

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17814

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた骨格筋萎縮メカニズムの検討とmicroRNAの役割

研究課題名(英文) Investigation of skeletal muscle atrophy mechanism and role of microRNA using human iPS cells

研究代表者

岩崎 広高 (Iwasaki, Hirotaka)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40781589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、筋線維タイプ形成を制御するmiR-494が生体内でどのような働きを担っているかについて検討することである。

まず1つ目の成果は、ヒトiPS細胞の筋分化過程において、miR-494が転写共役因子p300を直接制御し、a型筋線維形成を制御することを見出した点である。p300は筋ジストロフィー発症にも関与しており、miR-494が筋疾患形成に関与する可能性が示唆された。2つ目は、マウス骨格筋においても、miR-494がp300、a型筋線維マーカーのMyh2を抑制していることを見出した。この成果により、miR-494が筋疾患治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は、超高齢化社会を迎えており、筋骨格系の機能を維持しながら、健康に老いる事が重要になっている。骨格筋は代謝特性の異なる型、a型およびx型筋線維から構成されるが、2型糖尿病では型、a型筋線維が萎縮しやすく、サルコペニアや加齢ではx型筋線維が萎縮しやすいことが近年明らかとなり、全身性の代謝調節とかかわっている。

本研究はmiR-494がa型筋線維の制御機構の一端を担うことを明らかにしたことから、今後、加齢や生活習慣病に対する骨格筋を標的とする創薬へ貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate how miR-494, which regulates muscle fiber type formation, plays a role in vivo. and to develop therapeutic agents for lifestyle-related diseases and muscle diseases.

First, we found that miR-494 directly controls p300 and regulates type IIa muscle fiber formation during myogenesis from human iPS cells. p300 is involved in muscular dystrophy development, suggesting that miR-494 may be included in the pathology of muscle disease. Second, we found that miR-494 suppressed p300 and Myh2 expression in mouse skeletal muscle. We also succeeded in producing miR-494 knockout mice.

This result suggests that miR-494 may be a target for the treatment of muscle diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：骨格筋 筋分化 miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では超高齢化社会が到来し、筋骨格系の機能を維持しながら、健康に老いる事が重要になっている。生活習慣病や加齢に伴う筋力低下・筋萎縮は認知症と並び要介護の主要因となっており、その発症機序と早期予防・治療法の研究が求められている。

骨格筋は機能的役割により、持続的運動が可能な型筋線維と、瞬間的で強い収縮力を有する型筋線維に分類される。ヒト骨格筋では、型筋線維は持続的運動が可能でトレーニングによってその性質を好氣的、あるいは嫌氣的に変化させることができる a 型筋線維と、純粋に瞬発的運動に使われる x 型筋線維に分類される。2 型糖尿病では型、a 型筋線維が萎縮しやすく、加齢に伴い x 型筋線維が萎縮しやすいことが近年明らかとなり、骨格筋の筋線維タイプは全身性の代謝調節とかかわっている。

中胚葉系幹細胞が筋細胞や脂肪細胞に分化するメカニズムはすでにある程度の解明が進んでおり、骨格筋系への分化を決定づける転写因子として MyoD の重要性が指摘されている。骨格筋筋線維束には satellite cell が存在し、筋損傷やトレーニングにより satellite cell が増殖・遊走し、新しい筋線維を形成する事により remodeling を行っている。しかし、筋細胞が最終的に型、型筋線維に分化するメカニズム(ファイバータイプ決定)については不明な点も多い。

miR-1 及び miR-133 といった microRNA が serum response factor (SRF) や Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) といった転写因子の翻訳後調節を介して骨格筋の発生に重要な役割を演じていることは以前から報告されている(Nature Genetics, 2006 Chen et al)。我々はこの microRNA に着目して microRNA-494(miR-494)がマウス骨格筋において、ミトコンドリア DNA の転写因子である TFAM を介しての骨格筋ミトコンドリア量を減少させる事実を見出した。さらに、マウスに swimming による持続的運動を加えるとミトコンドリアの増加と miR-494 の減少と mitochondrial transcription factor A (mtTFA), forkhead box J3 (Foxj3) の増加が観察された。つまり、miR-494 が運動と関係していることを見出した(1)。

