

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461342

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた骨格筋赤筋化のメカニズムの検討とmicroRNAの役割

研究課題名(英文) The role of microRNA and mechanism of the skeletal differentiation into mitochondria-rich fiber in iPS cell

研究代表者

森野 勝太郎 (Katsutaro, Morino)

滋賀医科大学・医学部・講師(学内)

研究者番号：90444447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は、強い収縮力を有する白筋と、ミトコンドリアが豊富で持続的運動が可能な赤筋に分類される。ファイバータイプ決定のメカニズムについては不明な点が多い。本研究の目的はiPS細胞を用いて、microRNAによるミトコンドリア量の調節機構を解明する事である。我々はmiR-494がTFAMやFoxj3を介してミトコンドリア量を調節することを発見した。ヒトiPS細胞を骨格筋に分化させるとmiR-494は一過性に上昇した後に急激に低下することが確認された。miR-494の過剰発現はiPS細胞の筋分化を抑制し、ミトコンドリアが豊富な2Aファイバーを減少させる事、酸素消費量を低下させる事を見出した。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle fibers have metabolic and mechanical differences that allow them to be classified into different types. Each fiber contains different amount of mitochondria and different type of myosin heavy chain. It has not been well understood how muscle fiber type is regulated. Thus, the aim of this study was to explore the role of microRNA in the regulation of mitochondria. We have found that miR-494 regulates mitochondria biogenesis via TFAM and Foxj3. miR-494 expression was acutely increased and gradually reduced after induction of muscle differentiation in iPS cells. Overexpression of miR-494 decreased type 2A fiber, mitochondria rich fiber, and also attenuate oxygen consumption.

研究分野：代謝学

キーワード：ミトコンドリア 糖尿病 骨格筋 microRNA

1. 研究開始当初の背景

(1)骨格筋は機能的役割により、強い収縮力を有する白筋と、ミトコンドリアが豊富で持続運動が可能な赤筋に分類される。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。骨格筋筋繊維束に存在する satellite cell は筋損傷やトレーニングにより増殖・遊走し新しい筋繊維を形成する事により remodeling を行っている。しかしながら筋細胞が最終的に赤筋・白筋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。

(2)近年の分子生物学の進歩により MyoD や MEF2 等の転写因子が骨格筋分化において中心的役割を担っている事が明らかとなってきた。最近になって、miR-1 及び miR-133 といった microRNA が SRF や 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事が報告された。我々はマウス筋芽細胞の分化過程で miR-494 が骨格筋分化の過程で減少し、マウスの運動時のミトコンドリア調節に関与する事を見出した。

一方、脂肪細胞はエネルギー貯蔵を主とした役割とする白色脂肪細胞と、寒冷時の熱産生を主とした役割とする褐色脂肪細胞に分類される。近年、白色脂肪細胞が寒冷刺激で褐色化することが明らかとなり注目を浴びている。

2. 研究の目的

本研究の目的は iPS 細胞、培養細胞を用いてミトコンドリア調節因子としての microRNA の役割を検討することである。骨格筋については筋ファイバータイプ決定因子である可能性があり、脂肪細胞においては脂肪細胞の褐色化に関与する可能性を探索する

3. 研究の方法

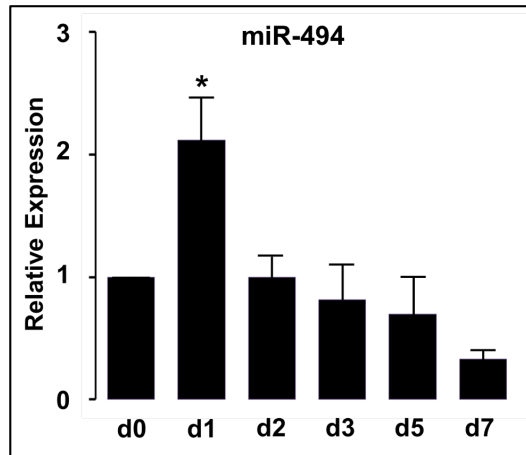
(1) 京都大学 iPS 研究所より供与いただいたヒト iPS 細胞株を用いる。骨格筋分化誘導過程で RNA、DNA、蛋白質を調整。microRNA の発現を RTqPCR (Taqman microRNA assay) で確認した。

ミトコンドリア DNA 量については RT-qPCR 法で、ミトコンドリアタンパク発現量については Western blot 法で、ミトコンドリア量についてはミトコンドリア染色を Mitotracker Green を用いて染色することにより行った。

