

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21753

研究課題名（和文）運動による健康増進に関わる分泌型microRNAの同定と病態生理機能の解明

研究課題名（英文）Identification and characterization of novel microRNAs secreted from muscle

研究代表者

大内 乗有（Ouchi, Noriyuki）

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：00595514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：マウス持久性運動（トレッドミル運動）モデルを用いて、運動により発現変化を示す骨格筋由来のmicroRNA (myomiRNA) のプロファイルをRNAシーケンスで解析し、運動により骨格筋と血中エクソソームで発現増加を示す運動誘発性「分泌型myomiRNA」としてmiR185を見出した。マウス片側尿管結紮モデルにおいて、miR185 mimicの全身投与は腎線維化を抑制した。また、腎近位尿管上皮細胞において、miR185は腎線維化マーカーの発現を抑制した。従って、miR185は腎臓保護作用を有する運動誘発性「分泌型myomiRNA」であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、持久性運動により誘発され、腎臓保護作用を示す新たな骨格筋由来分泌型microRNAが明らかとなった。本研究は慢性腎臓病の病態解明につながる可能性があるだけでなく、この骨格筋由来分泌型microRNAは腎臓以外の臓器に対する作用を示す可能性もあり、学術的意義は高いと考えられる。また、この骨格筋由来分泌型microRNAは運動による腎臓保護作用にも関わるため、運動すれば何故健康に有益なのか？という疑問に対する解決の糸口になり得る可能性があり、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that miR185 acts as an exercise-inducible muscle-derived secretory microRNA “myomiRNA” in mice after screening of myomiRNAs which are upregulated in skeletal muscle by treadmill exercise training. Systemic delivery of miR185 mimic significantly reduced renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. Furthermore, miR185 suppressed expression of fibrotic markers in renal proximal tubular epithelial cells. Thus, miR185 may be a reno-protective secretory myomiRNA induced by endurance exercise.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：持久性運動 microRNA 心腎血管疾患

1. 研究開始当初の背景

我が国において、肥満を基盤とした代謝性疾患や動脈硬化・虚血性心疾患などの心血管疾患および慢性腎臓病を含む生活習慣病対策は重要な健康課題であり、生活習慣病の発症予防と重症化予防の徹底は厚生労働省の「健康日本 21」に健康政策として掲げられている。

運動療法は、ジョギングやウォーキングを主体とした I 型骨格筋の線維数増加を伴う持久性運動と II 型骨格筋の筋肥大を伴うレジスタンス運動に分類される。これら運動療法は、動脈硬化のリスクを軽減し、虚血性心疾患の病態を改善することが知られている。また、近年、運動療法は腎保護効果の面からも慢性腎臓病に対して推奨されている。このように、運動が生活習慣病の予防と治療に有効性が示されているが、その分子機序については明らかにされていない点が多い。

生体の恒常性維持において液性因子を介した臓器間相互作用が重要な役割を果たしていることが知られている。「マイオカイン(Myokine)」と総称される骨格筋から分泌される生理活性物質が近傍や遠隔臓器に作用することで代謝系や心血管系を制御すると考えられている。特に、運動により制御されるマイオカインの生理病態機能を明らかにすることは、運動に関わる疾患の病因解明と創薬開発につながると考えられている。マイオカインには分泌蛋白だけでなく分泌型骨格筋由来の microRNA(myomiRNA)も含まれている。現時点で、持久性運動により制御を受けて心血管疾患に直接影響する分泌型 microRNA についての報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、持久性運動により制御される骨格筋由来の分泌型 microRNA の探索と同定を行い、分泌型 myomiRNA の心腎血管疾患における生理病態学的意義を解析することにより、運動療法による心腎血管保護作用の機序解明のみならず、心血管病と腎臓病などの生活習慣病の疾患制御機構の解明と創薬を含む予防・治療戦略の開発につながることである。

3. 研究の方法

(1) 分泌型 myomiRNA のスクリーニング

マウス持久性運動モデルの作成：野生型マウス(C57BL/6)に対してトレッドミル運動負荷(22 cm/秒のスピード、4度の傾斜)を4週間(1時間を週に5回)施行した。

microRNA プロファイルの解析：運動群と非運動群のヒラメ筋における miRNA プロファイルを RNA シークエンス解析にて比較検討し、発現増加を示す miRNA を選び出した。