また、これまでヒト骨格筋細胞の培養は困難であったが、我々の共同研究者櫻井らは、ヒト多能性幹細胞(iPS 細胞)から骨格筋細胞への分化誘導に成功した(2)。我々はこのシステムを用いて、ヒト iPS 細胞の骨格筋細胞分化において、miR-494 がヒト骨格筋細胞分化を抑制することを見出した。さらに、miR-494 は a 型筋線維をコードしている Myosin heavy chain 2 (MYH2) タンパク発現を変化させ、細胞外セルフフラックスアナライザーによる骨格筋細胞の酸素消費能を低下させることを見出した(右図下)。つまり、我々は miR-494 が骨格筋細胞分化において a 型筋線維分化を制御し、筋ファイバータイプ決定に関与することをヒトにおいて世界で初めて見出した(3)。

参考文献

- 1) Yamamoto H et al. AJP 2012
- 2) Tanaka A et al. PLoS One 2013
- 3) Iwasaki H et al. BBRC 2015

2. 研究の目的

本研究の目的は、miR-494 が生体内でどのような働きを担っているかについて検討し、生活習慣病や筋疾患の核酸治療薬開発につなげることである。

(1) ヒト iPS 細胞の筋分化過程における miR-494 の標的遺伝子を探索することで、筋ファイバータイプ形成に関与する遺伝子を同定する。

ヒト iPS 細胞が骨格筋細胞に分化する過程、ミトコンドリアに富む細胞に分化する過程で miR-494 が a 型筋線維の分化を制御し、その結果、有酸素的解糖能が高い筋線維分化に関与していることを見出した。microRNA は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合して、その遺伝子の転写抑制などに働くが、miR-494 の標的遺伝子を探索することで、筋ファイバータイプ形成に関与する遺伝子を同定することができる。

(2) 運動によるミトコンドリア増加における miR-494 の役割を明らかにする。

マウスに swimming による持続的運動を加えるとミトコンドリアの増加と miR-494 の減少と mtTFA, Foxj3 の増加が観察された。これらの関係が in vivo でも成立するかどうかを、miR-494 の antisense oligonucleotide と mimic を前脛骨筋に注射することで検討する。

(3) miR-494 ノックアウトマウスを作成し、miR-494 の生体内での働きを検討する。

まず miR-494 ノックアウトマウス ES 細胞を購入し、この ES 細胞より、miR-494 ノックアウトマウスを作成し、miR-494 の生体内での働きを検討する。

3. 研究の方法

平成 29 年度には、ヒト iPS 細胞の筋分化過程における miR-494 の標的遺伝子を明らかにする。また、miR-494 ノックアウトマウスを作成する。

A) ヒト iPS 細胞のクローンごとの違いを確認するため、ヒト iPS 細胞は京都大学 iPS 研究所より供与いただいた細胞株 2 クローンをを用いる。これにより、クローンの違いによる影響を除外することができる。

B) miR-494 によって発現が変化する標的遺伝子を探索する目的で、未分化な iPS 細胞、MyoD 強制発現により作製した myoblast、miR-494 に対する mature oligonucleotide を MyoD によ

り骨格筋に誘導した iPS 細胞に transfection を行い作製した myoblast において、micro array (TaKaRa 社 Agilent Certified) で miR-494 transfection 群で発現量が低下している遺伝子のスクリーニングを行う。次に複数の microRNA target scan サイトを用いて、miR-494 特異的な 3' 非翻訳領域を有する遺伝子を同定し、RT-qPCR 法、Western blot 法にて発現量の確認を行う。

C) B) の実験で得られた遺伝子のヒト骨格筋細胞分化での働きを検討するため、特異的 siRNA により標的遺伝子をノックダウンした細胞を用いて、miR-494 の制御する筋ファータータイプと同様のフェノタイプがみられるかどうかを、RT-qPCR 法、Western blot 法にて myosin heavy chain (MYH) 発現を確認し、細胞外セルフフラックスアナライザー法 (細胞の酸素消費速度測定)、NADH 染色、SDH 染色にて好氣的代謝能の高い筋線維の確認を行う。これまでの検討により、Insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) などの複数の候補遺伝子を同定している (右図)。

D) miR-494 の生体内での働きを検討するために、miR-494 ノックアウトマウス ES 細胞を購入し、この ES 細胞より、miR-494 ノックアウトマウスを作成する。本学動物生命科学研究センターでは、遺伝子改変マウス作成を以前より行っており、miR-494 ノックアウトマウスの作成は本大学で可能である。

平成 30 年度には、運動によるミトコンドリア増加における miR-494 の役割を明らかにする。また、miR-494 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドをマウス骨格筋に注射し、miR-494 が後天的にミトコンドリア発現や、筋ファイバータイプ、運動耐容能、糖代謝に与える影響を検討する。

