

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号 : 33916  
 研究種目 : 若手研究 (B)  
 研究期間 : 2011~2012  
 課題番号 : 23790347  
 研究課題名 (和文) microRNA による骨格筋量増加機構の解析とその臨床応用  
 研究課題名 (英文) The role of microRNAs in myostatin-deficient muscular hypertrophy and its clinical application  
  
 研究代表者  
 常陸 圭介 (HITACHI KEISUKE)  
 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教  
 研究者番号 : 10508469

## 研究成果の概要 (和文) :

マイオスタチンは骨格筋量を負に制御するサイトカインである。我々はマイオスタチンノックアウト (KO) マウスの骨格筋において microRNA の網羅的発現解析を行ない、これまでにマイオスタチン KO マウスで発現が増加している複数の新規 microRNA の同定に成功している。一方で、骨格筋量の調節におけるこれらの microRNA の役割は不明であった。本研究では、我々が同定した microRNA の中でも、IGF1/Akt シグナルとの関係が深い miR-486 に注目して解析を進めた。解析の結果、miR-486 が骨格筋におけるマイオスタチンの新規標的因子であり、また miR-486 が C2C12 細胞の筋管の大きさの調整に関与している事が明らかとなった。本研究により、これまで不明であったマイオスタチンによる IGF1/Akt シグナルの抑制に miR-486 が関与している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要 (英文) :

Myostatin is a negative regulator of skeletal muscle mass. We previously identified several microRNAs differentially expressed in skeletal muscle of myostatin knockout mice. However, the role of the microRNAs in the regulation of skeletal muscle mass remains unknown. In this study, we analyzed the function of microRNA in myostatin-deficient muscle hypertrophy. We especially focused on miR-486, since miR-486 is reported to be a positive regulator of IGF1/Akt signaling in skeletal muscle. We showed that canonical myostatin signaling negatively regulates miR-486 expression at the transcriptional level. Furthermore, gain and loss of function of miR-486 demonstrated the involvement of miR-486 in the regulation of C2C12 myotube size. Our results suggest that miR-486 is a potent intermediary molecule that connects myostatin and IGF1/Akt signaling in the regulation of skeletal muscle mass.

## 交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・医科学一般

キーワード : 細胞医科学、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーや筋ミオパチーは、筋変性により全身の骨格筋量が減少し起立・

歩行が不能となり最終的には死に至る筋疾患であるが、これらの疾患に対する有効な治療法は未だ存在していない。マイオスタ

チンは骨格筋の量を負に制御するサイトカインである。我々のグループは、マイオスタチンの機能を特異的に阻害するタンパク質を開発し、筋ジストロフィーモデルマウスの筋力を回復する事に成功している。その一方で、マイオスタチンの阻害によりなぜ骨格筋量が増加するのかその詳細な分子機構は解明されておらず、マイオスタチン阻害を安全かつ有効に臨床応用するためにも早急な分子機構の解明が必要である。

microRNA はタンパク質をコードしない約 22 塩基の RNA であり、発生・分化・増殖・疾患など様々な生命現象に関与する事が知られている。近年、血管平滑筋細胞における microRNA 量の制御に TGF-beta シグナルが関与する事が報告された (Davis et al. Nature 2008)。TGF-beta とマイオスタチンは、細胞内シグナル伝達に転写因子 Smad を利用する等、非常に類似したシグナルである事が知られている。そこで我々は、マイオスタチンと microRNA との関係性を明らかにするため、マイオスタチン KO マウスにおいて microRNA の網羅的発現解析を行い、これまでにマイオスタチン KO マウスで発現が増加している複数の新規 microRNA の同定に成功している。しかしながら、マイオスタチン KO マウスで観察される骨格筋の著しい増加に、これらの microRNA がどのように関与しているのか、その役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) マイオスタチンがどのようにして microRNA の量を調節しているのか、その分子機構を明らかにする。また、同定した microRNA による骨格筋量調節作用を検証する。

(2) 難治性筋疾患に対する新規治療法開発のため、microRNA を利用して人工的に骨格筋量を増加させることが可能であるかを検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々が同定した複数の microRNA の中でも、IGF1/Akt シグナルとの関わりが報告されている miR-486 に特に注目して解析を進めた。

(1) マイオスタチンシグナルがどのようにして miR-486 の量を制御しているのかを明らかにするため、KO マウスと筋芽細胞株 C2C12 を用いて miR-486 とマイオスタチンシグナルとの関係性の解析を行なった。

(2) miR-486 は PTEN 遺伝子を標的とする事が知られている。そこでマイオスタチン KO マ

ウスの骨格筋における PTEN タンパク質と mRNA の発現を定量した。

(3) マイオスタチン KO マウスで発現が増加しており、PTEN 遺伝子を標的とする miR-486 以外の microRNA を、バイオインフォマティクスを利用して探索した。

(4) microRNA による筋量調節作用を評価するために、C2C12 細胞の筋管の大きさに対する microRNA の影響を解析した。

(5) In vivo での microRNA による筋量調節作用を評価するため、マウス骨格筋へ microRNA を遺伝子導入するための最適な手法について検討した。