分泌型 microRNA の検出：血液よりエクソソームをホスファチジルセリンに対するアフィニティー法にて単離し、microRNA を定量した。運動により、骨格筋とエクソソーム中で発現増加を示す miRNA を運動誘発性の「分泌型 myomiRNA」と考えた。

(2) 分泌型 myomiRNA の腎障害に対する作用の評価

マウス腎障害モデルの作成：野生型マウス(C57BL/6)を用いて片側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction; UUO)モデルを作成した。miRNA mimicあるいはmiRNA negative control と Silence Mag を混和させ、静脈内全身投与後に磁石を用いて腎臓に集積させた。手術後7日目にマッソントリクローム染色にて腎線維化を評価した。腎臓での線維化マーカー(Collagen I、SMA)と miRNA の標的分子である DNMT1 の発現を定量的 PCR にて評価した。

(3) 分泌型 myomiRNA の腎近位尿管上皮細胞での線維化マーカー発現に対する作用の評価
腎近位尿管上皮細胞(HK2 細胞)に miRNA mimic あるいは miRNA negative control を添加して、TGF 誘導性の線維化マーカー(Collagen I、 SMA) を定量的 PCR にて評価した。

4. 研究成果

(1) miR185 は運動誘発性「分泌型 myomiRNA」である。

マウス持久性運動モデルであるトレッドミル運動群と非運動群でのヒラメ筋での microRNA を RNA シークエンス解析を用いて比較検討し、骨格筋において持久性運動によって発現増加を示す microRNA をスクリーニングした。また、マウスの血液よりエクソソームを単離し、スクリーニング後の microRNA を PCR 法にて定量した。運動群の血液から単離したエクソソーム中の miR185 の発現は非運動群と比較して有意に増加していた(図 1)。運動により、骨格筋とエクソソーム中で発現増加を示す microRNA を、運動誘発性「分泌型 myomiRNA」と考え、miR185 に着目した。

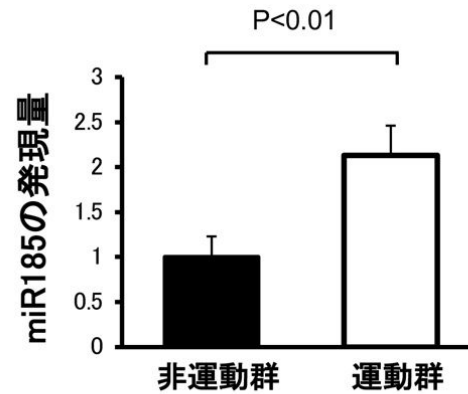


図1. 運動によるヒラメ筋(Soleus)におけるmiR185の発現増加

(2) miR185 は片側尿管結紮モデルにおいて腎線維化を改善する。

miR185 が腎障害に影響するかを検討するためにマウス片側尿管結紮(UUO)モデルを作成した。miR185 mimic あるいは negative control を静脈内全身投与し、手術後7日目にマッソントリクローム染色にて腎線維化を評価した。miR185 mimic の投与は negative control と比べて、UUO手術後の腎線維化面積(Fibrotic area)を有意に低下させた(図 2)。一方、miR185 mimic の投与は

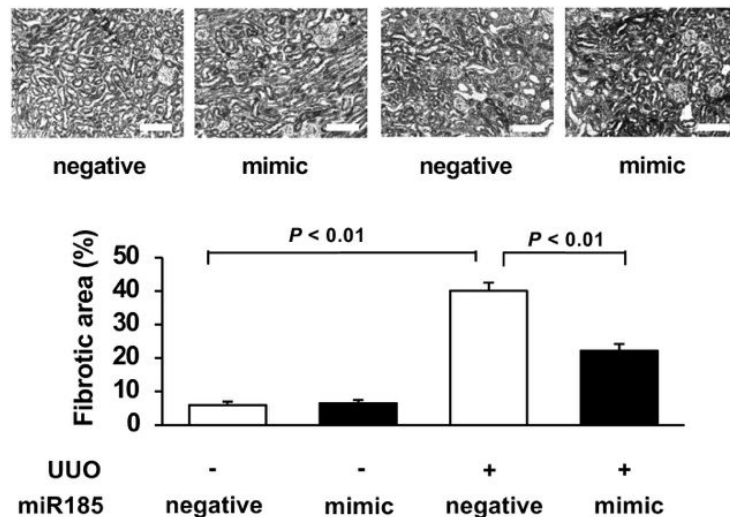


図2. miR185の腎線維化に対する作用

手術を行っていない腎臓の腎線維化面積に対しては影響しなかった。miR185 mimic の投与は腎臓での miR185 の標的分子である DNMT1 の発現を抑制していたことより、miR185 は腎臓に対して作用していると示唆された。さらに、miR185 mimic の投与は UUO 手術後の腎臓での線維化マーカーである Collagen I と SMA の発現を有意に抑制した(図 3)。一方、miR185 mimic の投与は手術を行っていない腎臓での Collagen I と SMA の発現には影響しなかった。

