

博士論文

Functional analysis of miR-23-27-24 cluster miRNAs in
skeletal muscle plasticity

(骨格筋可塑性制御における miR-23-27-24 クラスター
マイクロ RNA の機能解析)

イ ミンジョン
李 玟 姫

Functional analysis of miR-23-27-24 cluster miRNAs in
skeletal muscle plasticity

(骨格筋可塑性制御における miR-23-27-24 クラスター
マイクロ RNA の機能解析)

東京大学大学院 医学系研究科

医学博士課程 生体物理医学専攻

指導教員 牛田 多加志 教授

イ ミンジョン
李 玟 姫

目 次

要旨.....	6
略語一覧.....	7
1. 序文.....	10
1.1 骨格筋の可塑性.....	10
1.1.1 骨格筋の機能的可塑性の制御.....	11
1.1.2 骨格筋の量的可塑性の制御.....	15
1.2 マイクロ RNA (microRNA; miRNA)	23
1.2.1 miRNA の生成過程.....	23
1.2.2 miRNA の機能.....	25
1.2.3 クラスターを形成する miRNA.....	27
1.3 骨格筋とマイクロ RNA.....	29
1.3.1 筋特異的に発現する miRNA.....	29
1.3.2 骨格筋における miR-23-27-24 の機能.....	35
1.4 本研究の目的.....	39
2. 方法	40
2.1 動物実験.....	40

2.2	筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損マウスの作製.....	42
2.3	ジェノタイピングと Ckmm-cre によるゲノムの組換えの確認.....	43
2.4	組織学的分析.....	45
2.5	RT-PCR.....	47
2.6	miRNA の定量.....	49
2.7	ウェスタンブロット.....	50
2.8	新生タンパク質の検出.....	52
2.9	筋線維の単離.....	53
2.10	筋力測定.....	54
2.11	統計処理.....	54
3.	結果.....	55
3.1	筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損 (dKO) マウスの作製.....	55
3.2	筋特異的 miR-23a/b dKO マウスの骨格筋表現型.....	58
3.3	自発性走行運動における miR-23a/b dKO マウスの骨格筋適応.....	63
3.3.1	自発性走行運動による骨格筋の量的変化.....	64
3.3.2	自発性走行運動による骨格筋収縮特性と代謝特性の変化.....	65
3.3.3	運動による内因性 miR-23a/b クラスターmiRNA 発現の変動.....	68

3.4 除神経による miR-23a/b dKO マウスの筋萎縮.....	70
3.4.1 除神経による骨格筋の量的変化.....	71
3.4.2 除神経によるタンパク合成と分解の変化.....	73
4. 考察.....	79
4.1 筋線維特異的な miR-23a/b クラスター-miRNA の欠損による筋線維組成の微 細な変化.....	79
4.2 骨格筋運動適応における miR-23a/b クラスター-miRNA の機能.....	80
4.3 運動誘発性の miR-23a/b クラスター-miRNA の発現変動.....	83
4.4 運動誘発性血管新生における miR-23a/b クラスター-miRNA の機能.....	84
4.5 筋量の調節に関する miR-23a/b クラスター-miRNA の機能.....	85
4.6 Ckmm-cre による筋特異的な miR-23a/b クラスター欠損モデルについて....	88
5. 結論.....	93
6. 謝辞.....	94
引用文献.....	96

要旨

骨格筋は様々な外部刺激に応答し、その機能や量を変化させる可塑性を有する。遺伝子発現を転写後レベルで抑制するマイクロ RNA (miRNA) が骨格筋の可塑性制御に関与することが分かってきた。miR-23-27-24 クラスターを形成する miR-23, miR-27, miR-24 は骨格筋可塑性の主要な調節因子を標的としており、骨格筋の可塑性制御に重要な役割を担う可能性が考えられる。本研究では、miR-23-27-24 クラスターを欠損したマウスを作製し、骨格筋可塑性に対する影響を検討した。その結果、これらの miRNA は骨格筋の発達や成長、運動に適応する際に生じる収縮・代謝特性の変化には関与しないことが示唆された。一方、骨格筋の量的可塑性に関わり、特に、遅筋の筋肥大を抑制している可能性が示唆された。

略語一覽

略語	正式表記
Acvr2a	activin receptor type IIA
Acvr2b	activin receptor type IIB
Ago	Argonaute
Alk4, 5	activin receptor-like kinase 4, 5
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
Atrogin-1(MAFbx/Atrogin-1)	muscle atrophy F box/atrophy gene-1
BMP	Bone morphogenetic protein
BmprII	BMP receptor type II
CLIP	Cross-linking Immuno-precipitation
con	control
COX	cytochrome c oxidase subunit
DGCR8	DyGorge syndrome critical region gene 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dnv	denervation
EDL	Extensor digitorum longus
eIF3-f	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ERR	estrogen-related receptor
ES cell	Embryonic stem cell
Exp5	Exportin 5
Fboxj3	Forkhead box j3
FDB	Flexor digitorum brevis
Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1
Flox	flanked by loxP sequences
FLRG	Follistatin-related gene protein
FoxO	Forkhead box O
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GASP1	Growth and differentiation factor-associated serum protein-1
GATA2	GATA-binding factor 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3

略語	正式表記
HDAC	Histone deacetylase
IGF-1	Insulin-like growth factor
Mck	Muscle creatinine kinase
Mef	Myocyte enhancer factor
miRNA	microRNA
mTOR	mechanistic (mammalian) target of rapamycin
MuRF1	muscle RING finger 1
MyBP-C	Myosin-binding protein C
MyHC	Myosin heavy chain
NRF	nuclear respiratory factor
ORF	Open reading frame
PAK4	Serine/threonin-protein kinase PAK 4
PAN	poly(A)-nuclease
Pax	Paired box
Pecam-1	Platelet endothelia cell adhesion molecule
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	Protein kinase B
PL	Plantaris
Pola1	DNA polymerase α
PP2AC	protein phosphatase 2 A catalytic subunit
pre-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Ran	Ras-related nuclear protein
RISC	RNA-induced silencing complex
SDH	Succinate dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-poly acrylamide gel electroporesis
snRNA	small nuclear RNA
Sol	soleus
SRF	Serum response factor

略語

TGF- β

TGF β RII

TNRC6

UTR

VEGF

正式表記

Trnasforming growth factor- β

TGF- β receptor type II

Trinucleotide repeat-containing 6

untranslated region

Vascular endothelial growth factor

1. 序文

1.1 骨格筋の可塑性

骨格筋はヒト生体内で最も大きい器官であり，身体の構造維持や動きを生み出すのみならずエネルギー代謝にも重要な役割を果たすことが知られている。

骨格筋は様々な外部刺激に応答し，その機能や量を変化させる可塑性を有する。

例えば，持久性運動は疲労耐性が高い筋線維を増加させ，酸化的な代謝能力を亢進させる。また，負荷の高いレジスタンス運動は骨格筋を肥大させ，ベッドレストやギブス固定は骨格筋を萎縮させる。

筋量の維持は高齢者や各種慢性疾患患者の QOL に重要であり，骨格筋エネルギー代謝能の向上は様々な生活習慣病の予防・改善につながることから，現代社会の健康の維持・増進において，骨格筋の機能的・量的可塑性のメカニズムを解明することが重要となってきた。現在までに骨格筋可塑性制御について多くの研究がなされており，ハブとなるいくつかのシグナル経路や遺伝子が同定されている。本項では，骨格筋可塑性の制御について現在までに得られている知見をまとめる。

1.1.1 骨格筋の機能的可塑性の制御

骨格筋は収縮・代謝特性の異なる筋線維によって構成された組織である。収縮特性は筋線維に発現する収縮タンパク質であるミオシン重鎖 (Myosin heavy chain; MyHC) の種類によって決定される (図 1)。成体のげっ歯類においては主に、収縮速度が遅い遅筋型の MyHC I と、収縮速度が速い速筋型の MyHC IIa, MyHC IIc/x, MyHC IIb が存在する。速筋型 MyHC の収縮速度は、MyHC IIa, IIc/x, IIb の順で速くなり、ヒト筋線維においては MyHC IIb タンパクは発現していないと報告されている¹。一般的に筋力は筋断面積に比例し²、断面積が大きい速筋線維ほど収縮時に大きな力を発揮する。MyHC I 線維を支配する運動神経は遅い発火頻度 (18-21 Hz) で長時間 (300-500 秒) インパルスを送り、MyHC II 線維を支配する運動神経は速い発火頻度 (MyHC IIa: 50-80 Hz; MyHC IIb: 70-90 Hz) で短時間 (MyHC IIa: 60-140 秒; MyHC IIb: 0.8-3.9 秒) インパルスを送る³。運動神経の発火パターンが筋線維タイプに及ぼす影響を検討するために、遅筋に速筋型の神経発火パターンを、速筋に遅筋型の神経発火パターンを入力する実験が行われた結果、速筋型の発火パターンが入力された遅筋は速筋化し、遅筋型が入力された速筋は遅筋化することが明らかになった⁴。また、持続的な筋収縮を伴う持久性運動が速筋を遅筋化し、抗重力筋へ

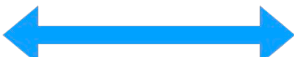
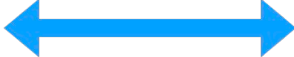

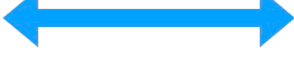


MyHC type	I	IIa	IIc/x	IIb
収縮速度	遅い			速い
筋線維断面積	小さい			大きい
発揮する力	小さい			大きい
エネルギー代謝	酸化的			解糖的
ミトコンドリア	多い			少ない
疲労耐性	高い			低い

図 1. ミオシン重鎖 (Myosin heavy chain; MyHC) タイプによる筋線維の特徴

の神経入力が低下する宇宙飛行によって遅筋が速筋化することからも⁵, 神経入力パターンにより筋線維の収縮特性が変化することが示唆された。

筋線維の収縮特性とエネルギー代謝には強い関連性が存在する。疲労耐性が高い MyHC I 線維は、ミトコンドリアの量やそれらを取り巻く毛細血管が多く、酸化的な代謝に優れている⁶。MyHC IIa 線維は速筋線維でありながら疲労耐性が高く、MyHC I と類似した酸化的代謝特性を有している⁷。疲労耐性が低い MyHC IIc/x と IIb は毛細血管やミトコンドリアの量が少なく、解糖系代謝に優れている⁶。持久性運動は骨格筋において疲労耐性の高い筋線維を増加させ、骨格筋内ミトコンドリアや毛細血管の新生を亢進する⁸ (図 2)。これは、骨格筋が酸化的代謝能力や筋疲労耐性を向上するために機能的可塑性を図った結果である。持久性運動により Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator

1 alpha (PGC-1 α) の発現が亢進し、骨格筋のミトコンドリア新生に重要であることが報告されてきた⁹。このため、PGC-1 α はミトコンドリア新生のマスターレギュレーターとして知られており、estrogen-related receptor (ERR) , nuclear respiratory factor (NRF) を含む様々な転写因子と共役し、ミトコンドリア新生を亢進することが報告されている¹⁰⁻¹²。骨格筋特異的に PGC-1 α を強発現したマウスにおいて、ミトコンドリアの増加が認められ¹³、運動時の走行距離や最大酸素摂取量が増加することから¹⁴、PGC-1 α が骨格筋の酸化的代謝能力を向上させることが示唆された。一方で、骨格筋特異的な PGC-1 α 欠損マウスにおいては、自発走行運動によるミトコンドリア新生や血管新生が阻害されたものの、走行距離や運動による筋線維組成の変化には野生型マウスと有意な差が認められなかった¹⁵。他方、PGC-1 α のホモログである PGC-1 β を同時に骨格筋特異的に欠損させたマウスにおいても、酸化的代謝能力は低下するが、MyHC I 線維の割合は逆に増加することが報告されている^{16,17}。これらの gain of function と loss of function の検討から、骨格筋において PGC-1 α は代謝特性の制御に重要であり、MyHC I の発現に関与しているが、持久性運動による MyHC IIa 線維の増加には関与しないことが示唆された。

骨格筋組織中の血管新生は、継続的な筋収縮活動に必要な酸素やエネルギーを供給するために重要な適応反応である。Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生を誘導する重要な因子であり、骨格筋特異的 VEGF 欠損マウスにおいて持久性運動による血管新生が阻害され、筋持久力の向上が認められないことから¹⁸、骨格筋由来の VEGF シグナルが運動による血管新生に重要であると考えられている。一過性及び長期間の持久性運動は、骨格筋において VEGF mRNA 発現を亢進し^{19,20}、特に疲労耐性が低い速筋線維で多く発現することが報告されている^{20,21}。4 週間の自発性走行運動において、MyHC IIb と IId/x 線維における VEGF の発現が運動初期（3 日目）に亢進し、続いて IIb と IId/x 線維で血管新生が生じた後（7 日目以降）、骨格筋全体における MyHC IIa の割合が増加した²² ことから、持久性運動による筋収縮特性の変化は血管新生から始まることが示唆されている。

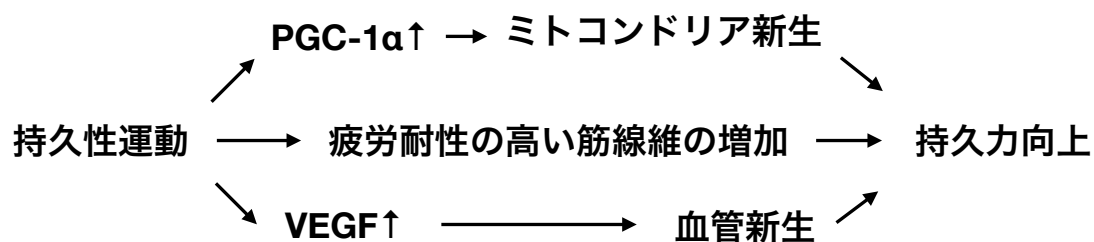


図 2. 持久性運動による骨格筋の適応反応

持久性運動は骨格筋内に疲労耐性の高い筋線維を増加させ、PGC-1α や VEGF の発現によりミトコンドリアや毛細血管の新生を亢進する。

1.1.2 骨格筋の量的可塑性の制御

骨格筋の量的変化は筋細胞内のタンパク質合成・分解のバランスにより調節される。様々な先行研究により骨格筋の肥大において、細胞内タンパク質合成を亢進する Insulin-like growth factor (IGF) -1-phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt (Protein kinase B; PKB)-mechanistic (mammalian) target of rapamycin (mTOR) のシグナル経路が重要であることが分かってきた^{8,23} (図3)。IGF-1は IGF-1受容体 (IGF-1R) に結合し、PI3Kを介してAktを活性化する²⁴。活性化したAktは下流のmTOR及びp70S6K (S6K) をリン酸化し^{24,25}、またGlycogen synthase kinase 3 (GSK3) を抑制する²⁶ことによってタンパク合成を亢進することが分かっている。筋特異的にIGF-1を強発現したマウス⁸やAktを恒常的に活性化したマウス²⁷⁻²⁹では骨格筋が肥大し、IGF-1Rを筋特異的に欠損したマウスでは筋線維の数と断面積の低下を伴った骨格筋の成長不全が認められたことから³⁰、成長に伴う筋肥大においてIGF-1-Aktシグナルが重要であることが示唆された。

メカニカルストレス過負荷の実験モデルである共同筋切除による代償性筋肥大において、筋肥大とともに骨格筋内IGF-1 mRNAや³¹、AktとS6Kのリン酸化が

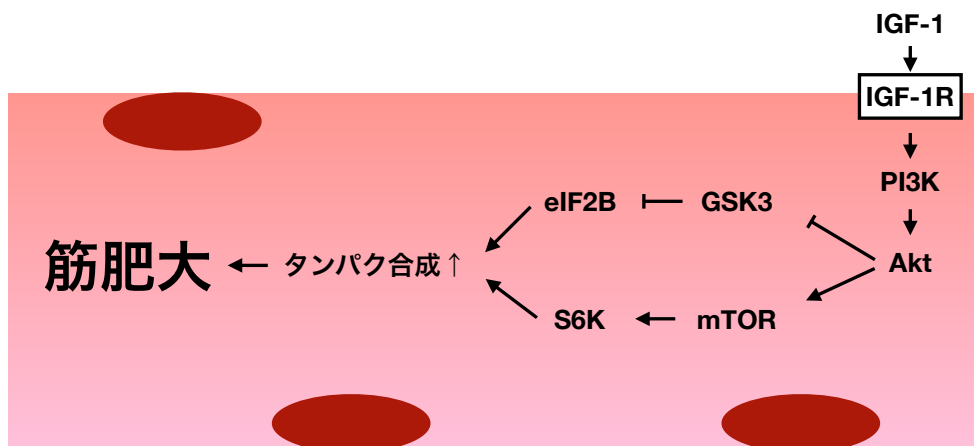


図 3. 筋肥大における IGF-1-Akt シグナル

IGF-1 は IGF-1 受容体に結合し下流の PI3K を介して Akt をリン酸化する。Akt のリン酸化は下流の GSK3 を抑制，mTOR を活性化することによりタンパク合成を亢進する。

