

# サルコペニアに関わる遺伝子を抑制し筋萎縮を阻止する新しい核酸医薬の開発

代表研究者 順天堂大学大学院医学研究科 特任准教授 北條 浩彦  
共同研究者 国立精神・神経医療研究センター 研究員 清水 英雄

## 【抄録】

高齢者が健康的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大切である。筋肉量は老化に伴って低下する。そして、サルコペニアはその顕著な疾患である。筋肉量の低下を抑制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(miRNA)はタンパク質をコードしない non-coding RNA であり、複数のターゲット遺伝子の発現を抑制する機能性 RNA である。若齢マウスと老齢マウスの血液中に存在する miRNA の解析から、強い筋分化誘導能をもった miRNA199(miR-199)を発見した。これは、miR-199 がアンチエイジング因子に成りえる可能性を示唆する。そこで本研究は、当該 miRNA の作用機序・効果の検討、そして効果的な投薬システム (Drug delivery system: DDS) の確立を目指した研究を行った。その結果、miR-199 の筋線維に対する有望な効果と効果的な DDS 剤を見出すことができた。

## 1. 研究の目的

高齢者が高い QOL (Quality of life : 生活の質) を維持した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するか、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 (miRNA) は、体の中（細胞の中）で働く機能性 RNA 分子である。近年、細胞の中だけでなく細胞の外にもその存在（細胞外 miRNA）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細胞外 miRNA を解析し、加齢に伴って減少する miRNA を同定した。そして、その中に極めて高い筋分化誘導能を持った miRNA199 (miR-199) を発見した（特許取得）。本研究は、この miRNA の筋肉に対する効果の検討と in vivo での有効な送達方法について検討した。そして、新規核酸医薬としての有望性を検討した。

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 miR-199 の老齢筋組織内での作用

先の研究で、合成 miR-199 を筋損傷モデルマウスの筋損傷部位に投与すると、再生した筋線維が肥大化することを発見した。そして、さらに、老齢マウスの筋組織に当該 miRNA を直接投与すると、同様に筋線維の肥大化が起こることを観察した。筋再生時の当該 miRNA とタ

ーゲット遺伝子の作用機序は明らかにすることができたが、老齢マウスの筋線維内で起こる miR-199 の作用機序については不明であった。この作用について、老化に伴う筋萎縮に関連する遺伝子に着目し、定量 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解を行った。

### 2-2 全身投与による効果の検討

前述の局所投与方法だけでなく、全身投与方法による当該 miRNA の効果の検討を行った。アテロコラーゲンを使った全身投与用の AteloGene Systemic Use キットを用いて尾静脈から全身投与を行い、数日後、筋線維の断面積の解析によってその効果を検討した。

### 2-3 miR-199 の運動機能に対する効果

合成 miR-199 を投与すると筋線維の肥大化が起こる。この筋線維の肥大化は、運動機能に影響を与えるのか？この問いに対して、握力測定装置をつかって筋力の測定（グリップテスト）を行った。

### 2-4 アテロコラーゲン核酸導入剤に代わる核酸導入剤の選定

アテロコラーゲンは導入効率の良い核酸導入剤である。しかしながら、アテロコラーゲンの投与を受けた個体の負担は小さくない。特に老齢個体に対する負担は大きい。それを軽減するためには、アテロコラーゲンと同等の導入効率を有し、かつマイルドな核酸導入剤の選定が必要である。合成 miR-199 を様々な市販の核

酸導入剤を用いて全身投与を行い、その後、投与個体の状態観察そして運動機能の解析によって、アテロコラーゲンと同程度もしくはそれ以上の効果を示す核酸導入剤を選定した。

### 3. 研究の成果

#### 3-1 筋委縮関連遺伝子の発現減少

筋委縮に関連する遺伝子として委縮した筋組織で発現が亢進する MuRF1 と Atrogin1 遺伝子の発現を調べた。合成 miR-199 としてネガティブコントロールの miRNA を投与して一週間後の筋組織内で発現するそれらの遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法によって解析した。その結果、合成 miR-199 を投与した筋組織内では MuRF1 と Atrogin1 遺伝子の発現がコントロールと比較して減少することが観察された。このことから、miR-199 は MuRF1 と Atrogin1 遺伝子の発現減少を介して筋委縮を抑制し、その結果、老齡筋線維の横断面積増加をもたらしたと考えられる。

#### 3-2 全身投与法による効果

AteloGene Systemic Use キットを用いて老齡マウスの尾静脈から合成 miR-199 の全身投与を行った。一週間後、前脛骨筋の筋線維横断面積を解析した。その結果、局所投与と同様に筋線維断面積の増加が観察された。全身投与法によっても合成 miR-199 の効果が期待できることが分かった。

#### 3-3 運動機能に与える影響

合成 miR-199 による筋線維の肥大化は、運動機能に影響するのか、握力測定装置を使った筋力測定によって評価を行った。10 匹の老齡 (80 週齡) マウスの筋力を測定し、2 群に分け、合成 miR-199 とコントロール miRNA をそれぞれの群に全身投与した。投与後 10 週目に再度筋力測定を行い、投与前と投与後で筋力の減少に差があるか調べた。その結果、コントロール miRNA を投与した老齡マウスの筋力低下率と比べて、miR-199 投与群の老齡マウスの筋力低下率は有意に小さかった。この結果は、miR-199 投与によって加齢に伴う筋力低下が抑制されたことを示唆している。

#### 3-4 新しい核酸導入剤

アテロコラーゲンを用いた全身投与の核酸導入法は高い導入効率を有しているが、投与を受けた個体の負担は小さくない。特に老齡個体においては、その負担は大きく、投与後死亡に至る個体が少なくない。アテロコラー