## 4. 研究成果

(1) マイオスタチン KO マウスにおける miR-486 量の増加が、miR-486 の転写活性化によるものかを検討するため、miR-486 の一次転写産物 (pri-miR-486) 量の測定を行なった。その結果、マイオスタチン KO マウスの骨格筋では pri-miR-486 量が増加している事が判明した。miR-486 は Ank1.5 遺伝子のイントロン領域に存在し、miR-486 と Ank1.5 は骨格筋では同時に発現することが報告されている。そこで、マイオスタチン KO マウスにおける Ank1.5 の発現をリアルタイム PCR により定量したところ、野生型マウスと比べ KO マウスでは Ank1.5 mRNA の有意な増加が認められた。次に、Ank1.5 の発現に対するマイオスタチンの影響を C2C12 細胞において評価した。100 ng/ml のマイオスタチンを C2C12 細胞に処理した結果、Ank1.5 の発現の有意な低下が認められた。

骨格筋での miR-486 と Ank1.5 の発現は、Ank1.5 遺伝子の上流 1 kbp に存在するプロモーターにより制御されている。そこで次に、このプロモーターの活性に対するマイオスタチンの影響の解析を行なった。その結果、100 ng/ml のマイオスタチン処理により、プロモーター活性が 50%ほど低下する事が示された。また、マイオスタチンシグナルの構成因子である Smad3 や ALK5 を過剰発現した場合にも同様の抑制作用が認められた。さらに、マイオスタチンシグナルの細胞内抑制因子である Smad7 の過剰発現により、マイオスタチンにより抑制されたプロモーター活性が回復した事から、マイオスタチンは Smad 因子を介して miR-486/Ank1.5 の発現を転写レベルで抑制している事が示された。

(2) miR-486 は心筋・骨格筋細胞において PTEN 遺伝子を標的とする事が報告されている。そこでまず、miR-486 が直接 PTEN mRNA の 3' 非翻訳領域に作用する事をルシフェラーゼア

ッセイにより確認した。次に、5週齢と13週齢のマイオスタチン KO マウスにおいて PTEN のタンパク質と mRNA をウエスタンブロットとリアルタイム PCR により定量した。その結果、5週齢のマイオスタチン KO マウスでは PTEN タンパク質と mRNA の顕著な低下が認められた。一方、13週齢の KO マウスにおいては PTEN の減少は認められなかった。興味深い事に、PTEN が減少している5週齢のマイオスタチン KO マウスでは、Akt のリン酸化の増加が認められた。

(3) これまでに miR-486 の他にも複数の microRNA が PTEN を標的とする事が報告されている。そこで、5週齢のマイオスタチン KO マウスで発現が変動し、PTEN を標的としうる miR-486 以外の microRNA を同定するため、バイオインフォマティクスを用いて再度 microRNA の探索を行なった。PTEN を標的とする事が報告されている複数の microRNA の発現をマイオスタチン KO マウスと野生型マウスにおいて比較定量したところ、miR-93 の発現が5週齢のマイオスタチン KO マウスで特異的に増加している事が明らかとなった。これらの結果から、5週齢のマイオスタチン KO マウスで見られた PTEN の減少には miR-486 だけでなく、miR-93 の働きが重要である事が示唆された。

(4) 我々が同定した microRNA による骨格筋量調節作用を、C2C12 細胞の筋管を用いて評価した。まず、microRNA 全般が C2C12 細胞の筋管の大きさの調整に関与しているかを明らかにするため、microRNA の生合成に必須な Dicer1 の阻害を行なった。C2C12 細胞の筋管に Dicer1 に対する siRNA を導入したところ、Dicer1 タンパク質の減少と共に、筋管の直径の有意な減少が観察された。この事から、C2C12 細胞の筋管の大きさの維持に microRNA が必要とされる事が示唆された。次に、miR-486 と miR-93 を筋管へと導入したところ、それぞれの microRNA の導入により筋管の直径の有意な増加が認められた。また、miR-486 の活性を Inhibitor により阻害した場合には、筋管の直径が減少した。これらの結果から、C2C12 細胞の筋管の大きさの調節に miR-486 と miR-93 が関与している事が明らかとなった。

(5) In vivo での microRNA による骨格筋量調節作用を評価するため、アテロコラーゲン、レンチウイルス、エレクトロポレーションを用いて、マウス骨格筋への遺伝子導入効率の評価を行った。それぞれの手法による遺伝子導入効率を比較した結果、エレクトロポレーションを用いた場合に高頻度に骨格筋へとプラスミド DNA を導入することが可能であ

る事を確認した。次に、エレクトロポレーションで導入した因子により、骨格筋量に変化が生じるかを明らかにするために、フォリスタチン遺伝子をエレクトロポレーションにより骨格筋へと導入し、その影響を評価した。フォリスタチンは顕著な骨格筋量増加作用を示す事が既に知られている。エレクトロポレーションにより骨格筋へフォリスタチンを導入する事には成功したが、フォリスタチンによる骨格筋量増加作用は認められなかった。我々が行なったエレクトロポレーション条件では、骨格筋への高効率な遺伝子導入が可能だが、処置後に多数の再生筋線維が観察された。よって、エレクトロポレーションにより筋肉がダメージを受けてしまい、フォリスタチンによる筋量増加作用が阻害されたと考えられる。これらの結果を踏まえて、現在は筋肉へのダメージが少なく、効率的な遺伝子導入条件の検討を行なっている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

なし

[学会発表] (計3件)

(1) 常陸圭介、土田邦博、"The involvement of microRNAs in myostatin-deficient muscular hypertrophy", 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場 (福岡)

(2) 常陸圭介、土田邦博、"The role of microRNA in myostatin-deficient muscular hypertrophy", 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜 (神奈川)

(3) 常陸圭介、土田邦博、骨格筋量調節に関わるマイクロRNAの解析、第3回日本RNAi研究会、2011年8月27日、グランドプリンスホテル広島 (広島)

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/nanbyou/Top.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

常陸 圭介 (HITACHI KEISUKE)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10508469