亢進することが認められ³²，またRapamycinにより代償性筋肥大が抑制される³²ことから，負荷の高い筋活動による筋肥大においてもIGF-1-Aktシグナルが重要であることが示唆された。しかし，IGF-1のmRNAやタンパクは共同筋切除の1日後に³³，AktやGSK3-βのリン酸化は2-3日後になって初めて亢進するのに対し³⁴，下流のS6Kのリン酸化は共同筋切除後3時間以内から亢進する³⁵ことから，代償性筋肥大におけるタンパク合成はIGF-1-Aktシグナル非依存的に始まることが示唆された。また，筋特異的にdominant-negative IGF-1Rを強発現させたマウスにおいて，共同筋切除による筋肥大に野生型マウスとの差が認められないことや¹⁴，共同筋切除^{34,36}のみならずex vivoにおける骨格筋の伸張性収縮³⁷により，Akt非依存的なS6Kのリン酸化が亢進することが報告され，電気刺激による筋肥大モデル

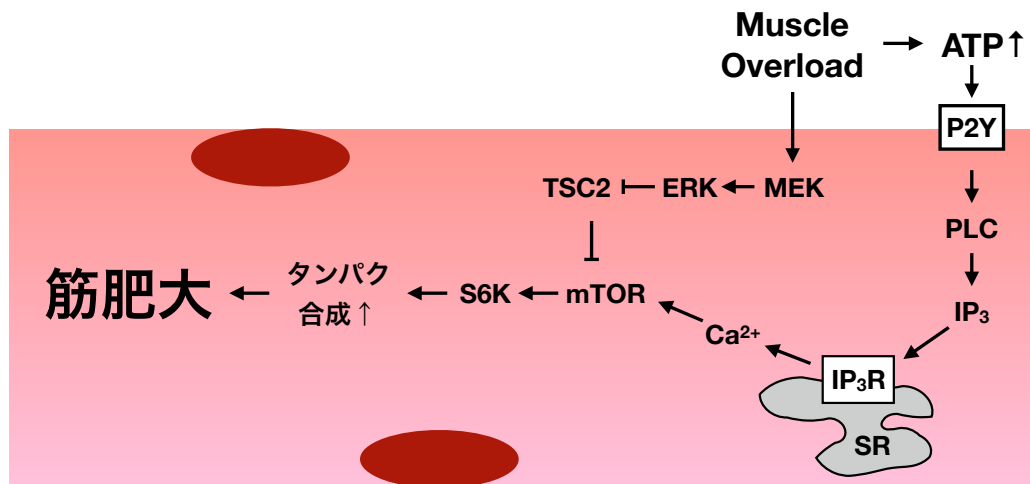


図 4. 筋肥大における IGF-1-Akt シグナル非依存的な細胞内シグナル

レジスタンス運動のような骨格筋における過負荷は、MEK-ERK シグナルを活性化するので、TSC2 の抑制によって mTOR のリン酸化が Akt 非依存的に生じる。また、筋収縮活動により上昇した細胞外 ATP は筋小胞体（Sarcoplasmic reticulum; SR）からカルシウムイオン（Ca²⁺）を細胞質に放出させ mTOR を活性化し、Akt 非依存的にタンパク合成を亢進する。

においても Rapamycin によりタンパク合成が部分的にのみ抑制された³⁸ことから、メカニカルストレス増加により誘導される筋肥大には、IGF-1-Akt シグナル以外の経路が存在すると示唆された（図4）。

レジスタンス運動は、骨格筋において mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) / extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルも亢進することが知られており³⁹、共同筋切除の1日後にもこのシグナルが亢進する³⁴。MEK/ERK シグナルは mTOR のリン酸化を阻害する Tuberous sclerosis complex (TSC) 2 を抑制するため⁴⁰、このシグナルによって共同筋切除の1日目に mTOR のリン酸化の抑制が解除され、Akt 非依存的にタンパク合成が亢進される可能性が示唆された

34. さらに近年，筋収縮活動により上昇する細胞外ATPによりAkt非依存的にmTORが活性化され，筋肥大が誘導されることが報告された⁴¹．細胞外ATPは筋細胞においてプリン受容体であるP2Y受容体に結合し，phospholipase C (PLC)を介してinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)を増加させることが知られている⁴²．IP₃は筋小胞体に存在するIP₃受容体に結合することで，筋小胞体内 (Sarcoplasmic reticulum; SR) のカルシウムイオン (Ca²⁺) を細胞質に放出し^{42,43}，細胞内Ca²⁺濃度の上昇はmTORやその下流のS6Kのリン酸化を亢進することが分かっている⁴⁴．これらのことから，レジスタンス運動による筋肥大ではIGF-1-Aktシグナルのみならず，筋収縮活動により上昇した細胞外ATPが細胞内Ca²⁺濃度を上昇させてmTORを直接活性化する，Aktに依存しない経路も存在する可能性が示唆された．

一方，筋収縮活動の低下のみならず，絶食による栄養不足，がん悪液質や糖尿病などの病理学的変化は骨格筋内のタンパク分解を亢進させ，筋萎縮を引き起こす⁴⁵．このタンパク分解はユビキチンリガーゼ・プロテアソームシステムが重要な役割を担っている⁴⁶．様々な筋萎縮条件における遺伝子発現プロファイルを検討した研究により，筋特異的E3ユビキチンリガーゼであるMAFbx/atrogen-1 (Atrogen-1) とMuscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) の発現が，筋萎縮により

最も強く誘導されることが明らかになった^{27,47}。Atrogin-1欠損マウスは除神経による筋委縮に抵抗性を示し⁶，small hairpin RNA (shRNA) によるAtrogin-1のノックダウンが絶食による筋委縮を抑制することが報告され⁴⁸，またMuRF1欠損マウスも除神経，後肢懸垂，グルココルチコイドによる筋委縮に抵抗を示す⁴⁹⁻⁵¹ことから，Atrogin-1とMuRF1によるタンパク分解が筋委縮において重要であることが明らかとなった。Atrogin-1とMuRF1によりユビキチン化される標的分子として，筋線維を構成する構造タンパク質及び筋分化やタンパク質の発現を制御する分子が報告されている⁵²⁻⁵⁷ (図5)。筋線維内はミオシンフィラメント (thick filament) とアクチンフィラメント (thin filament) から形成されたサルコメア構造が配列されており，各サルコメアはdesminやvimentinなどの中間径フィラメント (intermediate filament) により結合，安定化されている。Yeast two-hybrid法によってMuRF1がMyosin light chain (MyLC) 1やTitin/Connectinを含む複数の筋線維構造タンパク質と相互作用し⁵⁸，MuRF1の機能欠失型変異 (Ring-deletion mutant) マウスにおいて，除神経や絶食による筋委縮の際，thick filamentの構成タンパク質であるMyosin light chain (MyLC) とMyosin binding protein c (MyBP-C) のユビキチン化が阻害されることが明らかになった⁵⁷。Atrogin-1もintermediate filamentの構成タンパク質であるdesminやvimentinをユビキチン化することが報

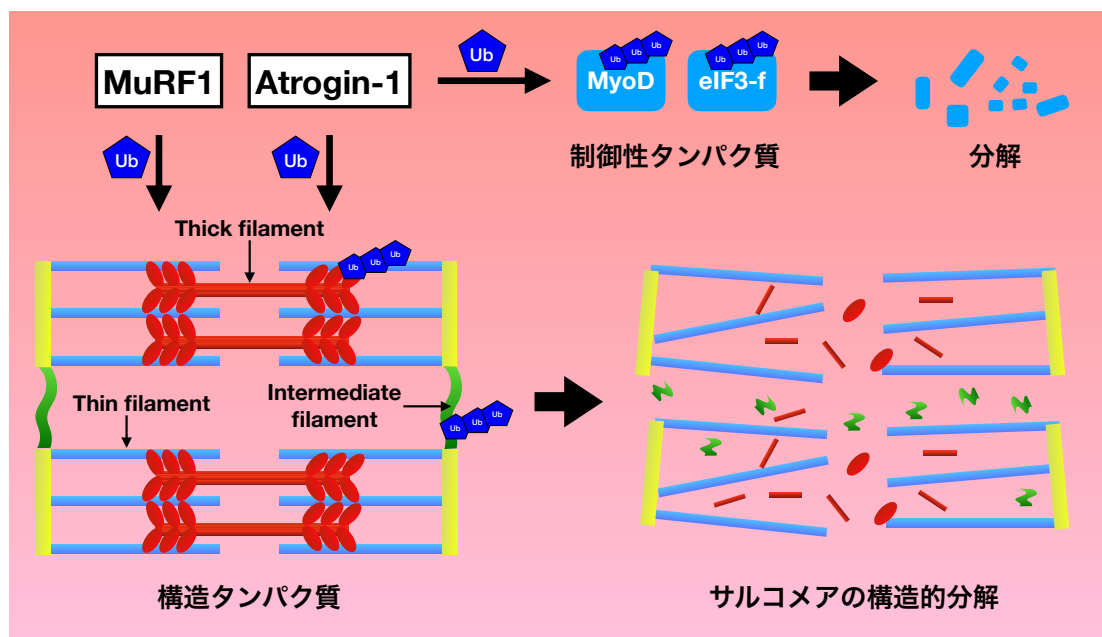


図 5. 筋特異的ユビキチンリガーゼ MuRF1 と Atrogin-1 による標的タンパク質

MuRF1 と Atrogin-1 はサルコメアの構造を形成するタンパク質をユビキチン化し、骨格筋萎縮時にサルコメアの構造的分解を誘導する。また、Atrogin-1 は筋分化を制御する MyoD と翻訳開始因子である eIF3-f を標的とし、筋萎縮の際に筋分化やタンパク合成を抑制する。

告されている⁵³。これらのことから、筋萎縮に際して MuRF1 と Atrogin-1 により筋フィラメントの構造的分解が促進されることが示唆された。さらに、Atrogin-1 は筋分化調節因子である MyoD や翻訳開始因子である eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f (eIF3-f) をターゲットとすることが知られている⁵⁴⁻⁵⁶。分化した C2C12 筋管細胞において、飢餓や過酸化水素刺激により筋萎縮を誘導すると Atrogin-1 でユビキチン化される MyoD の分解が促進され^{54,56}、Atrogin-1 によりユビキチン化されない変異型 MyoD を発現させたマウスでは、絶食による筋萎縮が抑制される⁵⁶。Atrogin-1 による MyoD の分解亢進によって、筋量維持に必要な

な筋芽細胞の分化による新しい筋核の融合が阻害されることで、筋萎縮の亢進に寄与する可能性が示唆された。また、Atrogin-1はmRNAの翻訳開始に重要なeIF3-fをユビキチン化することで、タンパク合成を抑制することも報告されている⁵⁵。

近年、IGF-1-AktシグナルとAtrogin-1やMuRF1によるタンパク合成と分解が、Transforming growth factor (TGF)- β スーパーファミリーによって拮抗的に調節されることが明らかとなった^{59,60} (図6)。TGF- β ファミリーに属するMyostatinは骨格筋特異的に発現しており、その機能欠失型変異が骨格筋を驚異的に肥大させることが報告された⁶¹⁻⁶⁴。TGF- β ファミリーはtype IIレセプターのactivin receptor type IIA, IIB (Acvr2a, Acvr2b)やTGF- β receptor type II (TGF β RII)に結合し、type Iセリン-スレオニンキナーゼレセプターであるactivin receptor-like kinase 4, 5 (Alk4, 5)を動員することで、下流のSmad2/3をリン酸化し⁶⁵、リン酸化されたSmad2/3はSmad4と複合体を形成し、核に移行してターゲット遺伝子の転写調節を行う。また、Smad2/3の恒常的な活性化はAtrogin-1のプロモーター活性を亢進し⁶⁶、反対にSmad3の欠損はMyostatin誘導性のAtrogin-1の発現を抑制することが報告されている⁵²。さらに、Myostatin誘導性のsmad2/3シグナルがIGF-1-Aktシグナルを阻害することが知られている⁶⁷。

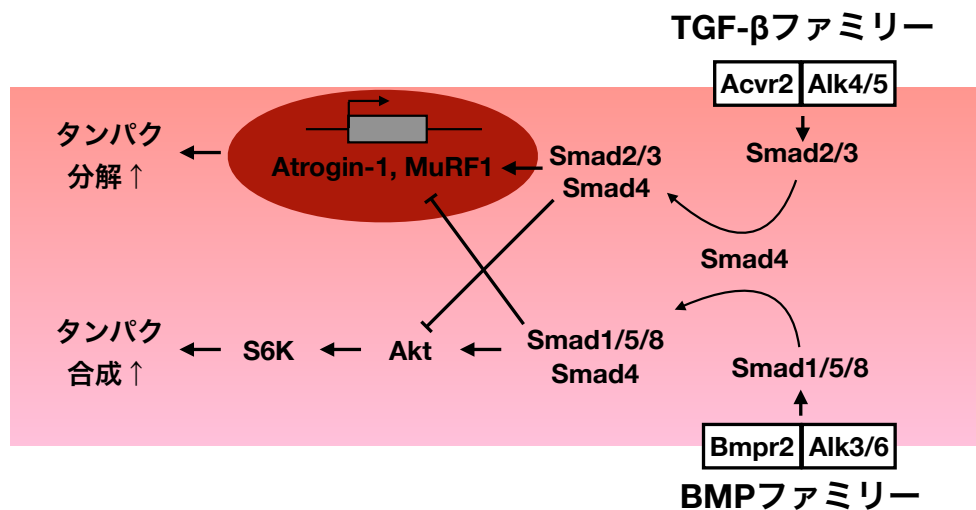


図 6. タンパク合成・分解に対する TGF- β スーパーファミリーの拮抗的な調節

TGF- β ファミリーは Smad2/3 により細胞内シグナルを伝達する。Smad2/3 は Smad4 と複合体を形成して核に移行し、Atrogin-1 や MuRF1 の転写を亢進し、タンパク分解を促進する。また、Smad2/3 は Akt を抑制し、タンパク合成を抑制する。BMP ファミリーは Smad1/5/8 により細胞内シグナル伝達を行い、Smad1/5/8 は Smad2/3 と競合的に Smad4 と複合体を形成する。Smad1/5/8 と Smad4 の複合体は、Smad2/3 と反対の機能を有し、Atrogin-1 と MuRF1 の転写を抑制、Akt シグナルを亢進する。

一方、Bone morphogenic protein (BMP) ファミリーは BMP receptor type II (BmprII)

及び Acvr2a, Acvr2b に結合し、Alk3, 6 を動員することで下流の smad1/5/8 をリン

酸化する⁶⁸。smad1/5/8 は smad2/3 と競合的に smad4 と複合体を形成することで、

smad2/3 による筋萎縮シグナルを抑制し、Akt-mTOR シグナルを活性化することが

が報告された^{32,59,69}。また、smad1/5/8 は筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼの

Atrogin-1, MuRF1 や F-box protein 30 (Fbxo30) の発現を抑制することから、タ

ンパク分解の抑制にも関与することが明らかになった^{59,69}。

1.2 マイクロ RNA (microRNA; miRNA)

miRNA は約 20 塩基長の短いノンコーディング RNA であり、標的遺伝子の mRNA に対合し翻訳を抑制あるいは mRNA の分解を誘導することが知られている^{70,71}。現在までヒトにおいて 2500 種以上もの miRNA が同定され⁷²、ヒトゲノム上にコードされている約 60% の遺伝子が miRNA の標的であると予想されている⁷³。また、miRNA は発生・発達⁷⁴ やエネルギー代謝^{75,76}、疾病⁷⁷ など様々な生命現象に関与することが報告されている。また、miRNA の標的 mRNA への制御は進化的に保存されており⁷⁸、miRNA による遺伝子発現の調節が様々な生命現象に重要であることが示唆されている。