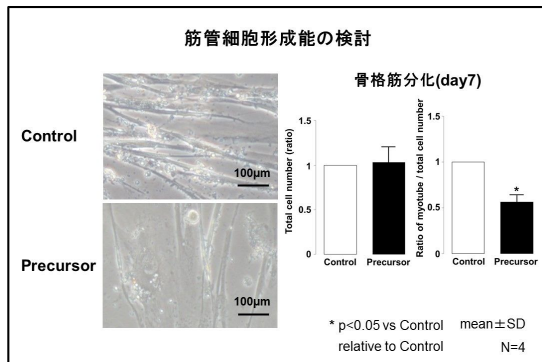
ミトコンドリア機能については Seahorse Cell flux analysis で、骨格筋のファイバータイプについて NADH 染色と Myosin Heavy Chain1 に対する Western blot を行った。

4. 研究成果

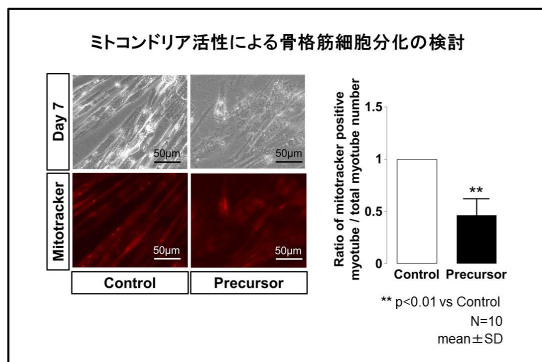
(1) iPS 細胞の骨格筋分化の過程で miR-494 は一過性に上昇し、徐々に減少する事が確認された。本現象の後半部分はマウス C2C12 筋管細胞の分化過程と同様の変化であった。



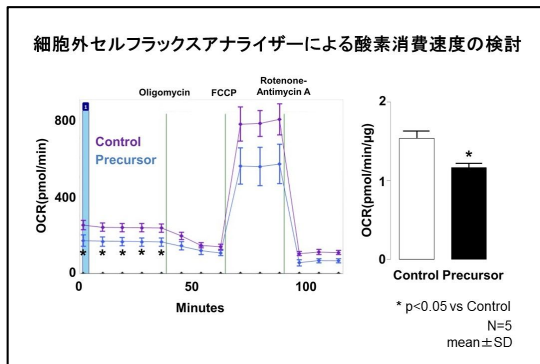
(2) ヒト iPS 細胞に対し、miR-494 の precursor を過剰発現させると、筋分化は有意に抑制された。



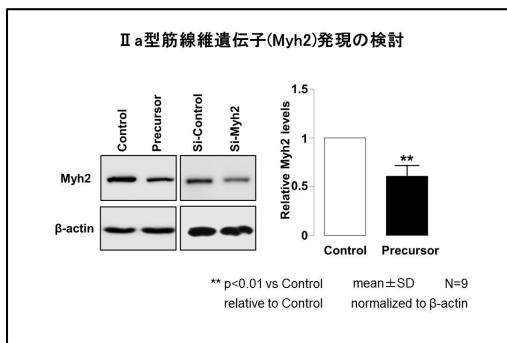
(3) ヒト iPS 細胞に対し、miR-494 の precursor を過剰発現させると、ミトコンドリア染色が減弱した。



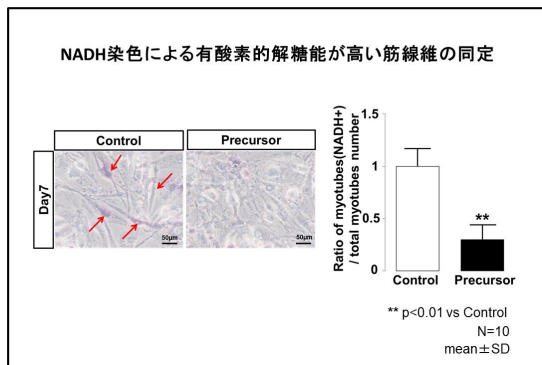
(4) ヒト iPS 細胞に対し、miR-494 の precursor を過剰発現させると、酸素消費量が低下した。



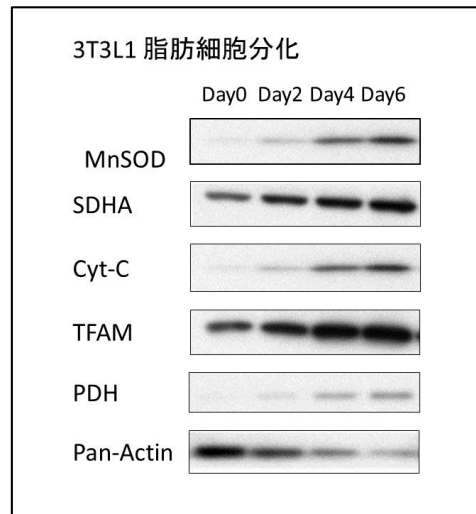
(5) ヒト iPS 細胞に対し、miR-494 の precursor を過剰発現させると、IIa 型の筋繊維である Myh2 発現が減少した。



