

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16158

研究課題名（和文）骨格筋におけるmiR-23bの糖代謝改善作用の解明

研究課題名（英文）The role of miR-23b in skeletal muscle on glucose metabolism

研究代表者

中西 尚子（Nakanishi, Naoko）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40843446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋糖代謝障害は糖尿病の治療標的となる。MicroRNA-23bが*in vitro*で筋糖代謝改善作用を有するという先行知見に着目し、本研究では*in vivo*における骨格筋miR-23bの糖代謝制御機構の解明を目的に、Myf5CreERとMir23btm1Mtm/Mmjaxを掛け合わせた骨格筋特異的miR-23b欠損マウス（Myf5cre Mir23bf/f）を作成した。高脂肪食を6週間給餌したところ、Myf5cre Mir23bf/fマウスではコントロールマウスと比べ、骨格筋重量には差は認めなかったが、体重増加に抵抗性を認め、内臓脂肪量低下と糖代謝改善、インスリン抵抗性の有意な改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬品microRNAは、近年特に抗悪性腫瘍の分野で開発がすすみ、ドラッグデリバリーシステムの改良とともに更なる発展が期待される医薬品である。本研究で骨格筋特異的MicroRNA23bの低下マウスにおいて、内臓脂肪蓄積が抑制されインスリン抵抗性が改善していたという結果は、分泌型microRNAの低下を介していた可能性がある。Mir23bは、骨格筋だけでなく膵細胞や脂肪細胞における役割も報告があり、多彩な作用があると考えられる。本研究で*in vivo*における骨格筋miR23bの低下がもたらす全身性の糖代謝変化を確認できたことは意義がある。

研究成果の概要（英文）：Impaired muscle glucose metabolism is a therapeutic target for diabetes. In light of previous findings that microRNA-23b improves muscle glucose metabolism *in vitro*, this study aimed to elucidate the mechanism of skeletal muscle miR-23b glucose metabolism *in vivo*. We generated skeletal muscle-specific miR-23b-deficient mice (Myf5cre Mir23bf/f) by crossing Myf5CreER with Mir23btm1Mtm/Mmjax. After 6 weeks of feeding a high-fat diet, Myf5cre Mir23bf/f mice showed no difference in skeletal muscle weight compared to control mice, however, showed less weight gain, less visceral fat mass and improvement in glucose tolerance and insulin resistance.

研究分野：内分泌・代謝内科

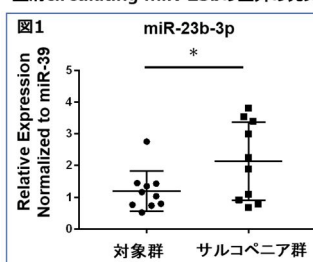
キーワード：microRNA miR23b インスリン抵抗性 内臓脂肪 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

- 骨格筋での糖代謝障害は糖尿病の治療標的となる。糖尿病患者のサルコペニアの合併は、寝たきり・認知症のリスクとなるだけでなく筋糖代謝障害から血糖コントロールを悪化させる。また、糖尿病患者ではインスリン作用不足によりサルコペニア発症は早まると報告されていることから、筋インスリン抵抗性は糖尿病の治療標的となる。
- miR-23b について：骨格筋組織の維持・増強には筋衛星細胞から筋管細胞への分化に特異的な遺伝子の発現制御が必須であり、これらの分化に関連する一連の遺伝子発現を「microRNA」が制御している可能性が近年指摘されている。本研究課題の標的である miR-23b については、近年、膵細胞のアポトーシス抑制作用があることが報告されているが、miR-23b の筋糖代謝改善作用についての報告はない。

- サルコペニア合併糖尿病患者血清で circulating miR-23b-3p の存在比率が上昇している。(臨床研究における先行知見) 申請者のグループで実施している糖尿病患者のコホート研究・KAMOGAWA-DM cohort study に登録者である糖尿病患者において、血清 circulating microRNA を抽出し、miR-23b-3p/miR-39 を定量したところサルコペニア合併群において miR-23b-3p の存在比率が上昇しているという先行知見を得た。(図1)

糖尿病患者における血清 circulating miR-23bの上昇の発見



- miR-23b-3p の過剰発現により筋管細胞の糖代謝が改善する(in vitro 実験による先行知見) マウス筋芽細胞 C2C12 を分化させ miR-23b-3p を遺伝子導入し過剰発現させたところ、筋タンパク質の合成が促進しており、筋管細胞の形成が促進し、また、筋管細胞の糖取り込みは上昇した。(図2,3)