1.2.1 miRNA の生成過程

miRNA はタンパク質をコードする mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ (pol) II により転写され⁷⁹、一連のプロセスを経て成熟型 miRNA となる (図7)。miRNA の初期転写産物 (primary miRNA; pri-miRNA) は多くの場合 1kb 以上の長い RNA 鎖で、自己相補性を示す配列が対合しステムループ (stem-loop) 構造を形成する。核内に存在する RNase タイプ III エンドヌクレアーゼの Drosha は補助因子である DGCR8 (DyGorge syndrome critical region gene 8) と複合体を形成し、

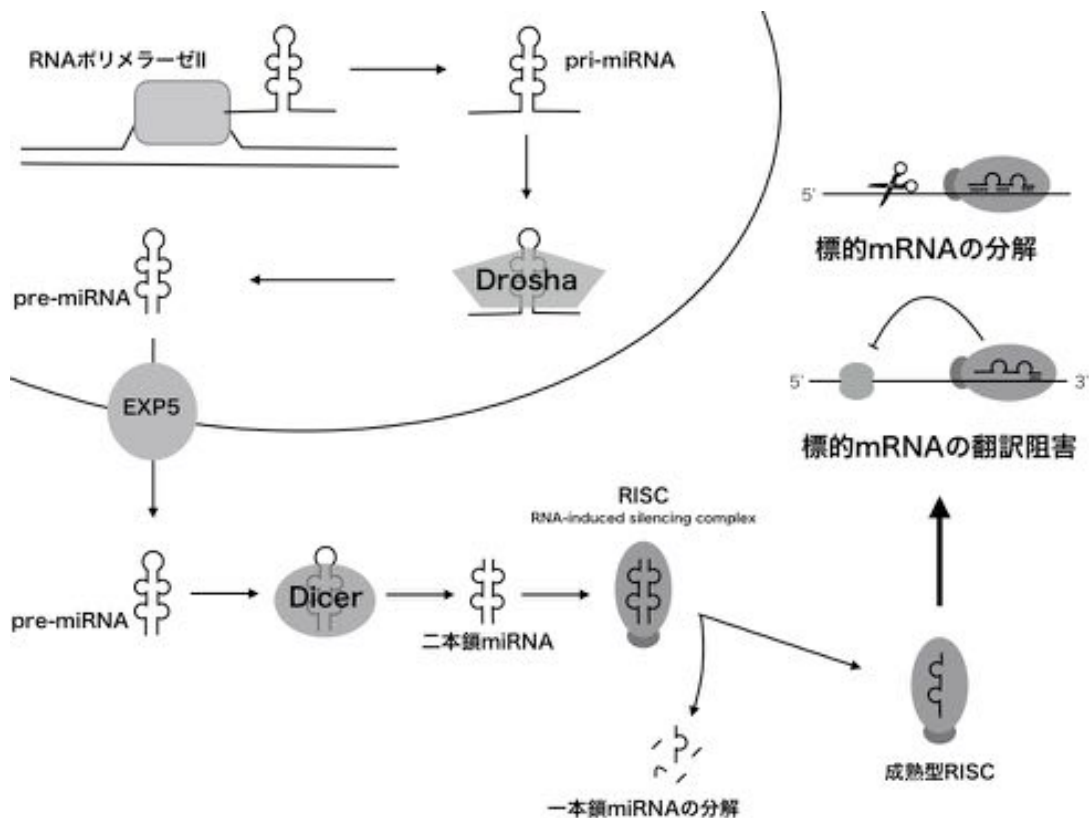


図 7. miRNA の生成過程

ゲノムから RNA ポリメラーゼ II (RNA pol II) により転写された primary-miRNA (Pri-miRNA) は Drosha によってヘアピン構造が切り出され, precursor miRNA (pre-miRNA) となる. Exportin5 によって細胞質に移行された pre-miRNA は Dicer によりループ構造が切断され, 二本鎖 miRNA となり Argonaute と RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する. 二本鎖 miRNA のうち 1 本鎖が分解され, 標的 mRNA に対合可能な成熟型 RISC となる. (李 ミンジョン, 秋本 崇之, マイクロ RNA と骨格筋の適応機構, 第 66 巻第 9 号, 体育の科学, 2016 より引用)

pri-miRNAの両末端にあるステム構造の基部を切断する⁸⁰. このプロセスにより

pri-miRNAはヘアピン構造を有した約65塩基のmiRNAの前駆体 (precursor

miRNA; pre-miRNA) に切断される. Pre-miRNAは輸送タンパク質であるExportin

5 (Exp5) により核から細胞質に移行する^{81,82}. Exp5によるPre-miRNAの輸送に,

Exp5とGTP結合タンパク質であるRas-related nuclear protein (Ran) /GTPとの複合体形成が重要であると報告されている^{82,83}。輸送されたpre-miRNAはRNase タイプIIIエンドヌクレアーゼであるDicer1によってループ構造が切断され⁸⁴、約22塩基対の2本鎖RNAになる。2本鎖RNAはRNA結合タンパクであるArgonaute (Ago)に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC) の前駆体を形成する⁸⁵。その後2本鎖RNAのうち1本が選択され (guide strand; ガイド鎖) , 反対鎖 (passenger strand) がRISCから除去されることで、標的のmRNAに対合可能な成熟型RISCとなる⁸⁵。2本鎖RNAの分離においてガイド鎖側の12から15番目の塩基対のミスマッチが重要であり⁸⁶、5'末端の熱力学的安定性の低いRNA鎖がガイド鎖として選択されることが多いと報告されている⁸⁷。

1.2.2 miRNA の機能

miRNA は標的遺伝子の発現を転写後抑制する⁸⁸。miRNA と相補性の高い結合を示す mRNA は分解が促進され⁸⁹⁻⁹¹、相補性の低い mRNA は翻訳が抑制されると報告されてきた⁹²⁻⁹⁵。前者は、主に植物細胞の miRNA で見られ、標的 mRNA と miRNA が、ミスマッチが5塩基対以下の相補性が非常に高い結合をすることで、エンドヌクレアーゼ機能を有する Ago により mRNA が分解されるとされて

いる^{91,96,97}。一方、後者は動物細胞の miRNA で見られる現象であり、動物細胞の miRNA は 5'末端側にある 2 から 8 番目の塩基で構成された‘Seed’配列に依存して標的遺伝子を認識、抑制する^{88,98} (図 8)。例外的に、哺乳類にも miRNA と

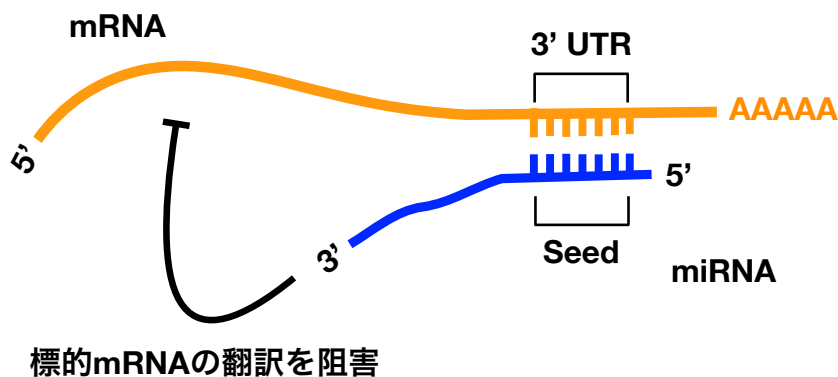


図 8. miRNA の Seed 配列

動物細胞の miRNA は 5'側の 2 から 8 番目のヌクレオチドで構成された Seed 配列が標的 mRNA の 3' UTR に結合することで標的 mRNA の翻訳を阻害する。

高い相補性を示す結合により mRNA が分解されることが報告されているが^{90,99}、ほとんどの動物細胞の miRNA は標的 mRNA と seed 配列による部分的な結合によって機能すると考えられている。miRNA による標的 mRNA の翻訳抑制において、Ago に結合する trinucleotide repeat-containing 6 (TNRC6) が重要な役割を果たす^{100,101}。TNRC6 は CCR4-NOT と PAN2-PAN3 を含む脱アデニル化酵素複合体と相互作用し、標的 mRNA の脱アデニル化を亢進し¹⁰²、翻訳開始を阻害することで¹⁰³、標的 mRNA の安定性を低下させ、翻訳抑制に関与することが報告さ

れている。

miRNA の結合部位は、動物細胞においては主に mRNA の 3' untranslated region (UTR) に存在しており、その配列は進化的に保存されている⁷⁸。一部例外的に 5' UTR や Open reading frame (ORF) に seed 結合配列を持つ mRNA も存在する¹⁰⁴。Cross-linking Immuno-precipitation (CLIP) によって Ago と cross-link した mRNA の配列を分析した研究によると、RISC は mRNA と無作為に相互作用をしているが、seed 配列以外での結合は mRNA の抑制を認めないことから¹⁰⁵⁻¹⁰⁷、標的の mRNA 抑制において miRNA の seed 配列による結合が重要であることが示唆された。

わずか 7 塩基の短い Seed 配列による結合は、単一の miRNA が数百の mRNA を標的とし、単一の mRNA が複数の miRNA によりターゲットされることを可能とする。単一の miRNA が数百の標的遺伝子の発現レベルを穏やかに制御すると実験的に検証されたことから¹⁰⁸⁻¹¹⁰、miRNA がグローバルな遺伝子発現を転写後レベルで調節するファインチューナーであることが示唆されている。

1.2.3 クラスターを形成する miRNA

多くの miRNA は細菌のオペロンのようゲノム上にクラスターを形成

してコードされている¹¹⁰⁻¹¹²。現在同定されている miRNA のうち、ゼブラフィッシュでは約 50%、マウスでは 30%、ヒトでは 20%の miRNA がクラスターを形成している¹¹⁰。ゲノム上にコードされている miRNA クラスターには、miR-34b-34c と miR-449c-449b-449a のように同一な Seed 配列を持つ miRNA ファミリーによって構成されるクラスター(ホモクラスター)や、miR-23a-27a-24-2 と miR-206-133b のように異なる Seed 配列を持つ miRNA ファミリーで構成されたクラスター (ヘテロクラスター)、そして、miR-17-18a-19a-20a-19b-1-92a-1 のように同じ miRNA と異なる miRNA ファミリーが混在するクラスター(ホモ・ヘテロクラスター)が存在する。多くの miRNA クラスターは 2, 3 種類の miRNA ファミリーで構成されているが¹¹³、ヒト (C19mc クラスター) とマウス (sfmbt2 クラスター) において数十種以上の miRNA 遺伝子で構成された巨大な miRNA クラスターも存在する^{110,114,115}。

クラスターを形成する複数の miRNA は、単一の polycistronic な転写物として転写される^{84,116,117}。このため、同じクラスターに属する miRNA は細胞や組織において類似した発現パターンを示し^{110,118,119}、また各 miRNA によって標的とされる遺伝子が類似したシグナル経路に関わっている^{109,110} ことから、同じクラスターに属する miRNA は同じ生命現象を協調して制御することが示唆されて

いる。さらに、一度形成された miRNA クラスターは進化的に保存されていることから^{113,118}、生命現象において miRNA クラスターが一つの機能単位として重要であると考えられる。

1.3 骨格筋と miRNA

miRNA による標的遺伝子の抑制は miRNA の発現量に依存する^{120,121}ため、ある組織において高い発現量を示す miRNA がその組織内の遺伝子発現調節に大きな影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。骨格筋において、特異的かつ高い発現量を示す miRNA が複数同定されており^{122,123}、その機能についてこれまでに多くの研究がなされてきた。また、筋特異的 miRNA 以外のユビキタスな発現を示す miRNA にも骨格筋の生理現象を制御する種がいくつか報告されている。本項では、骨格筋における miRNA の機能について現在までの知見を概説する。

1.3.1 筋特異的に発現する miRNA

筋特異的 miRNA として miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-499 が報告されている^{122,123}。miR-1 ファミリー (miR-1 と miR-206) は miR-133 ファミ

リーと miR-1~133a, miR-1~133a, miR-206~133b, miR のクラスターを形成してゲノム上にコードされている。筋特異的 miRNA は骨格筋と心筋を含んだ横紋筋に発現するが, miR-206 と miR-133b は骨格筋に特異的に, miR-208 ファミリー (miR-208 と miR-499) は心筋と骨格筋の遅筋線維特異的に発現する。

近年, 筋特異的 miRNA のうち miR-1 と miR-133 ファミリーの機能を解析する研究が多くなされている。様々な loss-of-function 研究により, マウス全身における miR-1 と miR-133 ファミリーのダブル欠損は心臓の発生を傷害するため胎生致死に至ることが報告された¹²⁴⁻¹²⁹。一方, miR-133a-1 と miR-133a-2 (miR-133a) 欠損マウスの約 20%は成体まで生き延びるが, 拡張型心筋症により生後約 6 ヶ月で突然死に至ることが報告されている¹²⁵。これらの miR-133a 欠損マウスは, 4 週齢から骨格筋における病的異常が現れ, ミトコンドリア機能不全, 速筋特異的な中心核ミオパチー, glycolytic-to-oxidative な筋線維組成の変化を示すことが報告されている¹²⁶。また, miR-133a 欠損マウスは持久性運動能力が低下しており, 6 週間のトレッドミル走行運動によるミトコンドリア新生が阻害されることから, miR-133a の欠損が骨格筋の機能にも影響を及ぼすことが明らかになった^{126,130}。骨格筋特異的に発現する miR-206~133b の欠損は骨格筋の発生や成長に大きな影響を与えないことから¹³¹⁻¹³⁴, 同じ Seed 配列を持つ miR-1~133 クラ

スターにより miR-206~miR-133b クラスターの機能が補償された可能性が考えられる。一方、miR-206 の欠損が神経筋接合部の再生やサテライト細胞による筋再生を阻害し、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や Mdx マウスにおける Duchenne 型筋ジストロフィーの症状を悪化することが明らかになり^{131,132}、miR-206 による遺伝子発現調節の不在が骨格筋の病態を増悪させることが示唆された。

さらに、筋分化における miR-1 と miR-133 ファミリーの機能についていくつかの報告がある¹³⁵⁻¹⁴² (図 9)。miR-1 と miR-206 は筋芽細胞の分化を促進すると報告されてきた^{136-139,142}。miR-1 は筋分化を促進する Myocyte enhancer factor (Mef) 2¹⁴³ の抑制因子である Histone deacetylase (HDAC) 4 を標的とすることで、筋分化を促進すると報告された¹³⁶。miR-206 は DNA polymerase α (Pola1) を抑制することで、筋芽細胞の DNA 合成を阻害し、細胞周期を停止することによって筋分化を促進すると報告された¹³⁷。その他にも、miR-1 と miR-206 は筋分化を抑制する転写因子である PAX3, PAX7, Twist-1 を標的とし、筋分化を促進することが報告されている^{138,139,142}。

miR-133 に関しては、筋分化を抑制するとの報告¹³⁶と、促進するとの報告^{140,141}

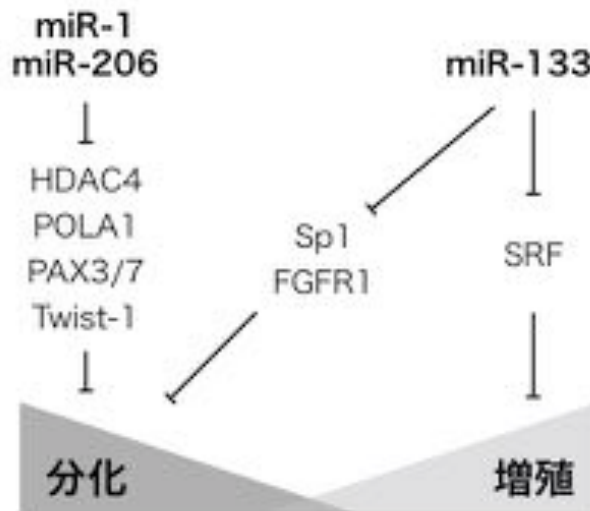


図 9. 筋分化・増殖における miR-1, miR-133 ファミリーの機能

miR-1 ファミリー (miR-1 と miR-206) と miR-133 ファミリーは標的遺伝子の制御により筋分化を調節する。李 ミンジョン, 秋本 崇之, マイクロ RNA と骨格筋の適応機構, 第 66 巻第 9 号, 体育の科学, 2016 より引用)

