

2025 年 4 月 20 日

<研究課題>フレイル対策のための RNA 干渉による骨格筋機能回復の検討

代表研究者 京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科

フューチャーステップ研究員 宗川ちひろ

共同研究者

京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 学内講師 岡田 博史

京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 病院助教 岡村 拓郎

京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 講師 濱口 真英

京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 教授 福井 道明

【抄録】

本邦のような超高齢社会において、フレイルの発症予防・対策は喫緊の課題である。我々は先行研究にて、microRNA Let-7 の阻害により Igf2bp2 の発現が亢進し、筋萎縮関連遺伝子の発現が抑制されること、加えて筋管細胞における糖取り込み能が向上することを報告したが、個体レベルでのフレイル予防効果は明らかではない。そこで本研究では、骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトマウス(Flox 群)を作成し、高脂肪食負荷により誘導したフレイルモデルにおいてその効果を検討した。その結果、Flox 群では体重および内臓脂肪の増加が抑制されたが、筋量や握力などにおいては抗サルコペニア効果を認めなかった。以上より、骨格筋特異的 Let-7 抑制は抗サルコペニアには直結しないものの、脂肪蓄積抑制を介してフレイル予防に寄与する可能性が示唆され、将来的には抗肥満症治療への応用が期待される。(400 字を目安に記載：380 字)

1. 研究の目的

本邦における超高齢社会においてフレイル(虚弱状態)の発症予防、対策は最重要課題である。フレイルは身体的脆弱性により要介護状態に至る前段階であり、ADL の低下や死亡のリスクとなる。フレイル予防のための骨格筋の筋量や機能の維持には運動療法だけでなく食事療法も重要である。近年、オーラルフレイルと呼ばれる経口摂取の障害により、エネルギー摂取が不足することが身体的フレイルが進行するリスクと考えられている (Hashimoto Y, Okada H, et al. *Nutrients*. 2022;14:759, Genki K, Okada H, et al. *Nutrients*. 2021;13:2107)。骨格筋機能の維持のためには骨格筋が十分なエネルギーすなわち糖を取り込むことが重要であり、骨格筋の糖取り込みが十分でないと骨格筋が萎縮し、フレイルの直接的原因となる (Kawano R, Okada H, et al. *Clin Nutr*. 2021;40:1613-1620, Okamura et al. *J Diabetes*. 2019;11:477-483)。申請者らは細胞実験において microRNA(miRNA)Let-7 の阻害が RNA 干渉により Igf2bp2 の発現の上昇を介して筋萎縮関連遺伝子の発現が抑制される知見、さらに筋萎縮に対する代償作用として 2 型糖尿病をもつ人において Let-7 の発現が低下している知見を明らかにしている (Okamura T, Okada H, et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:791363)。さ

らに Let-7 を阻害することで筋管細胞の糖取り込み能が向上することも確認し、Let-7 の抑制とフレイル予防をつなぐ機序として、骨格筋の糖取り込み能の向上を想定しているが、その機序は十分に解明されておらず、個体レベルでもフレイルが予防されるかは未確認である。本研究では個体レベルでの Let-7 抑制により骨格筋の糖取り込み能が向上しフレイルが予防されることを明らかにすることを目的として、食事誘導性フレイルモデルにおける骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトの抗フレイル効果の検討、食事誘導性フレイルモデルに対する核酸医薬の効果の検証を行い、これらのデータを統合的に解析することで、今後のフレイルの予防法及び治療法開発へとつなげる。今回使用する miRNA は生体内で安定である上、創薬も容易であることから、最終的にはヒトに対して標的 miRNA を筋特異的に調整することで、筋量の増大、筋力の増強を促進し、フレイルの発症や進展を予防するだけでなく、2 型糖尿病を始めとする生活習慣病の予防、改善を図ることができる。また、脳血管疾患や交通事故等でのリハビリテーションを要する患者に対しても、社会復帰への後押しとなる創薬イノベーションにつながる上に、新たな筋萎縮の予防・治療アプローチにつながる。