(6) ヒト iPS 細胞に対し、miR-494 の precursor を過剰発現させると、NADH 染色陽性細胞が減少した。これらの結果を総合して考えると、miR-494 は骨格筋分化の調節因子である事、特にミトコンドリアが豊富な IIa 型繊維を抑制する作用が考えられた。筋分化の課程で miR-494 が減少することを考えると、この脱抑制が筋繊維のミトコンドリア制御のメカニズムの一端を担っている可能性がある。



(7) 脂肪細胞分化の課程におけるミトコンドリア量の調節。
3T3L1 脂肪細胞の分化の課程でミトコンドリア量がどの様に变化するかを検討したところ、全てのミトコンドリア蛋白質が増加したわけではないが、多くのミトコンドリア蛋白質が分化過程で増加していた。



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](計8件)

- (1) Iwasaki H, Imamura M, Morino K, (他13名) MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 2015 468: 208-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.128.
- (2) Nagayama K, Morino K, , Sekine O, Nakagawa F, Ishikado A, Iwasaki H, Okada T, Tawa M, Sato D, Imamura T, (他5名) Duality of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mcp-1 Expression in Vascular Smooth Muscle: A Potential Role of 4-Hydroxy Hexenal. *Nutrients.* 査読有 7:8112-26, 2015 doi: 10.3390/nu7095381.
- (3) Petersen KF, Morino K, (他7名) Effect of aging on muscle mitochondrial substrate utilization in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 112:11330-4, 2015 doi: 10.1073/pnas.1514844112.
- (4) Kondo K, Morino K, (他10名) A fish-based diet intervention improves endothelial function in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: a randomized crossover trial. *Metabolism.* 査読有 63:930-40, 2014 doi: 10.1016/j.nutres.2014.06.001.
- (5) Nakagawa F, Morino K, (他13名) 4-Hydroxy hexenal derived from dietary n-3 polyunsaturated fatty acids induces anti-oxidative enzyme heme oxygenase-1 in multiple organs. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有

443:991-6, 2014

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.085.

- (6) Ishikado A, Morino K, (他 16 名) 4-Hydroxy hexenal derived from docosaheptaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. PLoS One. 査読有 23:e69415, 2013
doi: 10.1371/journal.pone.0069415.
- (7) Ushio M, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S, Yoshizaki T, Morino K, (他 3 名) Ezetimibe prevents hepatic steatosis induced by a high-fat but not a high-fructose diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 査読有 15;305:E293-304, 2013
doi: 10.1152/ajpendo.00442.2012.
- (8) 岩崎広高, 今村武史 ヒト iPS 細胞を骨格筋細胞分化における microRNA-494 の役割、日本薬理学雑誌 147:260-263, 2016

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 岩崎広高, 今村武史, 森野勝太郎 (他 6 名) MicroRNA-494 はヒト iPS 細胞由来の骨格筋細胞において酸素消費量を制御する、第 128 回日本薬理学会近畿部会 2015 年 11 月 20 日、豊中市
- (2) 岩崎広高, 今村武史, 森野勝太郎 (他 5 名) ヒト iPS 細胞由来の骨格筋分化における microRNA の役割、第 127 回日本薬理学会近畿部会 2015 年 6 月 26 日、岐阜
- (3) 岩崎広高, 今村武史, 森野勝太郎 (他 5 名) microRNA-494 はヒト iPS 細胞の骨格筋分化において筋線維型制御に関与する、第 89 回日本薬理学会 2015 年 6 月 26 日、岐阜
- (4) Hiroataka Iwasaki, Takeshi Imamura, Katsutaro Morino (他 5 名) The role of Mir—Shiga in the human skeletal muscle differentiation、Keystone Symposia 2016 T2、2015 年 10 月 25 日 - 29 日、京都
- (5) 森野勝太郎、代謝異常・ミトコンドリア機能異常による糖尿病大血管症の成因メカニズム、第 30 回日本糖尿病合併症学会 2015 年 11 月 27 日 ~ 28 日、名古屋

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90444447

(2) 連携研究者

今村 武史 (TAKESHI IMAMURA)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00552093