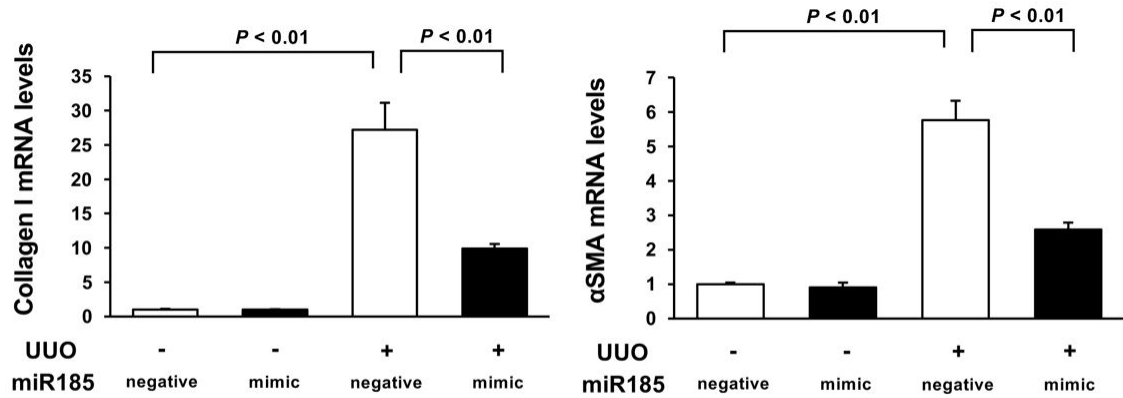


図3. miR185の腎線維化マーカー発現に対する作用

(3) miR185は腎近位尿細管上皮細胞での腎線維化マーカーの発現を低下させる。

miR185が腎障害改善機序を検討するために腎近位尿細管上皮細胞(HK2細胞)にmiR185 mimicあるいはnegative controlを添加して、TGF誘導性の線維化マーカー(Collagen I、 α -SMA)を評価した。miR185 mimicはTGF添加によって誘導されるCollagen Iと α -SMAの発現増加を有意に抑制した(図4)。一方で、miR185 mimicはTGF非添加時のCollagen Iと α -SMAの発現には影響しなかった。

以上より、miR185は腎保護的に作用する運動誘発性「分泌型 myomiRNA」であると示唆された。また、miR185は腎臓病の予防法において標的になりうる可能性があるだけでなく、運動における腎臓保護作用にも関与する可能性が示唆された。

