての解析を行ったところ、両マウスとも持久性運動における血管新生は正常であった。これらのことから、運動による骨格筋毛細血管ネットワーク再構築における miR-23 クラスター miRNA の役割は限定的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

1. S. Oikawa, M. Lee, N. Motohashi, S. Maeda, T. Akimoto. An inducible knockout of *Dicer* in adult mice does not affect endurance exercise-induced muscle adaptation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 316(2), C285-C292, 2019
2. M. Lee*, S. Wada*, S. Oikawa, K. Suzuki, T. Ushida, T. Akimoto. Loss of microRNA-23-27-24 clusters in skeletal muscle is not influential in skeletal muscle development and exercise-induced muscle adaptation. *Sci Rep*, 9(1):1092, 2019
3. S. Oikawa, S. Wada, M. Lee, S. Maeda, T. Akimoto. Role of endothelial microRNA-23 clusters in angiogenesis *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315(4), H838-H846, 2018
4. N. Kim, J. Kim, C.S. Yoo, K. Lim, T. Akimoto, J.H. Park. Effect of acute mid-intensity treadmill exercise on the androgen hormone level and uncoupling protein-1 expression in brown fat tissue of mouse. *J Exerc Nutr Biochem*, 22(1), 15-22, 2018
5. S. Oikawa, S. Maeda, T. Akimoto. Effect of endothelial microRNAs on blood pressure

homeostasis. J Phys Fit Sports Med, 7(1), 41-45, 2018

〔雑誌論文〕(計 5件)

1. 佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦. 共発現遺伝子ネットワーク解析による遺伝子の機能予測とその解析. 第3回日本筋学会大会, 小平, 2017.8
2. 佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦. 翻訳動態特異的共発現遺伝子ネットワーク解析による遺伝子の機能予測とその解析. 第72回日本体力医学会学術総会, 松山, 2017.9
3. 相澤勝治, 目崎登, 秋本崇之. メカニカルストレスに対する骨格筋局所のアンドロゲン産生の調節機序. 第72回日本体力医学会学術総会, 松山, 2017.9
4. 佐古博皓, 鈴木克彦, 秋本崇之. 翻訳動態特異的な共発現遺伝子ネットワーク解析. 第4回日本筋学会大会, 倉敷, 2018.8
5. S. Oikawa, M. Lee, S. Maeda, T. Akimoto. Role of microRNAs in endurance exercise-induced skeletal muscle adaptation. European Muscle Conference, Budapest, 2018.9
6. 相澤勝治, 秋本崇之, 目崎登. メカニカルストレスによる Egr ファミリー遺伝子発現の応答. 第71回日本体力医学会学術総会, 福井, 2018.9
7. 及川哲志, 和田正吾, 李ミンジョン, 前田清司, 秋本崇之. 運動誘発性血管新生におけるマイクロ RNA-23 クラスターの役割. 第71回日本体力医学会学術総会, 福井, 2018.9
8. T. Akimoto. MicroRNAs in skeletal muscle adaptation and function. 17th Meeting of International Research Group of Biochemistry of Exercise, Beijing, 2018.10 (invited)
9. 秋本崇之. メカニカルストレスによる骨格筋可塑性制御. コロイド先端技術講座 2018, 東京, 2018.11 (invited)
10. 秋本崇之. 骨格筋可塑性におけるマイクロ RNA の機能. 第60回広島整形外科先端医学セミナー, 広島, 2019.1 (invited)

〔学会発表〕(計 10件)

〔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:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
早稲田大学筋生物学研究室

<https://www.waseda.jp/sem-muscle/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。