図2 筋管細胞における筋タンパク質の合成

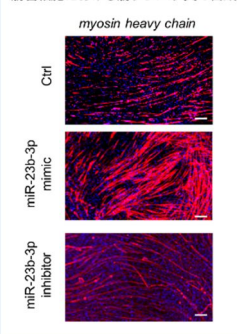
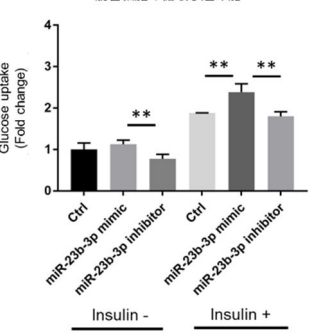


図3 筋管細胞の糖取り込み能



2. 研究の目的

糖尿病とサルコペニアは、筋糖代謝障害によりさらに血糖管理を悪化させるという悪循環が問題となっている。サルコペニアの進行を防ぐため、骨格筋組織の維持・増強を目的とした治療法の確立が喫緊の課題である。近年、筋管細胞への分化に必要な遺伝子の発現を「microRNA」が制御している可能性が注目されている。本研究では miR-23b が in vitro において筋糖代謝改善作用を有するという先行知見をもとに、コンディショナルノックアウトマウスを作成して in vivo における骨格筋 miR-23b の糖代謝制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

タモキシフェン誘導性に骨格筋で特異的に CRE を発現する Myf5CreER と Mir23b^{tm1Mtm/Mmjax} マウスを掛け合わせた Myf5cre Mir23b^{f/f} の骨格筋特異的 miR-23b 欠損マウスを作成し、C57BL6/J とのバッククロスと繁殖をおこなった。骨格筋特異的 miR-23b 欠損マウスにタモキシフェン 5 日間連続腹腔内投与を行い、ヒラメ筋において miR-23b の発現が低下していることを確認する。

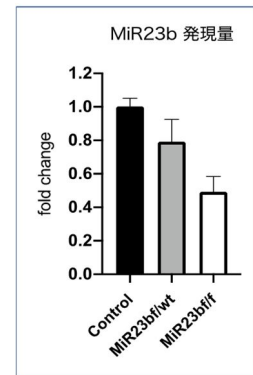
Myf5cre Mir23b^{f/f} マウスとコントロールマウスに対し、タモキシフェン 5 日間連続腹腔内投与後に高脂肪食(脂質 60%・炭水化物 20%・タンパク質 20%)を 6 週間給餌し、体重変化の推移とブドウ糖負荷試験・インスリン負荷試験により糖代謝を評価する。代謝ケージによるエネルギー消費量の評価をおこなう。各臓器の重量と、サルコペニア関連遺伝子と炎症関連遺伝子の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて評価し、比較検討をおこなう。

4. 研究成果

【結果】

Myf5CreER と Mir23btm1Mtm/Mmjax マウスを掛け合わせた Myf5cre Mir23bf/f の骨格筋特異的 miR-23b 欠損マウスを作成し、C57BL6/J とのバッククロスと繁殖をおこなった。バッククロスと繁殖には時間を要したが、骨格筋特異的 miR-23b 欠損マウスにおける骨格筋での miR23b の発現低下を確認した。(図1)

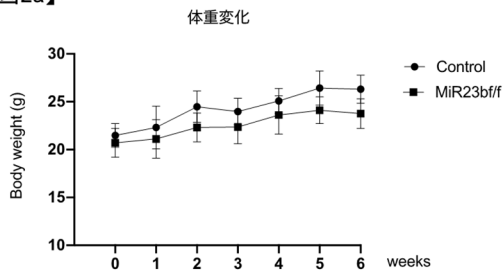
【図1】



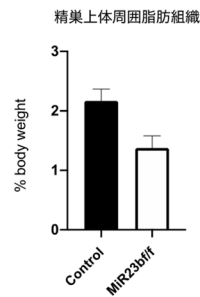
Myf5cre Mir23bf/f マウスとコントロールマウスに対し、タモキシフェン 5 日間連続腹腔内投与後に高脂肪食（脂質 60%ラード・炭水化物 20%・タンパク質 20%）を 6 週間給餌した。

Myf5cre Mir23bf/f マウスはコントロールマウス (n=6) に比べて、高脂肪食負荷に対する体重増加に抵抗性を認め、内臓脂肪量の低下を認めた (図 2a, b)。骨格筋重量に明らかな差は認めなかった (図 2c)

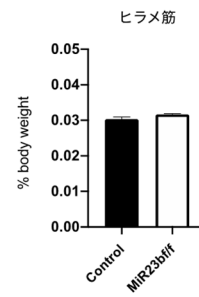
【図2a】



【図2b】

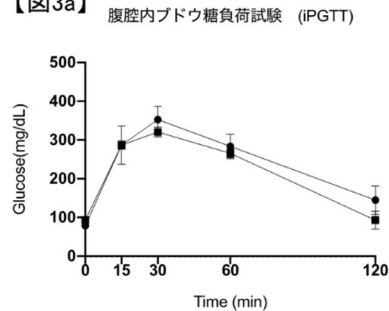


【図2c】

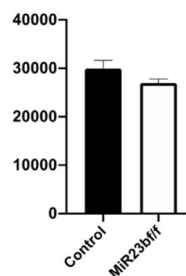


Myf5cre Mir23bf/f マウスでは、腹腔内ブドウ糖負荷試験で血糖は改善傾向を示し (図 3a)、腹腔内インスリン負荷試験において ITT AUC は有意に低値であった (図 3b)。