A) 運動によるミトコンドリア増加における miR-494 の役割を明らかにする目的で、C57BL/6J マウスに swimming による持久的運動負荷を加えた。その結果、骨格筋は、質・量ともに変化し、これまでに peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1-a)、mtTFA、Foxj3、MEF2 等の遺伝子が運動により増加し、反対に miR-494 は運動により減少することを確認している。マウスにトレッドミルによる運動負荷を加えて、swimming と同様に、骨格筋の PGC1-a、mtTFA、Foxj3、MEF2 等の遺伝子、miR-494 の動きを確認し、running の持久的トレーニングによる骨格筋の質、量の変化を確認する。その結果、miR-494 と運動の関係の一端を明らかにすることができ、運動による筋ファイバータイプ形成機構の解明にもつながると考える。

B) miR-494 が後天的にミトコンドリア発現や、筋ファイバータイプ、運動耐容能に与える影響を検討する目的で、miR-494 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを C57BL/6J マウスの右前脛骨筋に、スクランブルオリゴヌクレオチドを左前脛骨筋に注射する。この事により上記の遺伝子や、IGF1R、sirtuin 1 (SIRT1)、phosphatase and tensin homolog (PTEN) などのヒト iPS 細胞由来の骨格筋細胞での miR-494 の標的遺伝子が変化するかどうか RT-qPCR、Western blotting で検証する。mtDNA 量を PCR で計測する。また、糖負荷試験、インスリン負荷試験、代謝ケージによる呼吸商の測定を行い、糖代謝についても検証する。

これまでの検討で、miR-494 に対するスクランブルオリゴヌクレオチドを注射した前脛骨筋で、赤筋分化を促進する PGC1-a 発現が低下し、骨格筋萎縮に関与する SIRT1、PTEN 発現がともに上昇することを確認している (右図)。つまり miR-494 が赤筋形成を抑制する方向に働いていることが示唆される (右図)。miR-494 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、スクランブルオリゴヌクレオチドを左前脛骨筋に注射した C57BL/6J マウスに、運動負荷を加えて、これらの遺伝子発現変化を検討し、miR-494 と運動による筋線維形成の関係を検討する。

平成 31 年度には、miR-494 ノックアウトマウスの筋ファイバータイプ、骨格筋のミトコンドリア、運動耐容能、糖代謝を検討する。

A) miR-494 の糖代謝、筋線維形成に与える働きを検討するため、miR-494 ノックアウトマウスに糖負荷試験、インスリン負荷試験や、代謝ケージによる呼吸商の測定を行い、糖代謝について検証する。骨格筋において、筋線維形成に関与する PGC1-a、SIRT1、PTEN、mtTFA、Foxj3 等の遺伝子の動き、mtDNA 発現を確認する。また、MYH タンパク発現や、筋生検標本による ATPase 染色によって筋ファイバータイプを確認する。

B) miR-494 ノックアウトマウスに、トレッドミルによって持久的運動負荷を加え、持久運動能力を検討する。また、握力を測定することで、筋力も検討する。

上記の一連の研究から、miR-494 が糖代謝、骨格筋における筋ファイバータイプ形成、ミトコンドリアバイオジェネシス、運動耐容能を制御する機構を明らかにする。本研究の成果をもとに、生活習慣病、加齢による筋萎縮機構の解明、治療薬開発へ発展させることが可能となる。

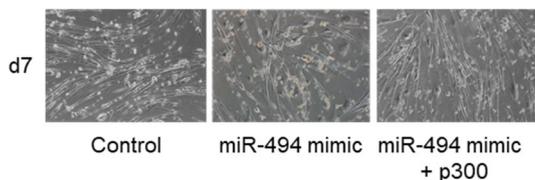
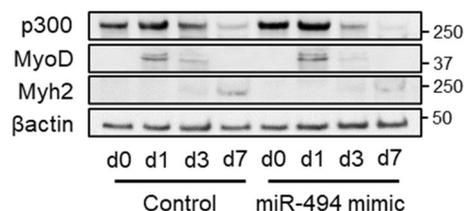
4. 研究成果

本助成期間において、以下の成果を上げた。

(1) ヒト iPS 細胞の骨格筋分化過程における miR-494 の標的遺伝子を明らかにした。

具体的には、miR-494 によって発現が変化する標的遺伝子を探索する目的で、未分化な iPS 細胞、MyoD 強制発現により作製した myoblast、miR-494 に対する mature oligonucleotide を MyoD により骨格筋に誘導すると同時に iPS 細胞に transfection を行い作製した myoblast において、micro array (TaKaRa 社 Agilent Certified) 解析を行った。次に、と を比較して、miR-494 transfection 群で発現量が低下している遺伝子のスクリーニングを行った。さらに と を比較して、で発現量が低下している遺伝子のスクリーニングも行った。最後に複数の microRNA target scan サイトを用いて、miR-494 に特異的な 3' 非翻訳領域を有する遺伝子を