がなされている。Chen らの研究では, miR-133 は細胞増殖を抑制する Serum response factor (SRF) を標的とし, 筋分化を抑制し, 筋芽細胞の増殖を促進すると報告している¹³⁶。アンチセンスオリゴを用いた miR-133 のノックダウンが, C2C12 の細胞増殖を抑制し, 筋分化を促進する一方, miR-1 のノックダウンは筋分化を抑制し, 細胞増殖を促進すること¹³⁶から, 同一クラスターに属する miR-1 と miR-133 が相反した機能を有することが示唆された¹³⁶。一方, Zhang らの研究では, miRNA mimic により miR-133 を強発現した C2C12 においても細胞増殖が促進されず, 逆に抑制されることが明らかになった¹⁴⁰。さらに, miR-1 は Cyclin D1 を, miR-133 は Cyclin D1 の転写因子である Sp1 を標的とすることで, 筋芽

細胞の細胞周期を停止し、細胞増殖を抑制、筋分化を促進することが報告されている¹⁴⁰。また、miR-133 は fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1) と protein phosphatase 2 A catalytic subunit (PP2AC) を標的とすることで extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルを阻害し、筋分化を促進することも報告されており¹⁴¹、筋分化・形成における miR-133 の機能についてはまだコンセンサスが得られていない。

一方、miR-208 ファミリーは遅筋特異的に発現し、心筋や骨格筋の筋線維タイプの制御に関与することが知られている^{144,145}。miR-208 ファミリーには miR-208a, miR-208b, miR-499 が存在し、それぞれ遅筋型ミオシンである Myh6, Myh7, Myh7b のイントロンにコードされている。Myh6 は心筋特異的な発現を示し、Myh7 と Myh7b は心筋及び骨格筋の遅筋線維に発現するため、それぞれの miR-208 ファミリー miRNA もホスト遺伝子と同様な発現パターンを示す^{144,145}。 α -MHC は Myh6 にコードされ、成体の心筋に発現する主要なミオシン重鎖アイソフォームである。心筋におけるストレスに応じて、Myh7 にコードされる β -MHC の発現が亢進するとともに miR-208 ファミリーの発現量も増大することが明らかになった¹⁶⁹。一方、miR-208a を欠損させたマウスにおいてストレスによる β -MHC の発現が抑制され、pressure overload による肥大型心筋症の症状が

緩和されることが報告された¹⁶⁹。これは、miR-208 が α -MHC の発現を促進や β -MHC の発現の抑制に関与する甲状腺ホルモン¹⁴⁶ の受容体の活性を調節する Thyroid hormone receptor associated protein 1 (THRAP1) を標的とすることで、甲状腺ホルモンによる α -MHC の発現を抑制していたためであると考えられた¹⁶⁹。

骨格筋の遅筋線維 (MyHC I) で高い発現を示す miR-208b と miR-499 を両方も欠損したマウスにおいては遅筋の速筋化が認められ、miR-499 のみを筋特異的に強発現したマウスでは速筋の遅筋化が認められた¹⁷⁰。このような筋線維タイプのスイッチは、miR-208b と miR-499 が宿主遺伝子の転写抑制因子である Sox6, Pur β , Sp3 を標的としており、MyHC I 線維の発現を促進するためであると考えられている¹⁷⁰ (図 10)。

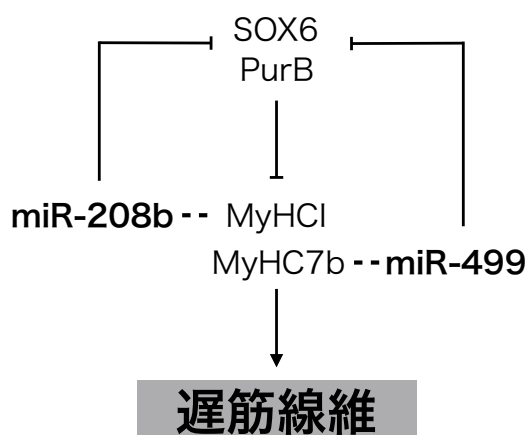


図 10. miR-208 ファミリーによる遅筋型ミオシンの発現制御

骨格筋に発現する miR-208 ファミリー (miR-208b と miR-499) は転写抑制因子を標的とし、宿主遺伝子である遅筋型ミオシンの発現を促進する。李 ミンジョン, 秋本 崇之, マイクロ RNA と骨格筋の適応機構, 第 66 巻第 9 号, 体育の科学, 2016 より引用)

1.3.2 骨格筋における miR-23-27-24 の機能

筋活動の変化やがん、糖尿病のような全身性疾患による骨格筋の量的・機能的変化が生じた際、骨格筋や血中の様々な miRNA が変化することが明らかになり、筋特異的 miRNA 以外の miRNA による遺伝子発現の制御も骨格筋の生理現象に関与することが示唆されてきた^{76,147-151}.

miR-23, miR-27, miR-24 はクラスターを形成する miRNA であり、骨格筋において豊富に存在する¹⁵². miR-23-27-24 クラスターはゲノム上に、miR-23a-27a-24-2 (a クラスター) と miR-23b-27b-24-1 (b クラスター) の 2 つのパラログでコードされている. それぞれのクラスターは、ヒトゲノムの 19 番と 9 番の染色体に、マウスゲノムの 8 番と 13 番の染色体に存在する. 骨格筋において miR-23-27-24 クラスター miRNA は可塑性制御に重要な遺伝子を制御することが報告されてきた (図 11).

miR-23-27-24 クラスターに属する miRNA 中、骨格筋における機能について最も多く検討されているのは miR-23 ファミリーである. 筋萎縮時に発現が亢進する Atrogin-1 と MuRF1 が miR-23a のターゲットであることが明らかになり、miR-23a の強発現によって *in vivo* や *in vitro* において Dexamethasone による筋萎縮を抑制することが報告された¹⁵². 同様に骨格筋萎縮を呈する 2 型糖尿病モデ

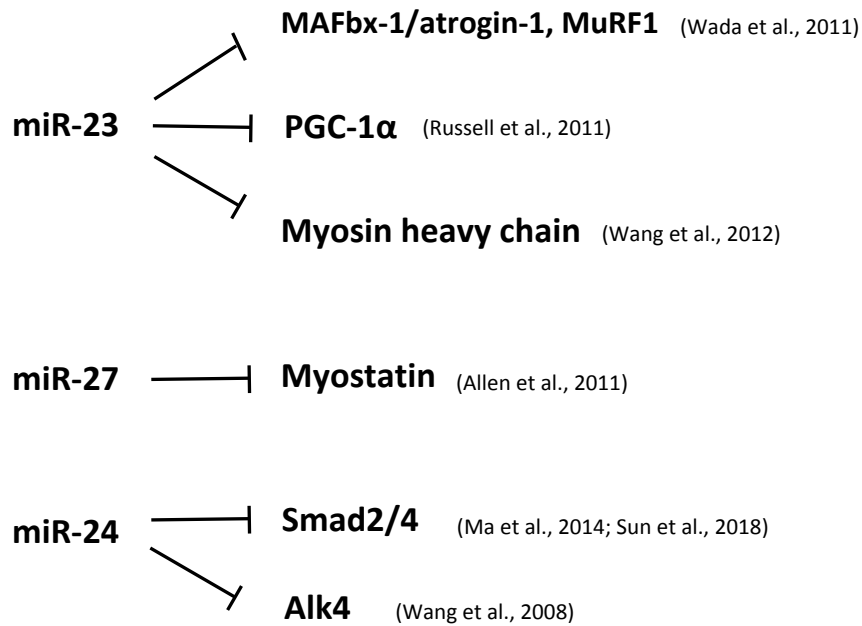


図 11. miR-23-27-24 クラスターmiRNA の骨格筋の可塑性制御に関する標的遺伝子

ルマウスや 10 日間のベッドレスト後のヒトでは、骨格筋内 miR-23a の発現が低下し¹⁵³⁻¹⁵⁵、miR-23a の標的遺伝子である PTEN 及び Atrogin1 と MuRF1 の発現量が亢進すると報告された^{184, 156}。一方、血中では miR-23a が、マウスの後肢懸垂やヒトの別途レストにより増加し、miR-23a の増加率とヒラメ筋の筋萎縮率には正の相関関係があることが示された¹⁵⁷。分化した C2C12 筋管細胞においても Dexamethasone により筋管細胞内の miR-23a が発現を低下し、逆に培地中のエクソソームでは miR-23a が増加すること¹⁵⁴からも、筋萎縮によって miR-23a の細胞外への放出が促進されることが示唆された。

さらに、miR-23 ファミリーはミトコンドリア新生のマスターレギュレーター

である PGC-1 α をターゲットすることが報告されている¹⁵⁸。ミトコンドリア機能不全を呈する、ALS 患者¹⁵⁹ や ALS モデル (ALS G93A) マウス¹⁵⁸ の骨格筋において、PGC-1 α の低下と miR-23 の亢進が認められた^{131,158}。さらに、*in vivo* における miR-23 の強発現は骨格筋の PGC-1 α とミトコンドリア呼吸鎖関連タンパクである Cytochrome c と COX IV を低下することが明らかになった¹⁶⁴。また、miR-23 の発現量がヒトとマウスの骨格筋において一過性持久性運動により減少し^{160,161}、PGC-1 α の発現量と負の相関関係を示した¹⁶⁰ ことから、miR-23 ファミリーが PGC-1 α を制御し骨格筋の病理・生理学的な変化に関与することが示唆された。

骨格筋の構造タンパク質であるミオシン重鎖も miR-23 ファミリーによって制御されると報告されている¹⁶²。miR-23 は速筋型ミオシン重鎖がコードされている、Myh1 (MyHC II_d/x), Myh 2 (MyHC II_a), Myh 4 (MyHC II_b) を 3' UTR 依存的に抑制すると報告された¹⁶²。C2C12 細胞における miR-23 の過剰発現が、MyHC II_d/x と MyHC II_a の発現を抑制、筋管の形成を阻害する反面、筋芽細胞の増殖を亢進することが明らかになった¹⁶²。

一方、miR-27 は筋肥大の抑制因子である Myostatin を制御することが報告されている¹⁶³⁻¹⁶⁵。遅筋と速筋において Myostatin の pre-mRNA の発現量に差がない

にもかかわらず、Myostatin の mRNA は速筋で高い発現量を示す¹⁶⁶。この mRNA 発現量の差は、Myostatin をターゲットする miR-27 が遅筋に多く発現しているためであり、Myostatin mRNA が転写後レベルで miR-27 により抑制されることが明らかになった¹⁶³。さらに、C2C12 細胞が増殖する際に、miR-27 の亢進と Myostatin mRNA の減少が認められ¹⁶⁷、miR-27 の強発現により C2C12 の細胞増殖が促進されることから、miR-27 が筋芽細胞の増殖・分化の調節に関与する可能性も示唆された¹⁶⁷。

miR-24 については骨格筋可塑性のコンテキストにおける検討が行われていないが、骨格筋や様々な細胞において TGF- β ファミリーのシグナル伝達に関連する遺伝子をターゲットすることが報告されている¹⁶⁸⁻¹⁷⁰。miR-24 は Smad2 をターゲットすることで TGF- β シグナルによる細胞外マトリックスの形成¹⁷¹を阻害し、筋損傷による骨格筋の線維化を抑制すると報告された¹⁶⁸。また、赤血球系細胞において miR-24 は TGF- β ファミリーのタイプ I レセプターである Alk4 を標的とし、赤血球系細胞の分化を阻害することが報告された¹⁶⁹。さらに、胚性幹細胞 (Embryonic stem cell; ES 細胞) の分化とともに miR-24 発現量の増加が認められ、miR-24 が Smad4 を含んだ ES 細胞の分化多能性を維持する遺伝子を標的とすることで、ES 細胞の分化を促進することが報告された¹⁷⁰。Smad2/4 と

Alk4は骨格筋において萎縮を促進する TGF- β ファミリーの細胞内シグナルであるために、これらの結果から、miR-24が TGF- β ファミリーのシグナル伝達による骨格筋の量的変化（図6）に関与する可能性があると考えられる。

1.4 本研究の目的

骨格筋は環境要求に応答した量的・質的な変化を示し、その過程において miRNA による遺伝子発現制御が必要であることが示唆されてきた^{76,147}。miR-23-27-24 クラスターに属する miRNA により、骨格筋の機能的（MyHC¹⁶², PGC1- α ¹⁵⁸）、量的（Atrogin-1 と MuRF1¹⁵², Myostatin¹⁶³, Smad2/4^{168,170}, Alk4¹⁶⁹）可塑性制御に重要な遺伝子が標的とされていることから、これらの miRNA が骨格筋の可塑性制御に関与する可能性が考えられる。しかし、骨格筋における miR-23-27-24 クラスター miRNA の機能についてはまだ十分な検討が行われていない。そこで、本研究では miR-23-27-24 クラスター miRNA の欠損が骨格筋の可塑性制御に及ぼす影響を検討し、その機能を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 動物実験

全てのマウスは 12 時間明期／12 時間暗期に設定され，一定の室温（22℃）が保たれた飼育室にて，自由摂取，自由飲水の条件下で飼育された．マウスの体重及び摂餌量は週 1 回測定された．自発走行運動実験（図 12）を行うために，マウス（雄性，18 週齢）はランニングホイール（直径 11 cm）が設置されたケージ（15 x 32 cm²）で 4 週間個別飼育された¹⁷²．ランニングホイールはマウスが個別ケージに飼育された 2 日（プレ飼育）後まで固定され，その後開放された．

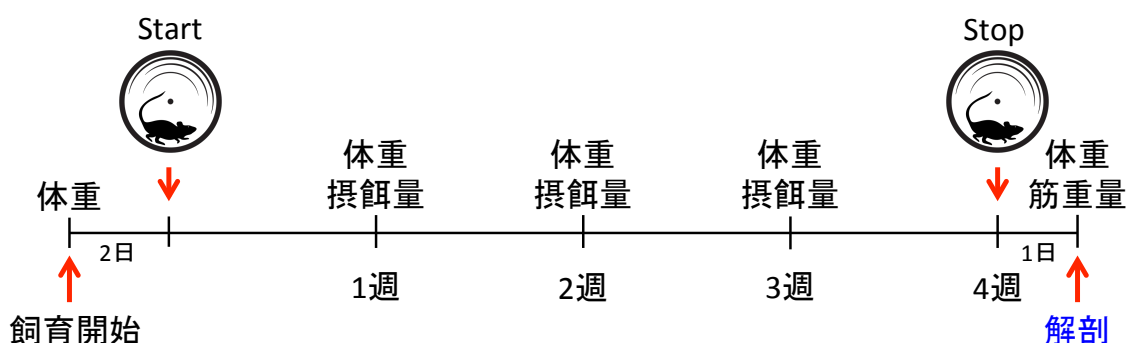


図 12. 4 週間の自発走行運動実験のプロトコル

ランニングホイールの回転数はモニターシステム（Melquest, Toyama, Japan）により計測され，CIF3Win Acquisition Software（Melquest）によって走行距離が算出された．4 週間の自発走行運動を行ったマウスにおいては一過性運動の影響を除くために，最後の自発走行運動から 24 時間後に各組織がサンプリングされ

た。解剖はマウスを 5 時間絶食させてから行われた。一過性の自発走行運動群はプレ飼育後の暗期 12 時間の運動を行い,最後の自発走行運動から 3 時間後(絶食)に組織がサンプリングされた¹⁷³⁻¹⁷⁵。それぞれの実験で対照群となるコントロールマウスも同様に,実験期間中はランニングホイールのないケージで個別飼育された。

除神経モデル(図 13)では,マウス(雌性)の坐骨神経切除を行った。神経切除は片脚の大腿部で行い,残るもう一方の脚(Contralateral; CL)はコントロールとして実験に用いた。神経切除によりコントロール足へ体重負荷が増加することが考えられたために,手術を行っていないマウスも非手術コントロールとして用いた。除神経モデルにおける解剖は,神経切除から 1, 2 週間後に行い,マウスを 5 時間絶食させた後(午前 9:00 から午後 14:00 まで),イソフルラン