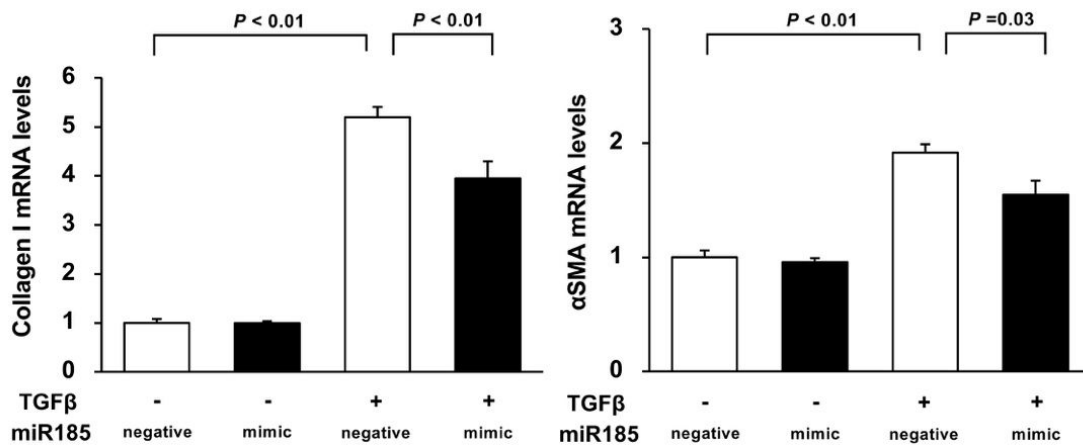


図4. miR185の近位尿細管細胞での腎線維化マーカー発現に対する作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Pu Zhongyue, Shimizu Yuuki, Tsuzuki Kazuhito, Suzuki Junya, Hayashida Ryo, Kondo Kazuhisa, Fujikawa Yusuke, Unno Kazumasa, Ohashi Koji, Takefuji Mikito, Bando Yasuko K., Ouchi Noriyuki, Calvert John W., Shibata Rei, Murohara Toyoaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Important Role of Concomitant Lymphangiogenesis for Reparative Angiogenesis in Hindlimb Ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2006~2018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.121.316191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Hideo, Okumura Takahiro, Ohashi Koji, Kimura Yuki, Kazama Shingo, Shibata Naoki, Arao Yoshihito, Kato Hiroo, Kuwayama Tasuku, Yamaguchi Shogo, Tatsumi Minako, Kondo Toru, Hiraiwa Hiroaki, Morimoto Ryota, Takefuji Mikito, Ouchi Noriyuki, Murohara Toyoaki	4. 巻 78
2. 論文標題 Prognostic impact of transcatheter gradient of follistatin-like 1 reflecting hemodynamics in patients with dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 524~532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2021.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuzuki Kazuhito, Shimizu Yuuki, Suzuki Junya, Pu Zhongyue, Yamaguchi Shukuro, Fujikawa Yusuke, Kato Katsuhiko, Ohashi Koji, Takefuji Mikito, Bando Yasuko K., Ouchi Noriyuki, Calvert John W., Shibata Rei, Murohara Toyoaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Adverse Effect of Circadian Rhythm Disorder on Reparative Angiogenesis in Hind Limb Ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e020896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.020896	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 Ozaki Yuta, Ohashi Koji, Otaka Naoya, Ogawa Hayato, Kawanishi Hiroshi, Takikawa Tomonobu, Fang Lixin, Tatsumi Minako, Takefuji Mikito, Enomoto Takashi, Darwish Mohamed, Iijima Yoko, Iijima Takatoshi, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 593
2. 論文標題 Neuron-derived neurotrophic factor protects against dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 5~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fang Lixin, Ohashi Koji, Ogawa Hayato, Otaka Naoya, Kawanishi Hiroshi, Takikawa Tomonobu, Ozaki Yuta, Takahara Kunihiko, Tatsumi Minako, Takefuji Mikito, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Factor Xa inhibitor, edoxaban ameliorates renal injury after subtotal nephrectomy by reducing epithelial mesenchymal transition and inflammatory response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15218	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 Kawanishi H, Ohashi K, Ogawa H, Otaka N, Takikawa T, Fang L, Ozaki Y, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 A novel selective PPAR modulator, pemafibrate promotes ischemia-induced revascularization through the eNOS-dependent mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0235362.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235362.	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 Yamaguchi S, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Ogawa H, Otaka N, Hiramatsu-Ito M, Masutomi T, Kawanishi H, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 11
2. 論文標題 C1q/TNF-Related Protein 9 Promotes Revascularization in Response to Ischemia via an eNOS-Dependent Manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.01313.	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 Takikawa T, Ohashi K, Ogawa H, Otaka N, Kawanishi H, Fang L, Ozaki Y, Eguchi S, Tatsumi M, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Adipolin/C1q/Tnf-related protein 12 prevents adverse cardiac remodeling after myocardial infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0243483.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243483.	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6件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 運動誘発性マイオカインの心血管病における役割
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 運動誘発性マイオカインと心血管病
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大内乗有 大橋浩二 室原豊明
2. 発表標題 アディポサイトカインと心血管病
3. 学会等名 第58回日本臨床生理学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Ohashi, Noriyuki Ouchi, Hayato Ogawa, Toyoaki Murohara
2. 発表標題 Role of a novel anti-inflammatory adipokine adipolin in cardiovascular and metabolic regulation.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内乗有 大橋浩二 室原豊明
2. 発表標題 抗炎症性アディポサイトカイン「アディポリン」と心血管病
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内乗有 大橋浩二 室原豊明
2. 発表標題 運動誘発性マイオカイン「マイオネクチン」の虚血性心疾患における役割
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会学術集会
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
研究 分担 者	大橋 浩二 (Ohashi Koji) (10595515)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	竹藤 幹人 (Takefuji Mikito) (20709117)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	

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