

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09020

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能調節因子としてのmiR-494-3pの役割

研究課題名(英文) The role of miR-494-3p in the regulation of mitochondrial function

研究代表者

森野 勝太郎 (Morino, Katsutarō)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90444447

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、non-coding RNAの1つであるmiR-494の代謝調節における役割をin vivoで解明する事である。miR-494全身ノックアウトマウスは正常に発育し、体重や糖代謝は野生型と差が無かった。寒冷環境下でも体温低下を来さない事が確認され、組織学的に脂肪組織にUcp-1発現の上昇を伴うベージュ化をきたしており、ミトコンドリア密度が上昇していました。代謝ケージを用いた検討から脂肪燃焼の亢進を来していた。これらの結果からin vivoにおいてmiR-494がミトコンドリア機能を抑制している事が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝にかかわる重要な細胞内小器官であり、その機能低下は様々な疾患と関係していると考えられている。miR-494をノックアウトしてもマウスは著変なく成長し、一見何も影響が無いように見えた。しかしながら全身ノックアウトは寒冷環境でも体温維持ができており、脂肪を燃やしやすいつ特徴がある事が分かった。また、2歳齢まで観察すると活動性が野生型より維持されており、長寿である可能性がある。ミトコンドリアは加齢現象にも関与していると考えられており、miR-494が加齢に伴う現象の治療標的になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of miR-494, a non-coding RNA, in metabolic regulation in vivo. miR-494 whole body knockout mice developed normally, and their body weight and glucose metabolism did not differ from wild type. It was confirmed that they did not develop a decrease in body temperature even under cold conditions. Histologically, adipose tissue showed beige-phenotype with increased Ucp-1 expression, and mitochondrial density was increased. Examination using a metabolic cage revealed that fat oxidation was enhanced. These results indicate that miR-494 suppresses mitochondrial function in vivo.

研究分野：代謝・糖尿病

キーワード：ミトコンドリア microRNA 寒冷耐性 糖代謝 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や脂質異常症といった個体レベルの異常に肥満やインスリン抵抗性が関与している事が知られている。細胞レベルで考えると、糖代謝・脂質代謝・アミノ酸代謝はいずれも細胞内小器官であるミトコンドリアが関与している。飢餓や気温などによる環境変化に対応するために、哺乳類はミトコンドリア機能や量を調節する事によりストレス応答を行うように進化してきた。ミトコンドリアバイオジェネシスの主要な調整因子である PPAR Coactivator-1 (PGC1-) は哺乳類に加えて、爬虫類や鳥類などにおいても種を超えて保存されている。しかしながら、PGC1- とその下流分子の制御メカニズムには依然として不明な点が多い。

運動は骨格筋においてミトコンドリア量と機能を増加させる。寒冷刺激は白色脂肪組織をベージュ化させ、ミトコンドリア量と機能を増加させる。甲状腺機能亢進症は全身臓器において代謝を活性化させ、酸素消費量を増大させる。これらの刺激は、臓器の差こそあれミトコンドリア量と機能が外的刺激に応答して変化している事を示している。我々が行った基礎的検討では、インスリン抵抗性被検者の筋生検サンプルでは、ミトコンドリア遺伝子の mRNA 発現と蛋白質発現に乖離が観察された。我々は non-coding RNA が種を超えて様々な遺伝子の転写後調節に関わる事に注目した。これまでの我々の検討ではマウス筋管培養細胞の筋分化の課程で、miR-494 はミトコンドリア量を負に調節する事、筋分化の課程やマウスの持続運動において miR-494 発現が急激に減少する事を見出した。また、マウス白色脂肪細胞の寒冷刺激によるベージュ化過程で miR-494-3p 発現が減少し、miR-494-3p が PGC1- を負に制御している事を報告した。運動療法は食事療法と並んで糖尿病・肥満症の治療の根幹を成す重要な治療法である。ベージュ化もまた、エネルギー消費増加を介して糖尿病や肥満症を改善する事が期待されている。しかしながら、miR-494 によるミトコンドリア調節の重要度については培養細胞と野生型マウスの検討のみでは限界があった。そこで我々は miR-494 ノックアウトマウスを作製し、in vivo における miR-494 の代謝における重要性について検討する事とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、miR-494 の代謝調節における役割を in vivo で解明する事である。miR-494 は癌細胞の増殖に関連した報告がなされていたが、2012 年に我々が C2C12 細胞も用いた miRNA に対する micro array を用いたスクリーニング検査をするまで、糖・脂質代謝に関連した報告はなく、我々はミトコンドリアバイオジェネシスと miR-494 の関係におけるパイオニアと言える (Yamamoto AJP 2012)。海外の研究グループより、我々の研究を支持する発表がなされており、代表的なものとして TNF-alpha は C2C12 筋管細胞に miR-494 発現を増加させ、insulin の効果を抑制すること (Lee et al PLoS One 2013)、高ホモシステイン血症を来す CBS+/- マウスはミトコンドリア転写因子である TFAM の低下と miR-494 発現の増加を来す事。表現型として筋疲労が報告されている事 (Veeranski et al BBA 2015) 健康者のサイクリング運動では骨格筋 miR-494 発現が減少する事 (Camera et al Front Physiol 2016) が報告されている。