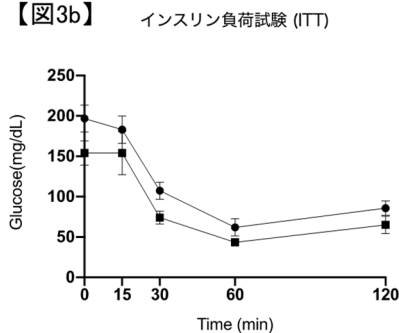
【図3a】



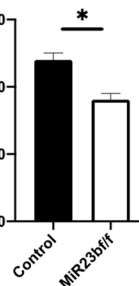
iPGTT AUC



【図3b】

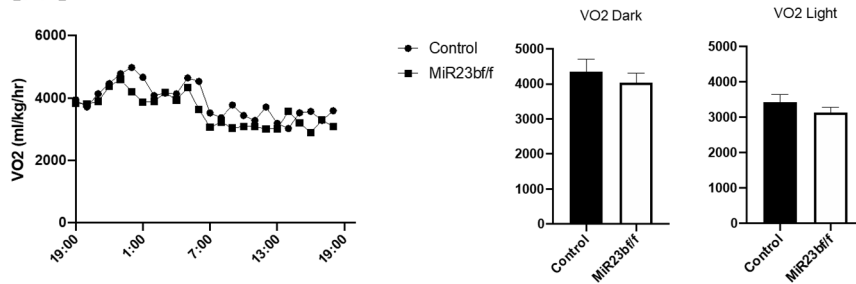


ITT AUC



代謝ケージによる酸素消費量の測定では、Myf5cre Mir23bf/f マウスで V02 が減少していた。(図 4)

【図4】



リアルタイム PCR による骨格筋 TNF の発現は Myf5cre Mir23b/f で低下を認めた。

結果のまとめ：骨格筋特異的に miR-23b 発現を低下させたマウスでは、高脂肪食投与における内臓脂肪蓄積が抑制されインスリン抵抗性が改善した。

【考察】

既報では、骨格筋 miR23b の overexpression により C2C12 筋管細胞における筋タンパク合成の促進と ATP 産生の亢進を認めており (Okamura T. et al. J Endocrinol. 2020)、anti-miR23b-3p によりヒト筋芽細胞における筋形成が阻害されるといった報告もある。(Henriksen T. et al. Mol Metab. 2017) このように In vitro の報告では、miR23b の発現を減らすと筋タンパク合成が低下することが示されており、本研究では in vivo における作用を明らかにする目的で骨格筋特異的に miR-23b 発現を低下させたマウスを作成した。結果、Myf5cre Mir23b/f マウスとコントロールマウスでは骨格筋量に明らかな変化は認めなかった。また、Myf5cre Mir23b/f マウスではコントロール群に比べて骨格筋における TNF の発現が低下していた。Myf5cre Mir23b/f マウスでは肥満やインスリン抵抗性が抑制されており全身性の慢性炎症が軽減していたと考えられる。

本研究で Myf5cre Mir23b/f マウスにおいて、高脂肪食投与における内臓脂肪蓄積が抑制されインスリン抵抗性が改善していた機序について考察する。MiR-23b-5p を過剰発現させると褐色脂肪細胞の UCP1 や lipolysis、酸化に関連する遺伝子発現が抑制されることが報告されている。(You L. et al. Endocr Connect. 2020) この報告は、miR23b の発現低下が、脂肪分解を促進させる可能性を示唆している。近年、リウマチ患者における血清 miR23b 存在比率が内臓脂肪量と相関したことが示され、内臓脂肪量が多いほど miR23b が上昇していたと報告された (Andonian B. et al. Front Immunol. 2019)。細胞外に分泌される microRNA (分泌型 microRNA) は近年注目されている。骨格筋における miR23b 低下により、血液中に存在する分泌型 miR23b の低下を介して内臓脂肪量が減少した可能性がある。同マウスを用いて、血液中に存在する miR23b の評価を行うことを今後の課題としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西 尚子・梶山 真太郎・三好 友樹・松井 崇晃・今井 暖・橋本 善隆・岡村 拓郎・山崎 真裕・濱口 真英・福井 道明
2. 発表標題 骨格筋におけるmiR-23bの糖脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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