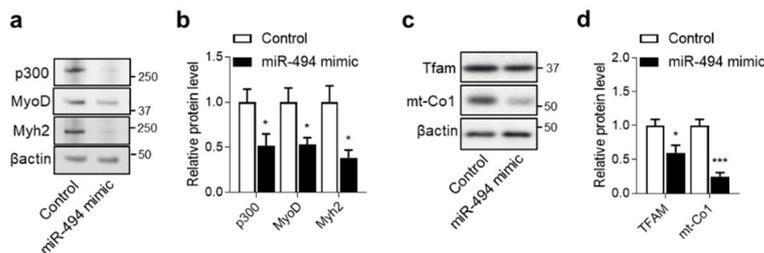
同定した。絞り込んだ複数の遺伝子に対して、RT-qPCR 法、Western blot 法にて発現量の確認を行った。その結果、miR-494 過剰発現によって p300 タンパク発現が減少することを見出し、miR-494 が転写共役因子 p300 を直接のターゲットとする可能性が示唆された(右図)。そこで、p300 の 3' 非翻訳領域に変異を加えたプラスミドを作成し、miR-494 前駆体とともにトランスフェクションしてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、変異プラスミドをトランスフェクションした細胞では、蛍光強度が野生型プラスミドに比較して維持されており、miR-494 が転写共役因子 p300 を直接のターゲットとすることを明らかとした。次に、p300 のコンストラクトを miR-494 の前駆体とともにトランスフェクションし、筋分化効率、酸素消費量や MYH2 タンパク発現を解析した。予想通り、p300 を導入した筋芽細胞では、分化効率は miR-494 の過剰発現条件下でも維持されることがわかった(下図)。酸素消費量や MYH2 タンパク発現も維持され、miR-494 過剰発現による a 型筋線維減少がキャンセルされることを明らかにした。この成果によって、miR-494 が転写共役因子



p300 を直接阻害することで、a 型筋線維への分化を抑制するという、筋ファイバータイプ決定メカニズムの一端が明らかとなった。さらに、これまで p300 は骨格筋分化とともに低下することがわかっていたが、MyoD によって誘導された miR-494 が一過性に発現することで p300 発現を低下させているという MyoD/miR-494/p300 連関が筋分化の初期段階に関係することが明らかになった。この成果は現在論文投稿中である。

(2) マウス骨格筋において、miR-494 は持久的運動によって低下すること、miR-494 過剰発現が a 型筋線維およびミトコンドリア関連タンパクを減少させることを明らかとした。

生体内での miR-494 の働きを検討するために、C57BL/6J マウスにトレッドミルによる持久的運動負荷を加え、前脛骨筋での miR-494、筋ファイバータイプ遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子を解析した。その結果、運動負荷群において、miR-494 発現が低下し、MYH2、MYH7 (型筋線維) などの好気性筋線維に關係するタンパクや、ミトコンドリア関連タンパク (TFAM, mt-Co1) が増加することがわかった。次に、miR-494 の骨格筋における in vivo での役割を検討するために、miR-494 前駆体 (miR-494 mimic) を C57BL/6J マウスの右前脛



骨筋に注射し、左前脛骨筋には生食を注射した。その結果、miR-494 mimic 注射によって、p300、MyoD、Myh2 発現が低下し(図 a,b) さらにミトコンドリア関連タンパクである Tfam、mt-Co1 発現も低下することがわかった(図 c,d)。つまり、miR-494 がマウス骨格筋内においても、p300 を抑制し、Myh2 発現を低下させることが示された。この成果についても現在論文投稿中である。

(3) miR-494 ノックアウトマウス (miR-494KO) を作製し、酸素消費量が亢進することを明らかにした。

CRISPR-Cas9 を用いて miR-494 ノックアウトマウスを作製し、その繁殖に成功した。まず、オキシマックス等流量システムを用いて、miR-494KO の個体レベルの酸素消費量を解析した。その結果、miR-494KO は野生型マウスに比して酸素消費量が有意に亢進することがわかり、熱産生が亢進していることが示唆された。現在、骨格筋、脂肪組織に着目して、運動能力などの解析を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩崎広高
2. 発表標題 MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis by targeting transcriptional coactivator p300 in human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirotaka Iwasaki
2. 発表標題 MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis by targeting transcriptional coactivator p300 in human induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎広高
2. 発表標題 miR-494-3pはp300を介して、ヒトiPS細胞の2a型筋線維への分化を制御する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
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
---------------------------	-----------------------	----