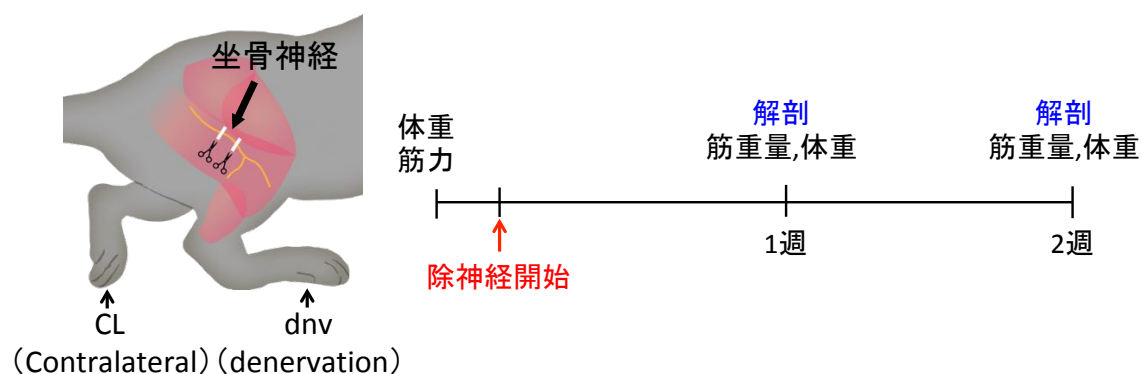


図 13. 除神経による筋萎縮のプロトコル

吸入麻酔下でサンプリングした。骨格筋サンプルとしてヒラメ筋と足底筋を採

取した。全ての動物実験は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会と早稲田大学動物実験委員会の承認を得て、各大学の実験実施法則に従って行った。

2.2 miR-23a/b クラスター欠損マウスの作製

miR-23a/b クラスターの欠損マウスの作製には Cre-loxP システムを利用した。miR-23a-27a-24-2 がコードされているゲノム領域の両端に loxP 配列が挿入された miR-23a クラスター flox (flanked by loxP sequences) マウス及び miR-23b-27b-24-1 の両端に loxP 配列が挿入された miR-23b クラスター flox マウスは、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター・再生医療工学部門で作製された。これらのマウスの作製過程は以下の通りである。

pDT-loxP-loxPFRT-PGKneo-loxPFRT (筑波大学大学院医学研究科 高橋智先生より供与) をプラットフォームベクターとして用い、miR-23a-27a-24-2 と miR-23b-27b-24-1 のターゲティングベクターがデザインされた (図 14A)。ターゲティングベクターは制限酵素により線形化され、エレクトロポレーションにより C576BL/J マウス由来の Embryonic stem (ES) cells に導入された。Geneticin (G418, GIBCO) により薬剤選別された ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、サザンブロット解析によってターゲット領域の相同組換えを確認した (図 14D)。

相同組換え ES 細胞を偽妊娠の雌性マウスに移植し、キメラマウスを得た。キメラマウスは CAG-FLpE トランスジェニックマウス (Riken BRC) と交配し、ネオマイシン耐性カセットを生殖系列細胞レベルで除去した。その後得られたマウスの交配により、全身において miR-23a/b クラスタが共に flox されたマウスを得た。次に、miR-23a/b クラスタダブル flox マウスを、筋特異的に Cre recombinase が発現する Ckmm (Mck; Muscle creatinine kinase promoter) -Cre マウス¹⁷⁶ (Stock# 006475, Transgenic, The Jackson Laboratory) と交配し、筋特異的 miR-23a/b クラスタ欠損マウスを作出した。

2.3 ジェノタイピングと Ckmm-cre によるゲノム組換えの確認

マウスのジェノタイプを確認するために、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。ジェノタイピング用のゲノム DNA の抽出にはアルカリ-DNA 抽出法を用いた¹⁷⁷。マウスの尻尾を 1-2 mm 程度切断し、75 μ l のアルカリバッファー (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) を入れ、95°Cにて 50 分間沸騰させた。その後、75 μ l の中和バッファー (40 mM Tris HCl, pH 5.5) を添加し、攪拌した。抽出されたゲノム DNA の 2 μ l を PCR 反応に用いた。PCR 反応は Ex Taq HS (Takara) を用い、Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) にて行った。PCR に使用

したプライマーセット（Forward と Reverse プライマー）は表 1 に示した。

miR-23a/b クラスターの floxed アレル PCR の Thermal protocol は以下の通りであ

る：(1) 95°Cで 5 分間熱変性，(2) 95°Cで 15 秒間熱変性後，適切なアニーリン

グ温度で 15 秒間アニーリングし，72°Cで 30 秒間伸長反応，(3) 72°Cで 7 分間

伸長反応。(2) は 25 サイクルとした。各 PCR のアニーリング温度は表 1 に示し

た。Ckmm-cre アレル PCR の Thermal protocol は以下の通りである：(1) 95°Cで

5 分間熱変性，(2) 95°Cで 15 秒間熱変性後，62°Cで 15 秒間アニーリングし，

72°Cで 45 秒間伸長反応，(3) 72°Cで 7 分間伸長反応。(2) は 25 サイクルを反

復した。

Ckmm-cre によるゲノムの組換えを確認するために，骨格筋（足底筋，ヒラメ

筋，長趾伸筋）組織，骨格筋組織から単離した筋線維と筋芽細胞や線維芽細胞

を含むその他の細胞からゲノム DNA を抽出し，PCR を行った。採取した組織と

細胞をそれぞれ 700 μ l と 200 μ l のゲノム DNA 抽出バッファー(Tris-HCL 10 mM,

EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS)) と，それぞれ 1/100

の量の proteinase K (20 mg/ml, FujiFlm Wako Pure Chemical Corporation) に入れ，

37°Cで一晩酵素反応を行った。消化された組織や細胞の lysate から

phenol-chloroform 法によってゲノム DNA を抽出した。Nanodrop system

(Nano-Drop ND-100, Thermo scientific) により DNA の濃度を測定し, 40 ng のゲノム DNA を PCR 反応に用いた. Ckmm-cre によるゲノムの組換えを確認するための PCR は miR-23a/b クラスターの floxed アレル PCR と同じプライマーセットを用い, 同様な過程で行ったが, Thermal protocol の (2) は 30 サイクルとした.

得られた PCR 産物は 2%アガロースゲルに添加し, 100V で 40 分間電気泳動した. 2%アガロースゲルは 100 ml の Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer に 2 g のアガロースを添加し, 沸騰させた後, 5 μ l の Ethidium bromide (FujiFlm Wako Pure Chemical Corporation) を添加して作製した. PCR 産物を電気泳動したゲルは, LAS-3000 (Fuji Film) により UV light 下で蛍光シグナルの検出を行った.

2.4 組織化学的分析

骨格筋組織は解剖時に O.C.T. Compound (Sakura FineTek Japan) に包埋し, 液体窒素上で冷却したイソペンタン中で凍結して解析まで-80°Cにて保存した. 凍結サンプルは, 凍結ミクロトーム (CM1850, Leica) により 10 μ m 厚に薄切してスライドガラスに付着させ, 蛍光免疫染色と SDH (Succinate dehydrogenase ; コハク酸脱水素酵素) 染色に用いた.

組織切片は 4%パラホルムアルデヒド/PBS により固定され、0.3% Triton X / PBS で 10 分間膜透過処理をされた後、非特異的な抗体反応を防ぐために 5% normal goat serum (NGS, Jackson ImmunoResearch laboratories) / PBS により 1 時間ブロッキングされた。その後 1 次抗体を添加し、4°Cで一晩抗体反応を行った。Myosin heavy chain (MyHC) に対する 1 次抗体は University of Iowa の Developmental Studies Hybridoma Bank より入手した anti-MyHC I 抗体 (BA-F8, 1:25), anti-MyHC IIa 抗体 (SC-71, 1:250), anti-MyHC IIb 抗体 (BF-F3, 1:25) を用い、筋線維の輪郭を可視化するために anti-dystrophin 抗体 (D8043, Sigma, 1:100), 血管を可視化するために anti-CD31 抗体 (MCA2388, AbD serotec, 1:100) を用いた。2 次抗体は、Alexa-Fluor-405-conjugated goat anti-mouse IgG2b, Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-mouse IgG1, Alexa-Fluor-549-conjugated goat anti-mouse IgM, Dy549-conjugated goat anti-mouse IgG1 をそれぞれ 1/100 に希釈して用いた。すべての抗体の希釈には 5%NGS/PBS を用いた。

SDH 染色は先行研究を参考に行った¹⁷⁸。SDH 染色液 (PBS pH 7.6 10 ml, Succinic acid 270 mg, Nitro blue tetrazolium 10 mg) を調製し、凍結切片を SDH 染色液が入った容器に入れ、37°Cで 30 分インキュベートした。その後、水道水で 3 回洗浄し、顕微鏡下で観察を行った。すべての画像は IX-70 蛍光顕微鏡

(Olympus) とデジタルカメラ DS-Ri1 (Nikon) によって撮影した。

2.5 RT-PCR

動物組織における total RNA は Isogen II (FujiFilm Wako Pure Chemical Corporation) を用いて抽出した。1 μ g の total RNA を ReverTraAce qPCR RT kit (Toyobo) と Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて cDNA に逆転写し、目的の遺伝子を定量するためにリアルタイム PCR を行った。逆転写の Thermal protocol は以下の通りである：(1) total RNA を 65°C で 5 分間インキュベート、(2) total RNA を氷上に戻して逆転写反応液 (5X RT buffer, RT Enzyme Mix, Primer Mix in ReverTraAce qPCR RT kit) を添加、(3) Thermal cycler に戻して 37°C にて 15 分間逆転写反応、(4) 98°C で 5 分間酵素失活反応。逆転写反応終了後、得られた cDNA は PCR までに -20°C で保存された。リアルタイム PCR は StepOne plus real-time PCR system (Applied Biosystems) によって行い、PCR 反応液は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いた。Thermal protocol は以下の通りである。(1) 95°C で 60 秒間初期変性、(2) 95°C で 15 秒変性、60°C で 60 秒間伸長反応。(2) は 40 サイクルを繰り返した。 $\Delta\Delta C_t$ 法により発現量の定量を行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) を内部標準と

してすべての遺伝子の補正に用いた。リアルタイム PCR に用いたプライマーセットを表 1 に示した。

また、組織における Cre の発現の差を確認するために、Ex Taq HS (Takara) を用いて半定量 RT-PCR 行った。骨格筋、肺、肝臓組織から Isogen II を用いて total RNA を抽出し、1 μ g の total RNA を ReverTraAce qPCR RT kit を用いて cDNA に逆転写した。逆転写の Thermal protocol は上記と同様である。Cre の半定量的 PCR は Veriti 96 well Thermal Cycler で行い、用いたプライマーセットは表 1 に示した。内部標準として Gapdh を用いた。PCR の Thermal protocol は以下の通りである：(1) 95°C で 5 分間熱変性、(2) 95°C で 15 秒間熱変性後、60°C で 15 秒間アニーリングし、72°C で 30 秒間伸長反応、(3) 72°C で 7 分間伸長反応。Cre の PCR 反応には (2) を 25 サイクル反復し、Gapdh では 20 サイクル繰り返した。PCR 産物を電気泳動したゲルから、LAS-3000 を用いて蛍光シグナル検出した。得られた画像から Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda) を用いて発現量の定量を行った。

Gene		Sequence	etc.
miR-23a cluster	F	5'- GCT CCA ACC TTC CTA CGG ATC GAT GC -3'	genotyping Cre recombination check Annealing at 62°C
	R	5'- CCT GAG GGG ACA TAA CTG GCT TT -3'	
miR-23b cluster	F	5'- TGC CCC CTG AGT GAG CAA ATC C -3'	genotyping Cre recombination check Annealing at 64°C
	R	5'- TCT ACA GAC AAG GCC CTT CAG ACA G -3'	
Ckmm-cre	F	5'- ATC AGC TAC ACC AGA GAC GGA AA -3'	Genotyping Annealing at 62°C
	R	5'- GAG GTT CAC AGG GGG AGA AC -3'	
Myostatin	F	5'- ACA GAG TCT GAC TTT CTA ATG CAA G -3'	realtime PCR
	R	5'- GGA GTC TTG ACG GGT CTG AG -3'	
Murfl	F	5'- CTT CCA AGG ACA GAA GAC TGA GC -3'	realtime PCR
	R	5'- AGT CCT CCA GCT GAG AGA TGA T -3'	
Atrogin1	F	5'- CTC AGA GAG GCA GAT TCG CAA -3'	realtime PCR
	R	5'- AGG GTG ACC CCA TAC TGC T -3'	
Gapdh	F	5'- AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG -3'	realtime PCR
	R	5'- TGA AGG GGT CGT TGA TGG -3'	
Cre	F	5'-GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC-3'	semi-quantitative PCR
	R	5'-CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC-3'	
Gapdh	F	5'-GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC-3'	semi-quantitative PCR
	R	5'-TAA GCA GTT GGT GGT GCA GGA-3'	
U6	F	5'- CGC TTC GGC AGC ACA TAT AC -3'	realtime PCR
	R	5'- TGC GTG TCA TCC TTG CGC AG -3'	

表 1. PCR プライマーの配列

2.6 miRNA の定量

miRNA は TaqMan™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems) に付属する RT プライマーと TaqMan MicroRNA RT kit (Applied Biosystems) を用いて total RNA

10 ng から miRNA ごとに逆転写した. 内部標準として small nuclear RNA (snRNA) の U6 を用いて, U6 は Reverse プライマー (表 1) を用いて逆転写した. miRNA の RT 産物は TaqMan MicroRNA Assays に附属する各 miRNA 特異的な TaqMan プローブを用いてリアルタイム PCR を行った. miRNA の PCR 反応液は TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems) を用い, U6 は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いた. PCR 反応は StepOne plus real-time PCR system によって行い, $\Delta\Delta C_t$ 法により発現量の定量を行った.

2.7 ウェスタンブロット

採取した骨格筋組織は 2X Sample buffer complete (Tris-HCl, pH 6.8, 100mM, SDS 2%, glycerol 20%, dithiothetol (DTT) 80mM, 2-mercaptoethanol 285mM, 0.01% bromophenol blue, protease inhibitor cocktail tablets complete mini (Roche), phosphatase inhibitor cocktail 1 & 2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) を入れたガラスホモジナイザーでホモジナイズした. タンパク質の濃度は RC DC Protein Assay kit (Biorad, CA, USA) を用いて測定した. 抽出したタンパク質は 95°Cにて 5 分間煮沸後, 100V で 1.5-2 時間 SDS-poly acrylamide gel electroporesis (SDS-PAGE) を行った. 分離ゲルの濃度は 6%, 7.5%, 10%, 12%, 8-15% (gradient) を使用し,

タンパク質は 10-80 μg を添加した。SDS-PAGE 後タンパク質は 100V で 1 時間 nitrocellulose membrane (Hybond, GE healthcare) に転写された。非特異的な抗体反応を防ぐために 5% skim milk/Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) により 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体として, anti-MyHC type I 抗体 (BA-F8, 1:100), anti-MyHC IIa 抗体 (SC-71, 1:100), anti-MyHC IIb 抗体 (BF-F3, 1:100), anti-PGC-1 α 抗体 (AB3242, Millipore, 1:500), anti-cytochrome-c oxidase complex IV 抗体 (anti-COX IV, #4844, Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-CD31 抗体 (anti-PECAM-1; sc-46694, Santa Cruz Biotechnology, INC., 1:400), anti-phospho-Akt 抗体(#4060, Cell signaling Technology, 1:1000), anti-Akt 抗体 (#9272, Cell signaling Technology, 1:1000), anti-phospho-S6K 抗体 (#9205, Cell signaling Technology, 1:500), anti-S6K 抗体 (#9202, Cell signaling Technology, 1:1000), anti-Atrogin-1 抗体 (EMC Bioscience, 1:1000), anti-MuRF1 抗体 (EMC Bioscience, 1:1000), anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 抗体 (anti-GAPDH; MAB374, Millipore, 1:1000 と #2118, Cell Signaling Technology, 1:1000)を用いた。2次抗体は Rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment 抗体 (NA9340, GE healthcare, 1:5000), Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate 抗体 (Biorad, 1:2000), anti-mouse IgG κ 抗体 (sc-516102, Santacruz, 1:2000), anti-mouse

IgG₁ 抗体 (sc-2060, Santacruz, 1:2000) を用いた. Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を用いて発光シグナルを LAS 3000 により検出した. 得られた画像から Image J ソフトウェアを用いてシグナルの定量を行った.