我々はヒト iPS 細胞の骨格筋分化における fiber type 決定にも miR-494 が関与する事を見出した (Iwasaki et al. BBRC 2015)。また、脂肪細胞のベージュ化においても miR-494 がミトコンドリア調節に関与する事を報告した (Mengistu et al. Sci Rep. 2018)。PGC1- の 3' UTR には miR-494-3p の consensus sequence が霊長類~鳥類まで種を超えて保存されている一方、爬虫類などの変温動物では保存されておらず、本現象が恒温動物で保存された機構であると思われる。本研究では miR-494 の in vivo における役割を探求することとした。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 システムを用いて miR-494 全身ノックアウトマウスを作成した。また同時に LoxP 配列を挿入したマウスの作成により、臓器特異的ノックアウトマウスも作成した。

観察項目として、体重、体長、組織学的検討に加えて、寒冷刺激に対する直腸温の変化、糖代謝の評価、運動機能などを評価した。これまでの過去の検討より、ノックアウトマウスはミトコンドリア機能が上昇することが予想されるため、骨格筋の筋ファイバータイプや脂肪組織のミトコンドリア関連遺伝子発現に特に注力した研究を行った。表現型を説明する分子メカニズムを検討するために、脂肪細胞については初代培養細胞を作製し、細胞内 Cell Flux Analyzer を用いた代謝への検討を行った。寒冷刺激は交感神経の活性化を介して脂肪酸酸化を亢進させている。そこで、in vivo 及び初代脂肪細胞では 3 刺激薬を用いた検討も行った。

4. 研究成果

本研究の目的は、miR-494 の代謝調節における役割を in vivo で解明する事であった。miR-494 全身ノックアウトマウスは体重や糖代謝には大きな差を認めなかった。一方、寒冷刺激に対しては寒冷耐性を示しており、以前に論文報告を行った培養細胞における検討結果を in vivo で確認できたと思われる。組織学的に miR-494 全身ノックアウトマウスの褐色脂肪組織は脂肪滴が小さく、鼠径部の皮下脂肪細胞は寒冷刺激を行う前より Ucp1 発現が多いことが分かった。代謝ケ

ージを用いた検討により安静時の呼吸商から脂肪酸酸化の亢進が起こっている事が示唆された。ノックアウトマウスと野生型マウスより初代脂肪細胞を作製し、Cell Flux Analyzer でエネルギー代謝の検討を行った。miR-494 ノックアウトマウス由来の細胞は β 3 受容体刺激薬によりミトコンドリア機能を反映した酸素消費量が上昇しており、基質としては脂肪酸添加に良く反応した。この結果からも miR-494 はミトコンドリア機能を抑制的に働く因子である事が示唆され、その発現抑制がミトコンドリア機能、特に脂肪酸酸化を亢進させる事が示唆された。加齢における miR-494 の影響について検討したところ、miR-494 ノックアウトマウスは野生型マウスに比して長寿であり、活動性が保たれていた。骨格筋、脂肪組織、脳におけるミトコンドリア量や組織像を観察する予定であったが、予定を延長して長寿の確認を行っているため、計画完了には至らなかった。ヒト iPS 細胞のみならず、マウスにおいても miR-494 がミトコンドリア機能調節因子である事を明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasaki Hirotaka, Ichihara Yoshinori, Morino Katsutarō, Lemecha Mengistu, Sugawara Lucia, Sawano Tatsuya, Miake Junichiro, Sakurai Hidetoshi, Nishi Eiichiro, Maegawa Hiroshi, Imamura Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 MicroRNA-494-3p inhibits formation of fast oxidative muscle fibres by targeting E1A-binding protein p300 in human-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80742-y	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 Claudia PEREZ-LOPEZ, Tsubasa SHIBAGUCHI, Katsutarō MORINO, Rikuhide KOMA, Kazumi MASUDA	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of Leucine on MicroRNAs and Mitochondrial Biogenesis in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in exercise and sports physiology	6. 最初と最後の頁 35-42
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎広高, 市原克則, 森野勝太郎, LEMECHA Mengistu, 周余航, 櫻井英俊, 西英一郎, 前川聡, 今村武史
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 日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原礼知安, 森野勝太郎, 岩崎広高, 佐藤大介, 柳町剛司, 井田昌吾, 藤田 征弘, 卯木智, 前川聡
2. 発表標題 脂肪細胞ベージュ化において, miRNA-494発現抑制はミトコンドリアバイオジェネシスを活性化し, 寒冷耐性を誘導する
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原礼知安、森野勝太郎、岩崎広高、佐藤大介、柳町剛司、井田昌吾、藤田 征弘、卯木智、前川聡
2. 発表標題 miR-494 発現抑制はベージュ化を介して寒冷耐性を誘導する
3. 学会等名 アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2022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
研究協力者	菅原 礼知安 (Sugawara Luchia)	滋賀医科大学・糖尿病内分泌内科・大学院生	

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
---------	---------