

2020年 4月 6日

## 老化に伴う筋肉量低下を遅延・阻止させる機能性 RNA を用いた新規治療薬の開発

代表研究者 国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
室長 北條 浩彦  
共同研究者 国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
流動研究員 福岡 聖之  
流動研究員 清水 英雄

### 【まとめ】

老齢、若齢マウスの解析から見つかった miRNA-199 は、従来の myogenic miRNAs よりも強い筋分化・筋再生能を有している。そのターゲット遺伝子の一つである Lin28b の抑制を介して代表的な myogenic miRNA である miR-1 の発現をコントロールし、筋分化・筋再生に関わっていると考えられる。また、マウス個体への投与実験結果は、筋線維の肥大化を示し、当該 miRNA の治療薬としての有望性を示唆する。

### 1. 研究の目的

高齢者が健康な生活を送るためには、体の中で最も大きな臓器である「筋肉」を健全に保つことが重要である。老化に伴って筋肉量は低下していくが、その低下を緩やかにさせるか、もしくは阻止することができれば、健康的な老化（＝健康寿命の延伸）を実現できると考える。マイクロ RNA は、体の中（細胞の中）で働く機能性 RNA 分子である。近年、細胞の外にもその存在が知られ、細胞間、組織間の情報伝達に関わっていると考えられている。我々は、老齢マウスと若齢マウスの血液中に存在する機能性 RNA を研究し、加齢に伴って減少する細胞外マイクロ RNA を発見した。注目すべき点は、その多くが筋肉に多く存在するマイクロ RNA、myogenic miRNA であり、そしてその中のマイクロ RNA (miR-199) に極めて高い筋分化誘導能を発見した(特許出願中)。本研究は、このマイクロ RNA の作用機序の解明そして in vivo での作用効果を検討する。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 マウス筋芽細胞株と初代筋芽細胞を用いた筋分化誘導効果の検討：

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞に加え、マウス個体から単離した初代筋芽細胞を用いて当該 miRNA の筋分化誘導効果を検討した。

合成した miRNA を C2C12 細胞または単離した初代筋芽細胞に導入し、筋分化マーカーである Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現を調べた。

#### 2-2 作用機序解明のための下流遺伝子ターゲットの解析：

①マイクロ RNA(miRNA)が制御する下流遺伝子を同定するため、TargetScan の予測ターゲット遺伝子データベースを利用して筋分化に関連する遺伝子候補を抽出した。②予想される miRNA の認識配列を化学合成し、それをレポーター遺伝子の 3'UTR に挿入したレポータープラスミドを構築した。③合成 miRNA と共に構築したレポータープラスミドを C2C12 細胞に導入し、翌日、レポーター遺伝子の発現を解析した。そして miRNA による抑制効果を確認した。④上記に加えて、合成 miRNA または阻害用アンチセンス核酸を C2C12 細胞に導入し、内在性遺伝子の発現変化を qPCR 法やウエスタンブロット法を用いて解析した。以上の解析から、候補ターゲット遺伝子の発現に変化が確認された場合、目的 miRNA によって制御を受けるターゲット遺伝子であることが示唆される。

#### 2-3 筋損傷モデルマウスを用いた効果の検討

8週齢の C57BL6/J マウスの前脛骨筋に塩化バリウム溶液を投与し筋損傷を与え、その翌日に当該 miRNA を筋損傷部に投与した。miRNA 投与後 9 日目に再生した筋肉の組織標本作製、免疫組織化学的解析を行い、筋線維の横断面積を測定した。

#### 2-4 老齢マウスを用いた効果の検討

2 年齢マウスの前脛骨筋に当該 miRNA そしてコントロールの miRNA(miCont)を直接投与し、miRNA 投与数日後の筋組織に対して上記と同じ処理を行い、顕微鏡観察、そして筋線

維の横断面積を測定した。

### 3. 研究の成果

#### 3-1 miRNA の筋分化誘導能

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞とマウス個体から単離した初代筋芽細胞を用いて miRNA の筋分化誘導効果を調べた。その結果、C2C12 細胞と同様に単離したマウス初代筋芽細胞でも、当該 miRNA 導入によって筋分化マーカー遺伝子である Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現が強く誘導されることがわかった。さらに、筋肉特異的な miRNA である miR-1 の発現も誘導されることがわかった。

#### 3-2 ターゲット遺伝子探索

当該 miRNA のターゲット遺伝子の探索から、Suz12 遺伝子と Lin28b 遺伝子がターゲット遺伝子として抽出された。それらの遺伝子の 3'非翻訳領域には当該 miRNA の結合配列が存在することが示された。注目すべきことは、Lin28b は RNA 結合タンパク質であり、miR-1 の前駆体と結合して miR-1 の機能性 RNA としての成熟を抑制している。当該 miRNA によってターゲットの Lin28b が抑制されると、miR-1 前駆体に対する成熟抑制が解除され、その結果として成熟した機能性の miR-1 が増加したと考えられる。

#### 3-3 miRNA の In vivo 評価

塩化バリウムによって筋肉を損傷させた筋損傷モデルマウスを用いて、筋肉再生における当該 miRNA の効果の検討を行った。その結果、miRNA 存在下で有意な筋線維の肥大化が起こることが観察された。

さらに、老齢マウスの筋組織に当該 miRNA を直接投与した場合でも顕著な筋線維の肥大化が観察された。面白いことに、肥大化した筋線維は再生した筋線維ではなく、既に存在していた筋線維が肥大化したと考えられる。

### 4. 今後の課題

本研究から、当該 miRNA の筋損傷そして老化に伴う筋萎縮に対する新規医薬品としての有望性が示唆された。これを実現し実用化するためには、安全かつ効果的な miRNA の送達方法を確立することが不可欠である。今後の課題

としては、実用化に向けた薬剤送達法(Drug Delivery System: DDS)の確立に注力したい。

### 5. 研究成果の公表方法

現在、研究成果をまとめた論文を執筆中である。論文による成果の公表に加えて、既に国内外の学会で研究成果の一部を報告している(下記)。今後もまとめた成果を学会等で公表していく予定である。

学会発表：

1. Fukuoka M., Ito N., Takeda S., Hohjoh H. Effects of miRNAs that are predominantly present in young mouse plasma on myogenic differentiation and muscle regeneration. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.17.2018.
2. 福岡 聖之、北條 浩彦. (2018) 「若齢マウス血漿で高発現する miRNA の筋細胞分化および筋再生における効果(口頭)」第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、11.28, 2018.
3. 福岡 聖之、北條 浩彦. (2018) 「若齢マウス血漿で高発現する miRNA の筋細胞分化および筋再生における効果(ポスター発表)」第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、11.28, 2018.
4. 福岡聖之、伊藤 尚基、武田 伸一、北條浩彦. (2017) 「若齢および老齢マウスの血中 miRNA 解析:若齢マウス高発現 miRNA がマウス筋芽細胞に与える筋分化誘導効果」第 40 回 日本分子生物学会年会(生命科学系学会合同年次大会)、神戸、12. 6. 2017.

以上