2.8 新生タンパク質の検出

マウス生体内でのタンパク質の合成量を定量するため, Surface sensing of translation (SUnset) Assay を用いた¹⁷⁹. 麻酔下で体重当たり 0.04 $\mu\text{mol/g}$ の puromycin (FujiFlm Wako Pure Chemical Corporation, 166-23153) を生理食塩水に希釈してマウスの腹腔内に注射し, 30 分後に組織のサンプリングを行った¹⁸⁰. 採取したヒラメ筋と足底筋は液体窒素により凍結させ, 実験まで -80°C で保存した. ウェスタンブロットの方法は上記 2.7 と同様であり, 詳細については以下の通りである. 2X Sample buffer complete を用いて骨格筋からタンパク質を抽出し, RC DC Protein Assay kit を用いてタンパク質の濃度を測定した. 8-15%の分離ゲルに 80 μg のタンパク質を添加し, 100V で 2 時間 SDS-PAGE を行った. SDS-PAGE 後タンパク質は 100V で 1 時間 nitrocellulose membrane に転写され, Ponceau-S 溶液 (P7170, Sigma) により転写の程度を確認した. すべてのサンプル

ルが均一に転写されたメンブレンは 4°Cで一晩中 anti-puromycin 抗体 (3RH11, COSMO BIO CO., LTD., 1:1000) 抗体反応を行った。2次抗体として anti-mouse IgG₁ 抗体 (sc-2060, Santacruz, 1:2000) を用いた。Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて発光シグナルを LAS 3000 により検出した。得られた画像から Image J ソフトウェアを用いてシグナルの定量を行った。

2.9 筋線維の単離

先行研究を参考に筋線維の単離を行った^{181,182}。マウスから採取した長趾伸筋 (Extensor digitorum longus ;EDL) および短指屈筋 (Flexor digitorum brevis; FDB) を 0.2% collagenase II (47B9464, Worthington) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて 37°C, 40 分間インキュベーションした。実体顕微鏡下でガラスピペットによりピペッティングを数回繰り返し、筋組織から筋線維を分離させた。ピペッティングの時間は 3 分以内とし、37°Cに 5 分間戻してから次のピペッティングを行った。培地中に分離された筋線維をガラスピペットで集め、100 µm のセルストレーナーでろ過し、他の細胞 (筋芽細胞や線維芽細胞) を除去した。

2.10 筋力測定

グリップテスト (grip test) によりマウスの四肢筋力を測定した^{183,184}。マウスに筋力測定器 (DST-50N, Imada Co., Ltd) に設置されたステンレス製グリッドを掴ませ、マウスの尻尾を平行に引っ張りマウスがグリッドから落ちる際に発揮する最大力を筋力として記録した。筋力測定は3回を1セットとし、1日1セット、3日間連続で行った (合計9回測定)。平均筋力はマウスの体重により補正された。

2.11 統計処理

データは平均+標準誤差で示した。2群間の比較では Student's t-test を行った。4群間の比較では2元配置分散分析を行い、2要因間で交互作用があった場合に分散分析に続く post hoc test (Tukey's HSD test) を行った。P値 < 0.05 を統計的有意差として評価した。

3. 結果

3.1 筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損 (dKO) マウスの作製

本研究では、骨格筋における miR-23a/b クラスター-miRNA の機能を解析するために、Ckmm-cre (Muscle creatinine kinase; MCK-cre) と miR-23a/b クラスター flox マウスを交配し筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損 (dKO) マウスを作製した (図 14). dKO マウスと littermate である miR-23a/b クラスター flox マウスを

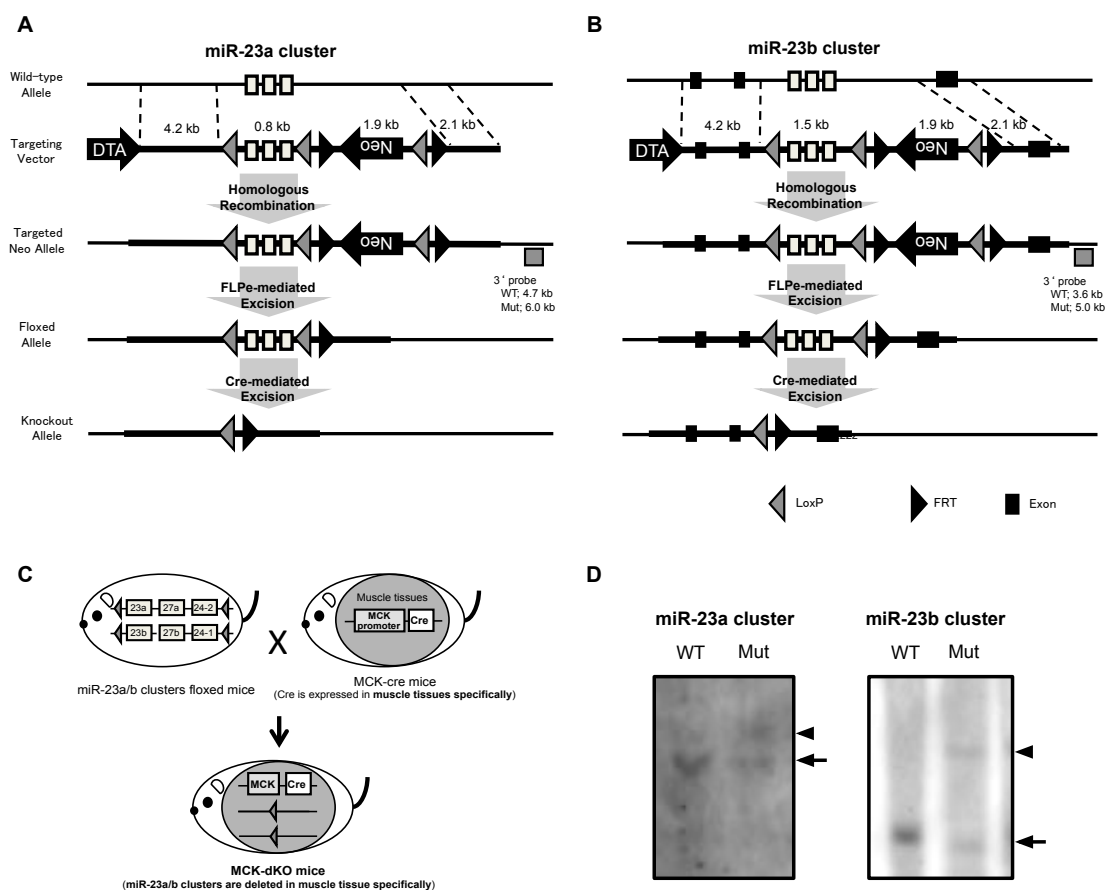


図 14. miR-23a/b クラスターの欠損 (dKO) マウスの作製

(A) miR-23a と (B) miR-23b クラスターのターゲティングベクターの概略図. (C) 筋特異的な miR-23a/b クラスター-dKO マウス作製の概略図. (D) miR-23a/b クラスターの野生型アレル (WT, Arrow) と flox アレル (Mut, Arrow head) のサザンブロット.

コントロール (Con) として用いた. dKO マウスはメンデルの法則に沿って生まれ, 体重や筋重量, 心重量において Con マウスとの間に有意な差がなく (表 2), Con マウスと同様の成長を示した.

表2. 体重, 心臓, 骨格筋の重量

genotype	body weight (g)	heart (%)	PL (%)	sol (%)
Con	26.01±0.47	0.430±0.008	0.062±0.001	0.032±0.001
dKO	26.89±0.52	0.428±0.007	0.064±0.001	0.032±0.001

Con, コントロールマウス. dKO, 骨格筋特異的miR-23a/bクラスター欠損マウス. 体重あたりのHeart(心臓), plantaris(足底筋), soleus(ヒラメ筋)重量はpercentage valuesで示した. データは平均±SEMで示した(n = 6-8).

Ckmm-cre によるゲノムの組換えを確認するために, まず組織における Cre recombinase の発現を mRNA レベルで確認した. Cre mRNA は dKO マウスの骨格筋 (足底筋, Plantaris; PL, ヒラメ筋, Soleus; sol) に特異的に発現しており, 肺や肝臓組織では発現が見られなかった (図 15B). Muscle creatinine kinase プロモーターは分化が終了した筋線維において活性化するために¹⁸⁵, 次に骨格筋から筋線維 (Muscle fiber, M.fiber) や筋線維以外の細胞 (未分化な筋芽細胞や線維芽細胞を含んだ分画, Others) を分画し Ckmm-cre によるゲノムの組換えを検討した. その結果, dKO マウスにおいてゲノムの組換えは筋線維特異的に認められ, 他の細胞では認められなかった (図 15C, D). 最後に, 骨格筋における miR-23a/b クラスターの成熟型 miRNA の発現量を検討したところ, dKO マウスの足底筋とヒラメ筋において miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b が

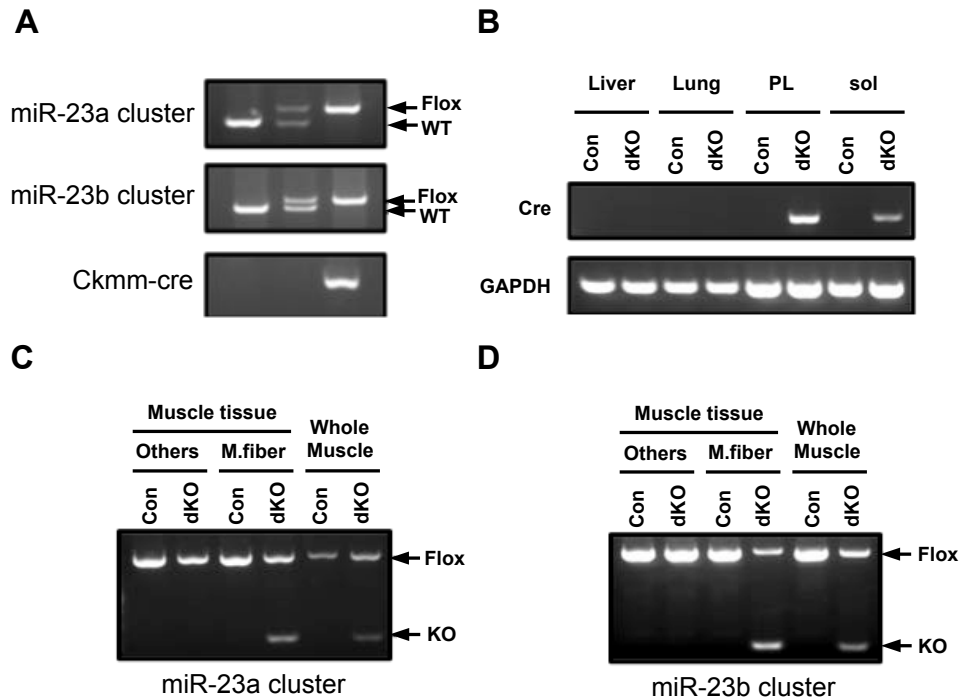


図 15. Ckmm-cre によるゲノムの組換え

(A) マウス tail DNA における miR-23a/b クラスターの WT, flox アレルと Ckmm-cre のジェノタイプング。(B) 肝臓, 肺, 足底筋, ヒラメ筋における Cre と GAPDH の mRNA 発現。(C) 骨格筋と骨格筋から単離した筋線維および骨格筋中のその他の細胞 (筋芽細胞, 線維芽細胞など) のゲノム DNA における miR-23a クラスターと miR-23b クラスターの Ckmm-cre によるゲノムの組換え。Flox, Flox アレル; WT, 野生型アレル; Others, 筋芽細胞と線維芽細胞を含むその他の細胞; M.fiber, 単離した筋線維; Whole Muscle, EDL.

有意に減少していた (図 16A, B)。また, これらの miRNA は骨格筋中では筋線維において顕著に減少しており (図 16C, D), 肝臓においては変化がなかったことから (図 16E), Ckmm-cre による miR-23a/b クラスターの組換えは骨格筋において筋線維特異的に起こっていることが確認された。一方, Ckmm-cre は心筋にも発現しており¹⁸⁶, dKO マウスの心臓においても miR-23a/b クラスターの成熟型 miRNA の発現量が有意な低下を示した (図 16F)。

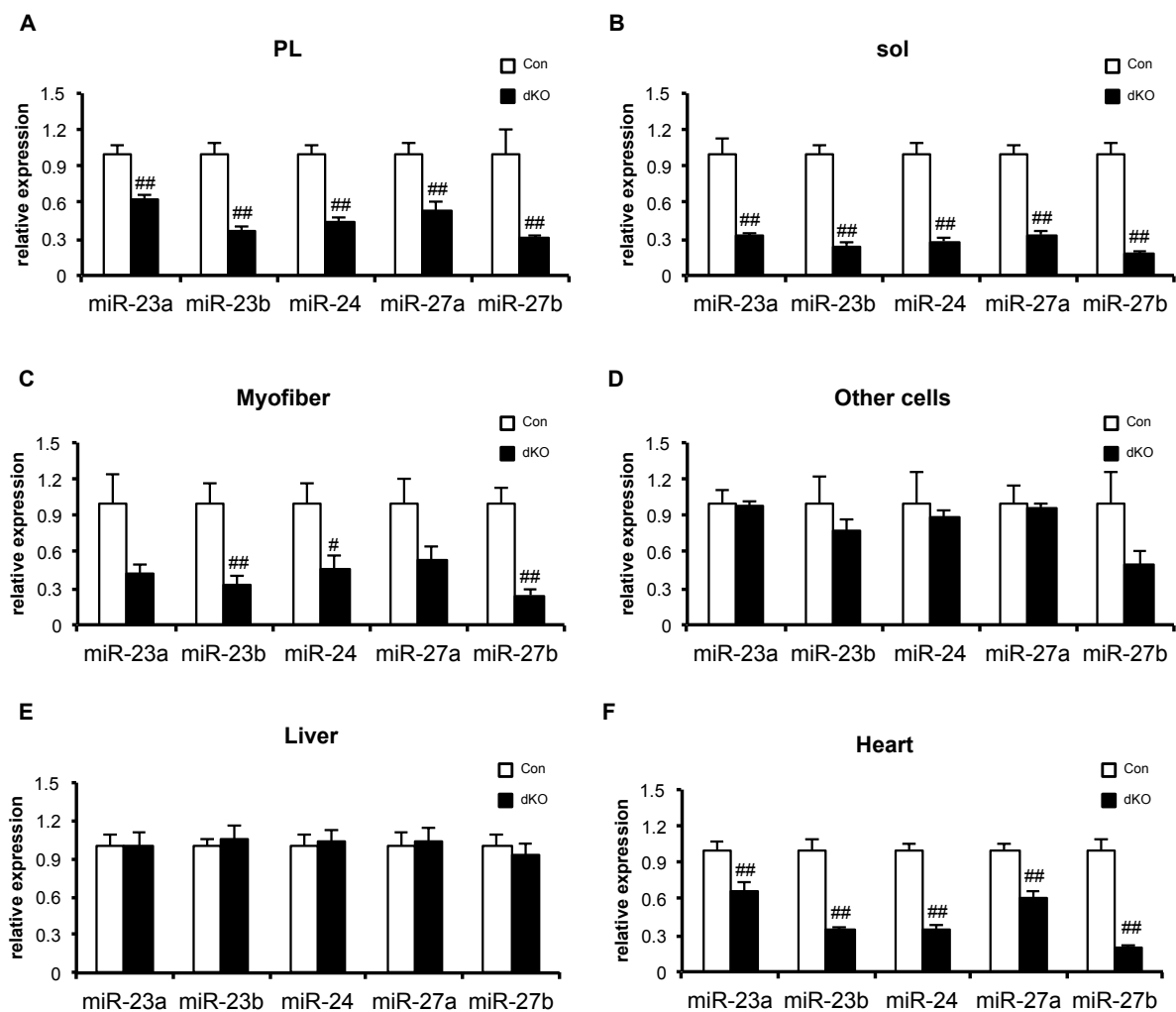


図 16. Con と dKO マウスにおける miR-23a/b クラスターの成熟型 miRNAs の発現量

(A) 足底筋 (PL), (B) ヒラメ筋 (sol), (C) 単離した筋線維 (myofiber), (D) 骨格筋中の筋線維以外の細胞 (Other cells), (E) 肝臓組織 (Liver), (F) 心臓 (Heart) の miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b の発現量. n = 5-6, Mean + SEM. ##P < 0.01 vs Con, #P < 0.05 vs Con.