2. 研究方法と経過

2-1 食事誘導性フレイルモデルの作成：骨

格筋特異的転写因子 *Myf5* の発現と同期してタモキシフェン誘導型 Cre エストロゲン受容体(ER)が発現する *Myf5CreER* マウスに *Let-7* 遺伝子がノックアウトされる *Let7flox/flox* マウスを交配し骨格筋特異的 *Let-7* ノックアウトマウスを樹立する。骨格筋特異的 *Let-7* ノックアウトマウスを *Flox* 群、同腹仔の *Myf5CreERLet7flox/-* を *Ctrl* 群とする。

7 週齢の骨格筋特異的 *Let-7* ノックアウトマウス (*Flox* 群) および同腹仔のコントロールマウス (*Ctrl* 群) にタモキシフェンを投与し、リサーチダイエット社製の高脂肪食 (D12492, Research Diets Inc., USA) のペアフィーディングを 8 週間実施する。この飼料は、全エネルギーの構成比として 炭水化物 20%(うちショ糖 7%)、たんぱく質 20%、脂質 60%を給餌する。16 週齢にてサクリファイし、フレイル、遺伝子発現、タンパク質発現、リピドーム・メタボローム解析を評価する(各群 10 匹・合計 20 匹)。

2-2 フレイルの評価: 筋力(把持力)、筋量(ヒラメ筋・足底筋重量、ヒラメ筋最大膨部断面積)を測定し。骨格筋の質的評価としてミオシン重鎖(筋タンパク質)、PDK4(エネルギー代謝鍵酵素)、HDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)、MyoD(筋細胞分化のマスター遺伝子)、Myogenin(筋分化転写制御因子)、FoxO1(筋萎縮のマスター遺伝子)を免疫染色し、蛍光強度を蛍光顕微鏡(キーエンス社 BZ-X710)で測定する。

2-3 遺伝子発現解析: ヒラメ筋より総 RNA を抽出し、microRNA *let-7*、*Igf2bp2*(*let-7* の標的遺伝子)、*Glut1*(糖トランスポーター)、*Glut4*(糖トランスポーター)、*Myosin*(筋タンパク質)、PDK4(エネルギー代謝鍵酵素)の発現を RT-PCR で定量する。

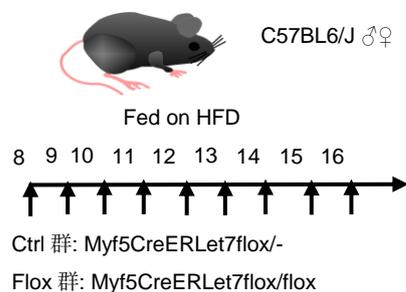
2-4 筋タンパク質定量評価: ヒラメ筋より総タンパク質を抽出し、*Igf2bp2*(*let-7* の標的タンパク質)、*Glut1*(糖トランスポーター)、*Glut4*(糖トランスポーター)、*Myosin*(筋タンパク質)、PDK4(エネルギー代謝鍵酵素)の発現を Western-blot で定量する。

2-5 リピドーム・メタボローム解析: 骨格筋 (15mg)、内臓脂肪(15mg)及び血清 (50 μ L)の各検体を凍結粉碎後、糖質・有機酸の固相抽出 (AISTI 社)・脂質抽出(ナカライテスク社)にて誘導体化処理後、GC/MS システム (Agilent7890B/5977B) を用いて測定する。得られた結果は Mass Profiler Professional にて Pathway 解析を実施、代謝マップに投影することで、2 群間の差異を可視化することができ

る。さらに大きく差異が認められたメタボライトをフレイル関連メタボライトの候補として、統計学的にランキングし選定する。

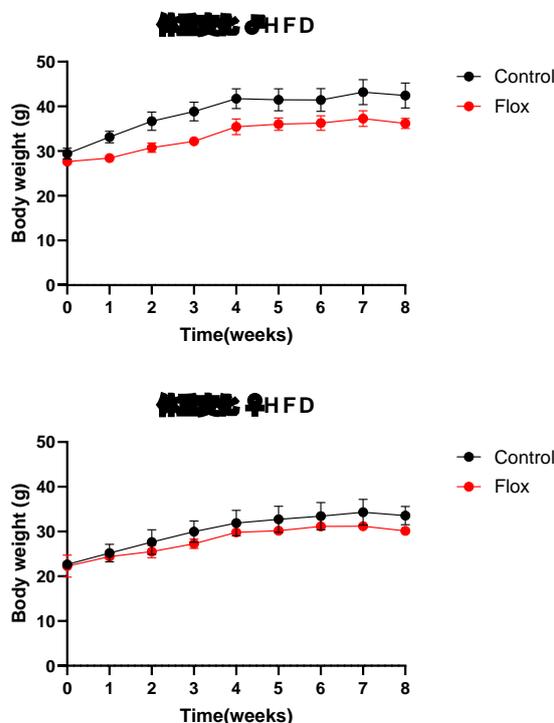
3. 研究の成果

3-1 食事誘導性フレイルモデルの作成:



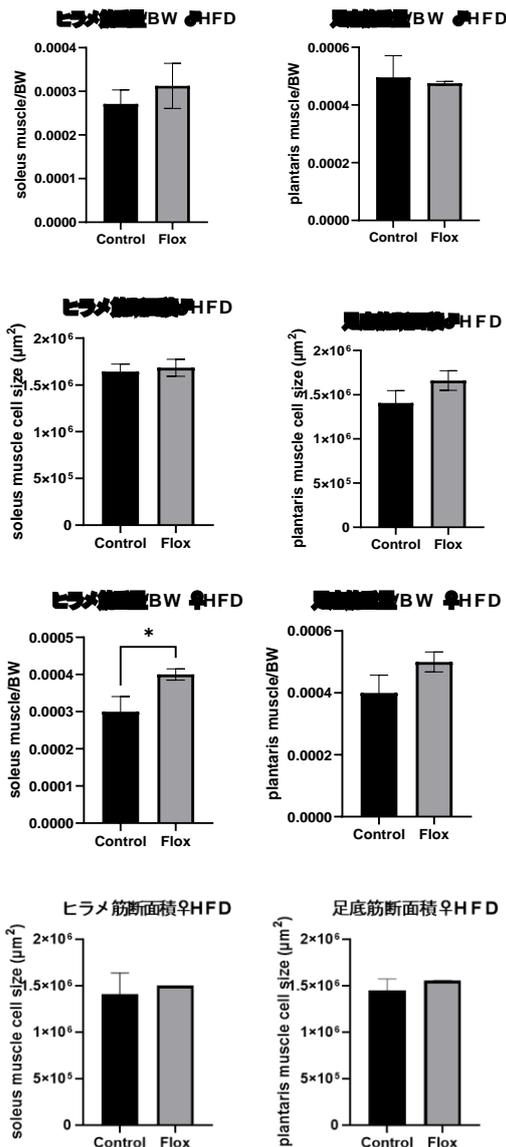
前述の方法で骨格筋特異的 *Let-7* ノックアウトマウスである *Myf5CreERLet7flox/flox* (*Flox* 群)を 4 匹 (雄 2 匹、雌 2 匹)、*Ctrl* 群である *Myf5CreERLet7flox/-*を 7 匹 (雄 3 匹、雌 4 匹) 作成することに成功した。さらにはこれらに 8 週齢から 16 週齢の間、HFD を給餌し食事誘導性フレイルモデルを作成した。

3-2 骨格筋特異的 *Let-7* ノックアウトで体重増加が抑制された:



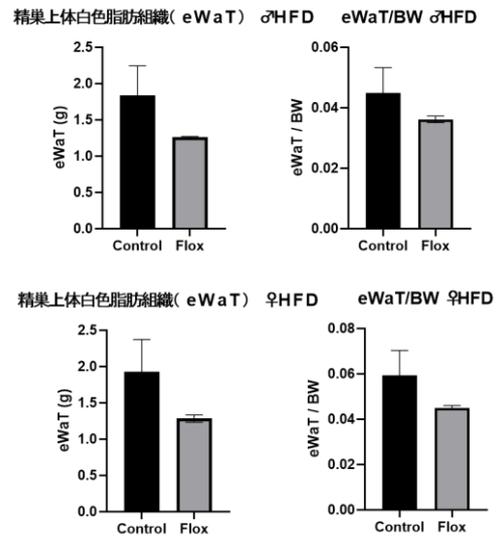
Flox 群において、雄雌マウスともに HFD により生じる体重増加が抑制された。

3-3 骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトで抗サルコペニア効果は認めなかった:



雄のヒラメ筋、足底筋において筋量(筋重量、筋断面積)を評価したが、Flox 群と Ctrl 群において有意差を認めず、骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトによる抗サルコペニア効果は認めなかった。握力においても同様に、Flox 群において握力の増加を認めなかった。

3-4 骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトで内臓脂肪増加抑制効果を認めた:



雄雌マウスともに、Flox 群では Ctrl 群と比較して内臓脂肪の増加が抑制された。

4. 今後の課題

本研究において、骨格筋特異的 Let-7 ノックアウトマウスでは、HFD による体重増加が有意に抑制された。一方で、当初期待していた骨格筋における抗サルコペニア効果は認められなかった。しかしながら、同マウスでは内臓脂肪の蓄積も抑制されており、これらの結果から、骨格筋から分泌される Let-7 が内臓脂肪の形成・蓄積を促進し、ひいては HFD による体重増加に関与している可能性が示唆された。なお、遺伝子改変マウスの作製には技術的困難があり、個体数が限られていたため、今後は検出力を高めるためにも十分な個体数を確保した上で、再検討が必要である。その上で、遺伝子発現解析、筋タンパク質量評価、リピドーム・メタボローム解析についても進めていく必要がある。

一方で、microRNA (miRNA) は、自身と相補的な配列をもつメッセンジャー RNA に結合し、mRNA の分解や翻訳阻害を介して標的遺伝子の発現を制御する (Lee RC et al., Cell 2003)。近年では、1つの miRNA が複数の遺伝子群を同時に制御することが明らかとなっており、多様な疾患病態における miRNA の関与が報告されている。このような背景から、特定の miRNA の発現を調節する核酸医薬の開発は、病態の進行を抑制しうる新たな治療戦略として注目を集めている。本研究では、当初フレイルにおける骨格筋の遺伝子発現制御異常に着目し、RNA 干渉技術を用いた核酸医薬による予防効果の可能性を検討していた。しかしなが

ら、今回、Let-7の骨格筋特異的阻害により内臓脂肪の蓄積および体重増加の抑制効果が確認されたことから、Let-7を標的とした新規の抗肥満症薬の開発につながる可能性が示唆された。今後は、Let-7の標的遺伝子群の同定や脂肪組織とのクロストーク機構の解明を通じて、より具体的な治療応用に向けた研究を進めていく必要がある。

5. 研究成果の公表方法

日本生理学会、The International Union of Physiological Sciences、日本糖尿病学会、米国糖尿病学会等で発表するとともに、Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 誌や Diabetes 誌等の一流国際誌における公表を目指す。

以上

(RNA Interference–Mediated Recovery of Skeletal Muscle Function for the Prevention of Frailty)

Primary Researcher: (Chihiro Munekawa)
(Future Step Researcher), (Department of Endocrinology and Metabolism, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto)

Co-researchers: (Hiroshi Okada)
(University Lecturer), (Department of Endocrinology and Metabolism, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto)
(Takuro Okamura)
(Clinical Assistant Professor), (Department of Endocrinology and Metabolism, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto)
(Masahide Hamaguchi)
(Lecturer), (Department of Endocrinology and Metabolism, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto)
(Michiaki Fukui)
(Professor), (Department of Endocrinology and Metabolism, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto)

In super-aged societies such as Japan, the prevention and management of frailty constitute pressing healthcare challenges. In our previous study, we demonstrated that inhibition of microRNA Let-7 upregulates Igf2bp2 expression, suppresses the expression of muscle atrophy-related genes, and enhances glucose uptake in myotubes. However, the effects of Let-7 inhibition on frailty prevention at the organismal level remain unclear. In the present study, we generated skeletal muscle-specific Let-7 knockout mice (Flox group) and evaluated their phenotype using a frailty model induced by high-fat diet loading. Compared with control mice, the Flox group exhibited significantly attenuated increases in body weight and visceral fat accumulation. However, no significant improvements were observed in skeletal muscle mass or grip strength, indicating a lack of direct anti-sarcopenic effects. These findings suggest that skeletal muscle-specific inhibition of Let-7 may contribute to frailty prevention primarily through the suppression of fat accumulation, rather than through direct effects on muscle preservation. This strategy may hold promise for future therapeutic applications targeting obesity-related frailty.