ゲンに代わる核酸導入剤を選定するため、市販の in vivo 用核酸導入剤を購入し評価を行った。様々な導入剤を試した結果、DC-CHOL/DOPE 中空リポソーム (FormuMax Scientific 社, USA) が最も有望であり、アテロコラーゲンと同等の導入効率を示し、導入後の個体の負担が極めて小さかった。

#### 3-5 副次的な発見

miRNA が機能性 RNA とし働くためにはタンパク質と結合する必要がある。miRNA は様々なタンパク質と結合しているが、中には疾患と関連するタンパク質 (遺伝子) もある。FMRP は、脆弱 X 症候群の責任遺伝子、FMR1 遺伝子、がコードするタンパク質であり、メッセンジャー RNA (mRNA) や miRNA に結合する RNA 結合タンパク質である。FMRP が関わる miRNA の調節について調べるために、FMR1 遺伝子のノックダウン実験を行った。その結果、FMRP だけでなく正常化のために用いた GFP レポータータンパク質の発現も顕著に減少することが観察された。これは予想外の結果であり、そのメカニズムを調べるための実験を行った。そして、今まで知られていなかった FMR1 遺伝子とユビキチン-プロテアソーム系 (主要なタンパク質分解系) との関連を見出すことができた。

### 4. 今後の課題

前研究課題から本研究課題へと一貫した研究によって、miR-199 の筋損傷そして筋委縮に対する有望な効果を見出すことができた。特に、老齡筋組織の委縮に対する抑制効果は、高齡者のサルコペニアに対する核酸医薬を用いた新しい治療の可能性を示すことができたと考える。この新しい治療を実現するためには、十分な研究資金の基、病院、企業と連携したさらなる研究開発必要であると考えられる。

### 5. 研究成果の公表方法

本研究の成果は、すでに論文による公表、そして国内外の学会で報告している (本研究成果は、Communication Biol に掲載している)。今後も本研究から派生する成果については、論文や学会等で公表していく予定である。

論文発表:

1. Fukuoka M., Fujita H., Numao K., Nakamura Y., Shimizu H., Sekiguchi M., and Hohjoh H. (2021) MiR-199-3p enhances muscle regeneration and

- ameliorates aged muscle and muscular dystrophy. *Communications Biol*, 4: 427.
2. Shimizu H. and \*Hohjoh H. (2023) FMRP, FXR1 protein and Dlg4 mRNA, which are associated with fragile X syndrome, are involved in the ubiquitin-proteasome system. *Sci Rep*, 13(1): 1956.

著書 :

1. 北條浩彦 : 第 24 章 miRNA と筋分化、筋再生、筋萎縮. 疾患バイオマーカーとしてのマイクロ RNA と診断応用 (監修 : 落谷孝広、松崎潤太郎)、シーエムシー出版、東京、pp192-198, 2022.
2. 北條浩彦 : 加齢に伴って減少する血中 miRNA. リアルタイム・デジタル PCR 実験スタンダード (編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp151-157, 2022.

講演・学会発表 :

1. 北條浩彦 : 「アンチエイジング因子としての血中マイクロ RNA」第 10 回脳神経内科教育講演、高知、11.24.2023.
2. 北條浩彦 : 「脆弱 X 症候群関連遺伝子の新し

い細胞内機能」、リエゾンラボ研究会、熊本大学、熊本、10.7.2022.

3. 北條浩彦 : 「筋肉の再生や筋疾患治療に効果がある血中のマイクロ RNA」第 8 回脳神経内科教育講演、高知、2.25.2022.
4. 北條浩彦 : 「アンチエイジング因子としての血中マイクロ RNA」名古屋大学セミナー、名古屋、10.20.2021.
5. 北條浩彦 : 「加齢に伴って減少する血中マイクロ RNA199 は、筋肉の再生や筋萎縮抑制そして筋疾患治療に効果がある」、リエゾンラボ研究会、熊本大学、熊本、10.8.2021.
6. 北條浩彦 : 「加齢に伴って減少する血中マイクロ RNA は、筋肉の再生や筋疾患治療に効果がある」第 7 回脳神経内科教育講演、高知、2.26.2021.
7. 北條浩彦 : 「miRNA 研究の最新動向とその応用展開」情報機構主催セミナー、東京、9.16.2020.
8. 北條浩彦 : 「血液循環系を巡る細胞外マイクロ RNA の意義と医療応用」第 5 回脳神経内科教育講演、高知、2.28.2020.

以上

# Development of a new nucleic acid medicine that suppresses genes related to sarcopenia and blocks muscle atrophy

**Primary Researcher:** Hirohiko Hohjoh  
Associate Professor, Graduate School of Medicine, Juntendo University

**Co-researchers:** Hideo Shimizu  
Research fellow, National Institute of Neuroscience, NCNP

Maintaining muscle mass is important for elderly people to keep a healthy lifestyle. Muscle is the largest organ in the body, but muscle mass declines with aging. Sarcopenia is a disease characterized by a significant loss of muscle mass. If we can suppress the loss of muscle mass with aging, we can expect healthy aging (that is, an extension of the human health span). MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that do not encode proteins and are functional RNAs that suppress the expression of multiple target genes. In the previous study examining cell-free miRNAs in young and old mice, we found miRNA199 (miR-199) that has a strong ability to induce muscle differentiation, among miRNAs in the blood. This suggests that miR-199 may be an anti-aging factor. Therefore, in this study, we attempted to elucidate the mechanism of action and the effect of this miRNA and to establish an effective drug delivery system (Drug delivery system: DDS) for miRNA. From a series of studies, we found a promising effect of miR-199 on muscle fibers and an effective DDS agent.