3.2 筋特異的 miR-23a/b dKO マウスの骨格筋表現型

まず miR-23a/b クラスター欠損マウスにおける MyHC アイソフォームの発現や酸化的代謝マーカーについて検討した。検討には、速筋線維が優位な足底筋 (PL) と遅筋線維が優位なヒラメ筋 (sol) を用いた。

足底筋における MyHC IIa と IIb タンパク発現量について、miR-23a/b クラスターの欠損による変化は認められなかった (図 17A,B). ミトコンドリア新生のマスターレギュレーターである Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) とミトコンドリア電子伝達系の酵素複合体を構成するサブユニットである COX IV も Con に比べ dKO マウスでは有意な変動を認めなかった (図 17A,B). ヒラメ筋においても, MyHC I と IIa, PGC-1 α や COX IV の発現量に有意な変動は認められなかった (図 17C,D).

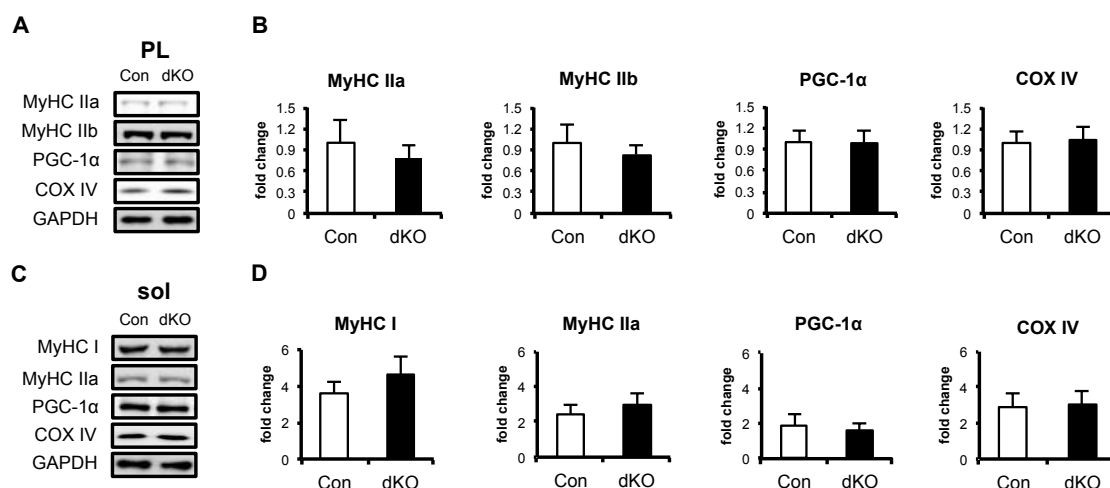


図 17. Con と dKO マウスの速筋と遅筋における MyHC と PGC1 α , ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質の発現変化

(A, B) 足底筋 (PL, 速筋) における MyHC IIa, MyHC IIb, PGC-1 α , COX IV の発現量.

(C, D) ヒラメ筋 (sol, 遅筋) における MyHC I, MyHC IIa, PGC-1 α , COX IV の発現量.

GAPDH は内部標準として用いられた. n= 5-6, Mean+SEM.

次に, 蛍光免疫染色により骨格筋における筋線維組成 (図 18) や筋線維断面積 (図 19) の検討を行った. dKO マウスにおいて足底筋を構成する全線維に対

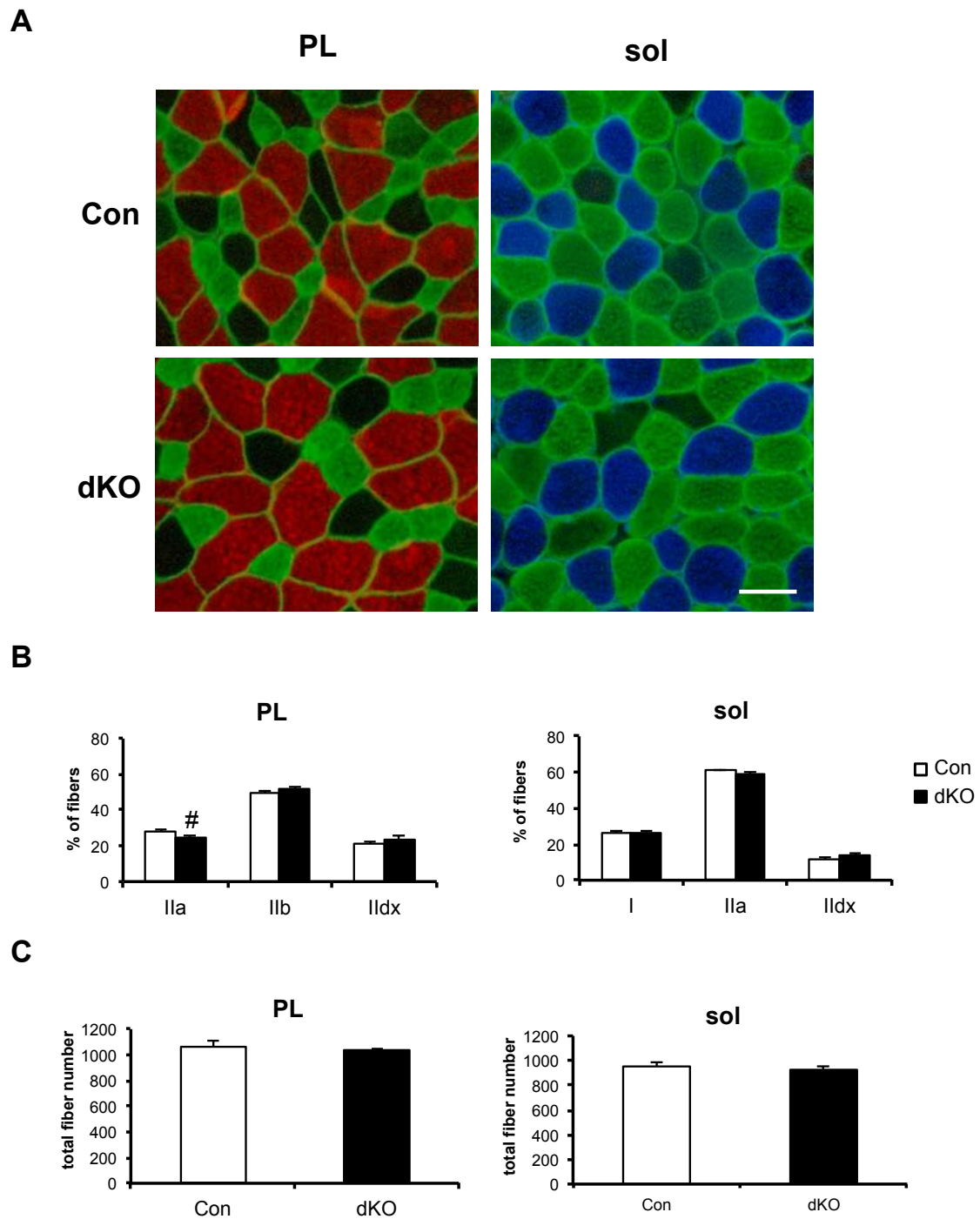
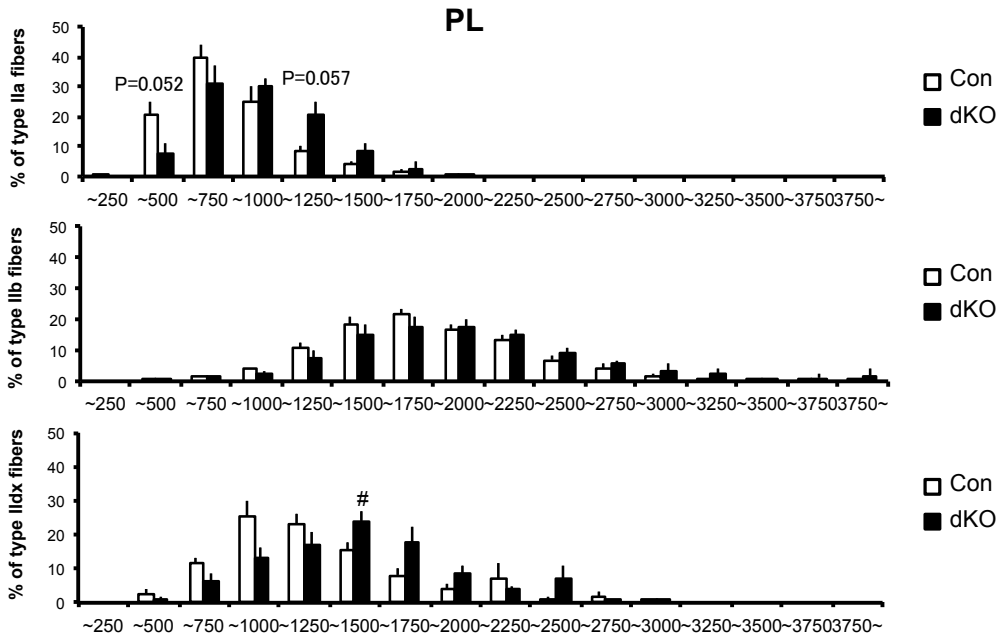


図 18. Con と dKO マウスにおける筋線維組成

(A) 22 週齢の Con と dKO マウスの足底筋 (PL) とヒラメ筋 (sol) の筋線維タイプ別に蛍光染色した画像. MyHC IIb (赤), MyHC IId/x (黒), MyHC IIa (緑), MyHC I (青). 足底筋とヒラメ筋における (B) 筋線維組成と (C) 筋線維の数. n= 4-5, Mean+SEM. #P < 0.05 vs Con. scale bar, 50 μ m.

する MyHC IIa 線維の割合の減少が認められた (図 18B). 一方, 足底筋においては, MyHC IIb と IIc/x の割合に有意な変化が認められなかった. ヒラメ筋においても, MyHC I, IIa, IIc/x の割合に dKO による有意な変化は認められなかった (図 18B). また, 足底筋とヒラメ筋における筋線維数も dKO マウスと CON マウスで同程度であった (図 18C). 次に, 足底筋を構成する各線維の断面積を比較したところ, dKO マウスにおいて IIa と IIc/x の筋線維断面積が有意に増加し, IIb は有意な変化を示さなかった (図 19A). ヒラメ筋を構成するすべての筋線維タイプ (I, IIa, IIc/x) においても筋断面積の有意な増加が認められた (図 19B). これらのデータから, miR-23a/b クラスター miRNA が骨格筋量の調節に関わることが考えられたため, 筋量の調節に関わる遺伝子の発現を検討した. miR-23a/b クラスター miRNA のターゲットとして報告されている分子のうち, 筋特異的ユビキチンリガーゼである Murf1 と Atrogin-1¹⁵², 筋肥大抑制因子である Myostatin¹⁶³ の mRNA 発現量は dKO による変動を示さなかった (図 20A). 加えて, タンパク質の合成に重要である Akt シグナルも dKO による有意な変動を示さなかった (図 20B). さらに, dKO マウスの筋力は Con と比べて有意な差が認められなかったことから (表 3), dKO マウスで見られた筋線維断面積のわずかな増加は骨格筋の機能に影響しないことが示唆された.

A



B

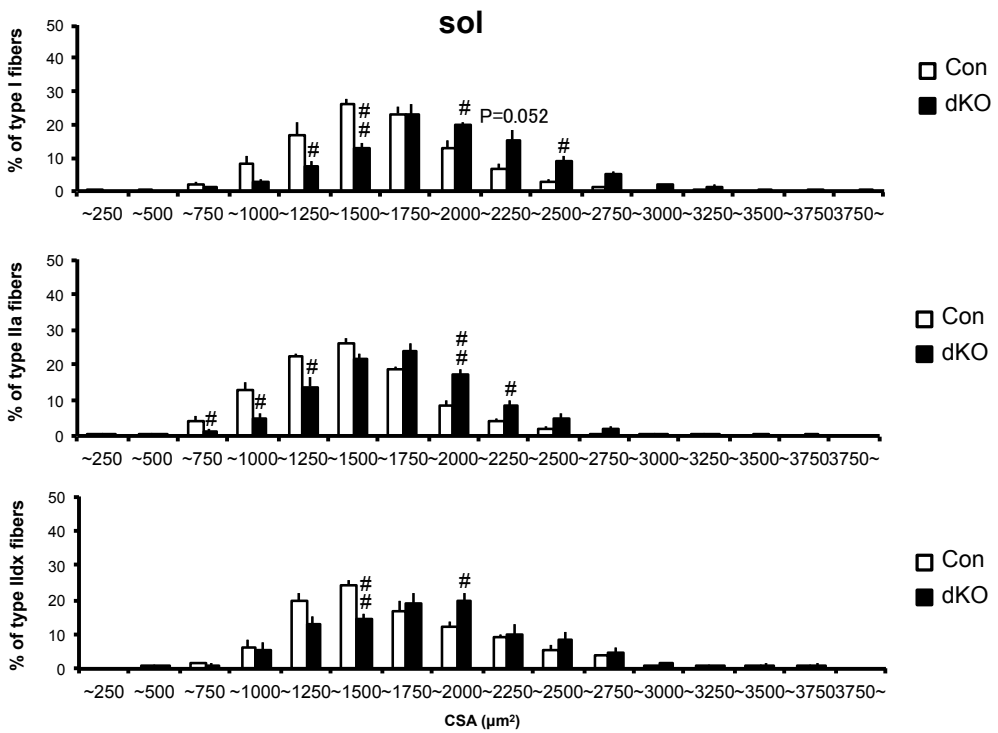


図 19. 足底筋 (PL) とヒラメ筋 (Sol) における筋線維断面積

22 週齢の Con と dKO マウスの足底筋 (A) とヒラメ筋 (B) における筋線維タイプ別断面積の分布. n= 4-5, Mean+SEM. ##P < 0.01 vs Con, #P < 0.05 vs Con.

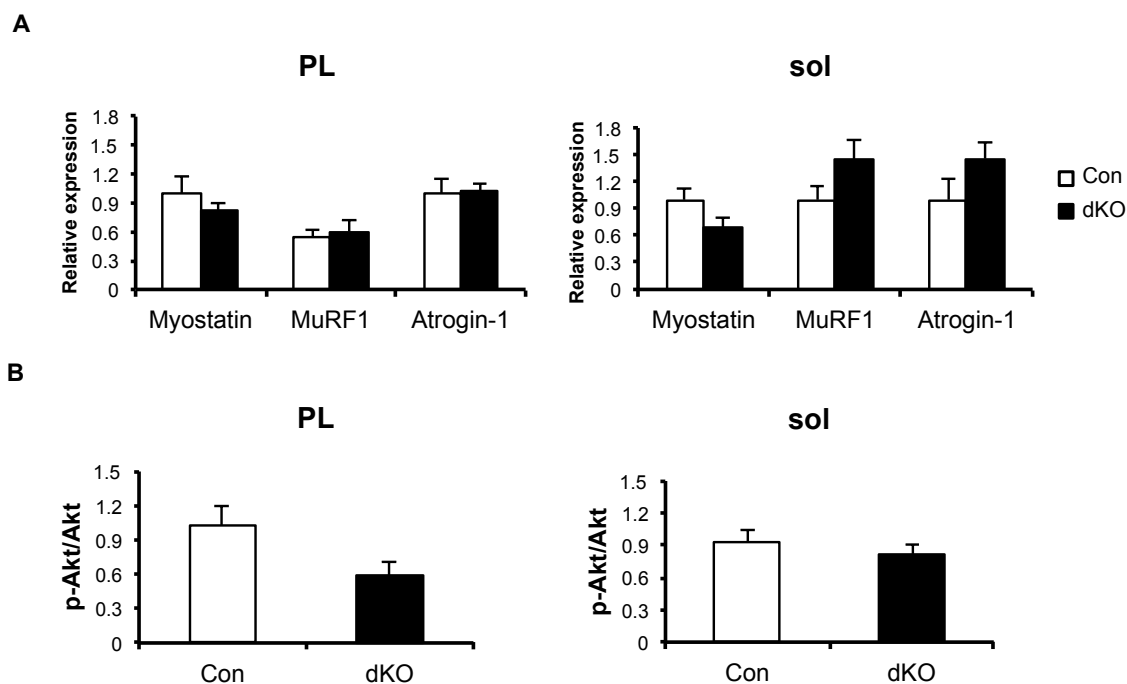


図 20. 足底筋とヒラメ筋における筋萎縮・肥大関連因子の発現量

(A) Realtime PCR による Con と dKO マウスの足底筋 (PL) とヒラメ筋 (sol) における Myostatin, MuRF1, Atrogin-1 の発現量, n=6. (B) WB による足底筋とヒラメ筋における Akt のリン酸化, n=5. Mean+SEM.

表 3. 筋力テスト

genotype	strength (N/g)
Con	0.06 ± 0.007
dKO	0.07 ± 0.003

筋力 (grip test) / 体重 (N/g)
データは平均±SEMで示した (n = 3).

3.3 自発性走行運動における miR-23a/b dKO マウスの骨格筋適応

骨格筋は可塑性に富む組織であり, 様々な環境刺激に応じて生理学的な適応を起こすことが知られている. miR-23a/b クラスターmiRNA の骨格筋適応における機能を明らかにするため, dKO マウスを用いて持久性運動による骨格筋適

応について検討した。

3.3.1 自発性走行運動による骨格筋の量的変化

Con と dKO マウスの自発走行運動での走行距離（表 4）や体重（図 7A）には有意な差が認められなかった。実験期間中、運動群において摂餌量の有意な増加が認められたが、miR-23a/b クラスター欠損による影響は認められなかった（表 5）。自発走行運動により Con と dKO において心臓や足底筋、ヒラメ筋の重量の増加が認められた（図 21B, C, D）。特に、ヒラメ筋では Con に比べて dKO の筋重量が運動により有意に増加した（図 21D）。

表 4. 走行距離

genotype	distance (km)
Con	11.07 ± 0.87
dKO	10.12 ± 0.63

1日当たりの平均走行距離。Con(n=7), dKO(n=10)。データは平均±SEMで示した。

表 5. 4週間の自発性走行運動期間中の摂餌料。

	genotype	1週目	2週目	3週目	4週目
Sedentary	Con	34.7±1.5	32.4±0.72	37.7±1.08	33.3±1.45
	dKO	34.2±1.58	31.6±1.08	37.0±1.16	33.5±2.09
Exercised	Con	37.7±1.92	41.0±2.48**	47.6±1.02**	43.7±1.36**
	dKO	37.6±1.97	39.4±2.22**	46.2±1.40**	40.4±2.05**

Con, 野生型マウス。dKO, 骨格筋特異的miR-23a/bクラスター欠損マウス。データは平均±SEMで示した(n = 5-7)。**, P < 0.01 運動の主効果。

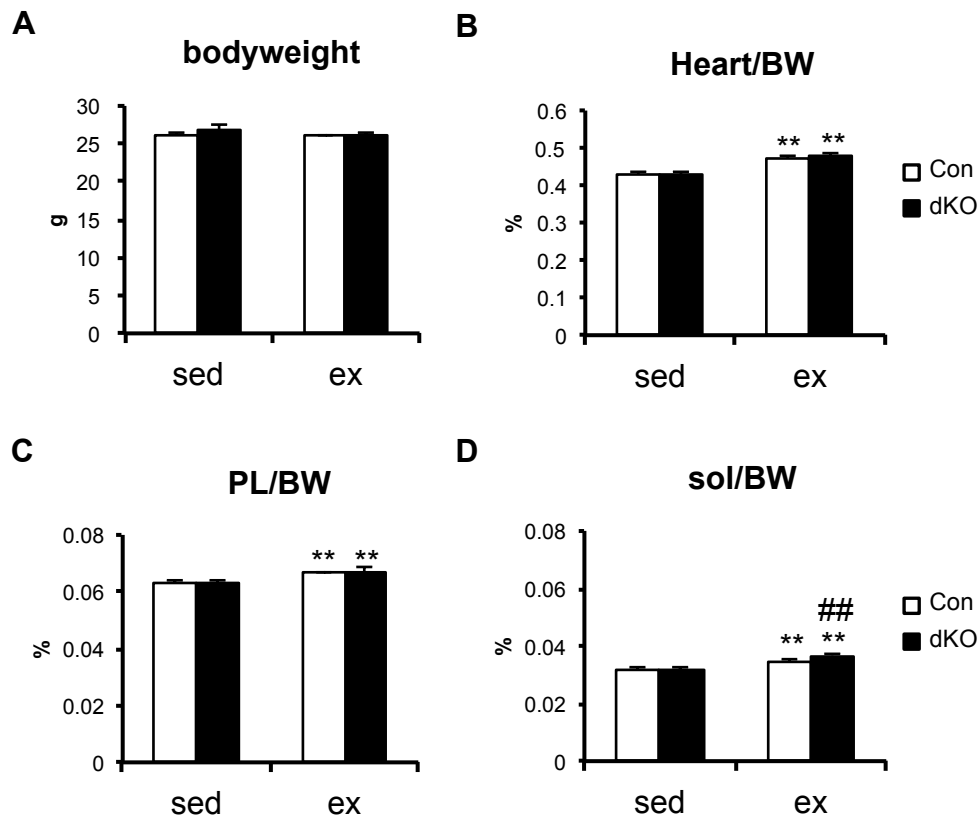


図 21.4 週間の自発走行運動による体重，心臓，骨格筋の重量の変化

Con と dKO マウスの (A) 体重 (bodyweight; BW) と体重あたりの (B) 心臓 (Heart), (C) 足底筋 (PL), (D) ヒラメ筋 (sol) の重量. n=6-8, Means + SEM. sed, sedentary (安静群); ex, exercised (運動群). **P < 0.01 vs sed; ##P < 0.01 vs Con.

3.3.2 自発性走行運動による骨格筋収縮特性と代謝特性の変化

一般に，長期間の持久性運動は骨格筋においてミトコンドリア量，SDH 活性の増加など酸化的な代謝を亢進する生理的適応をもたらす^{13,187-189}。本研究においても 4 週間の自発走行運動により Con と dKO マウスの速筋において MyHC IIa, PGC-1 α , COX IV のタンパク発現量が増加した (図 22A, B, C, D)。運動による骨格筋 SDH 活性の亢進についても dKO による変化は認められなかった (図

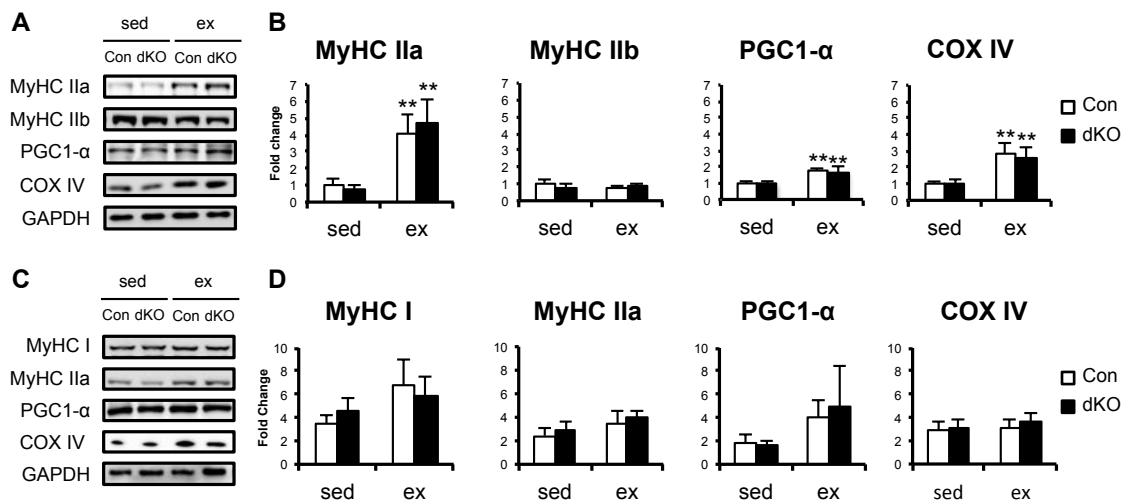


図 22. 4 週間の自発走行運動による骨格筋の MyHC と PGC1 α , ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質の発現変化

Con と dKO マウスの (A, B) 足底筋の MyHC IIa, MyHC IIb, PGC-1 α , COX IV の発現量と (C, D) ヒラメ筋における MyHC I, MyHC IIa, PGC-1 α , COX IV の発現量の運動による変化. GAPDH は内部標準として用いられた. n=6, Means + SEM. sed, sedentary (安静群); ex, exercised (運動群). **P < 0.01 vs sed.

23A). さらに、運動誘発性毛細血管新生 (図 23B, C, D) についても検討したところ、血管内皮細胞のマーカーである CD31 (Pecam-1) タンパク質発現量や筋線維当たりの毛細血管密度が、足底筋において 4 週間の自発走行運動により有意に増加し、その変化に Con と dKO マウスの間で有意な差は認められなかった (図 23B, C, D).

自発走行運動により足底筋において MyHC IIa の筋線維断面積が増加し (図 24A, B), MyHC IIa と IId/x 線維の割合が増加, IIb 線維は減少を示した (図 24C).

特に、MyHC IIa 線維の筋断面積は dKO マウスで有意に大きく (図 24B),

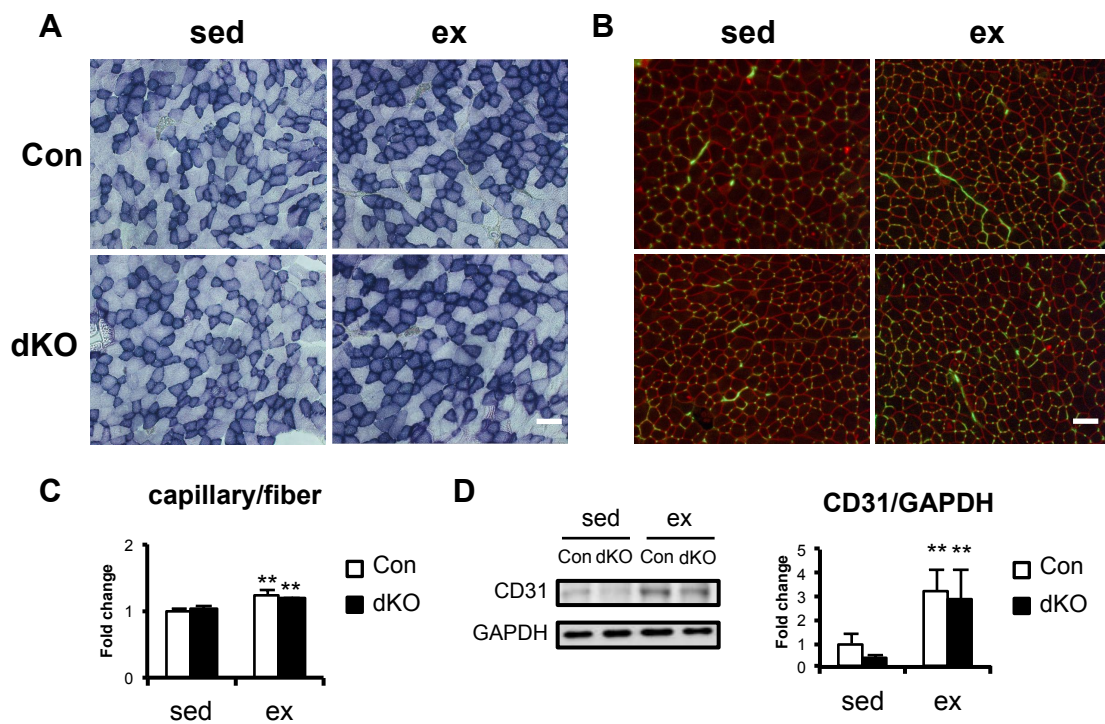


図 23.4 週間の自発走行運動による SDH 活性と血管新生

(A) Con と dKO マウスの足底筋における SDH 活性. (B) 足底筋における毛細血管の免疫染色画像. 筋線維の輪郭は anti-dystrophin により可視化し (赤), 血管内皮細胞を CD31 により染色した (緑). (C) 筋線維 1 本あたりの毛細血管数 (毛細血管密度). (D) WB による足底筋の CD31 タンパク質発現量の定量. GAPDH は内部標準として用いられた. $n=6$, Means + SEM. sed, sedentary (安静群); ex, exercised (運動群). $**P < 0.01$ vs sed. Scale bar, 500 μm .

足底筋全体に対する IIa 線維の割合は dKO により減少した (図 24C). 一方, ヒラメ筋においては, 自発走行運動による MyHC タイプ I, IIa, IIc/x の断面積の減少が認められ (図 24D, E), ヒラメ筋全体に対する MyHC I 線維の割合は増加し, MyHC IIc/x の割合は減少した (図 24F). 足底筋と同様にヒラメ筋においても, MyHC I と IIa の断面積が dKO マウスにおいて有意に大きかった (図 24E).

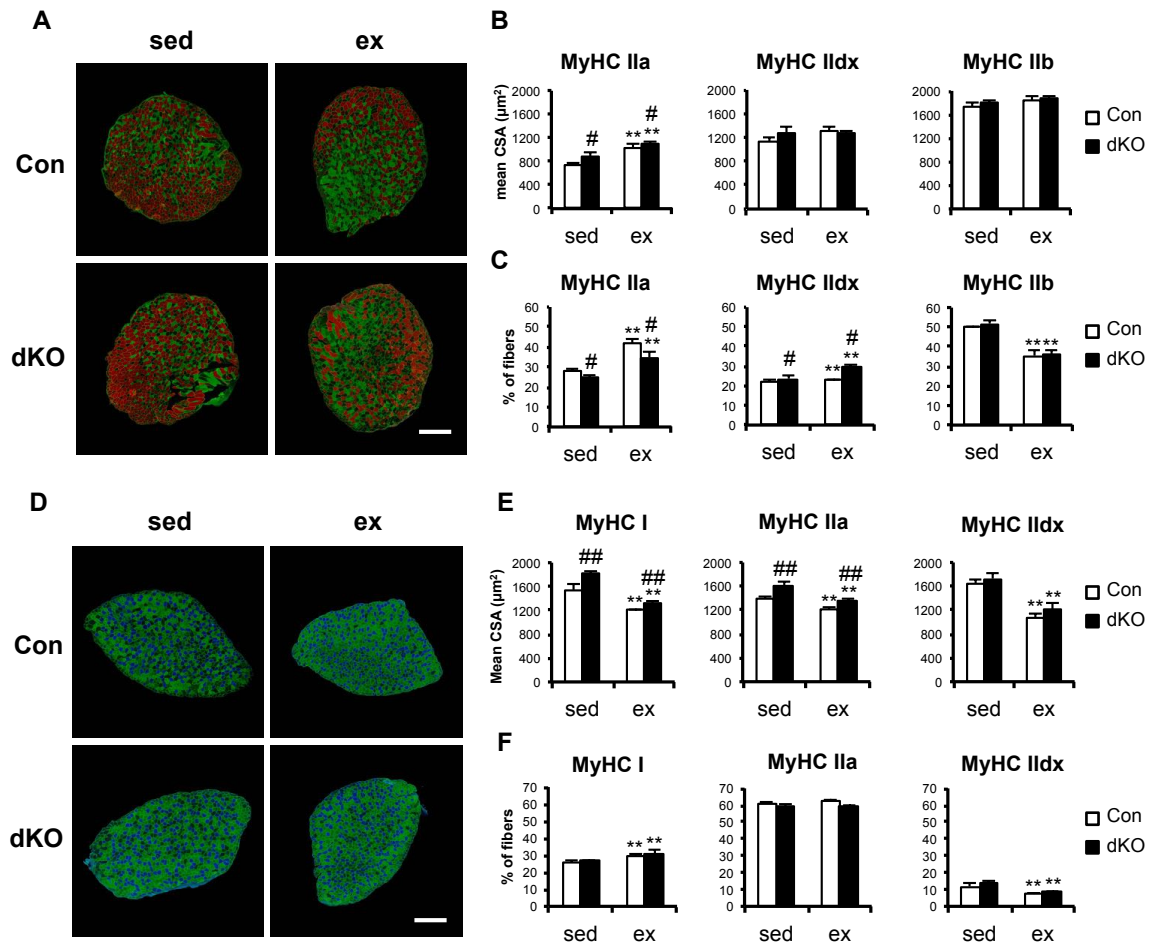


図 24. 4 週間の自発走行運動による足底筋 (PL) とヒラメ筋 (sol) を構成する筋線維タイプの断面積と割合の変化

(A) 足底筋の筋線維タイプ別免疫染色画像。MyHC IIB (赤), MyHC IIa (緑), MyHC IIx (黒)。足底筋における筋線維タイプ MyHC IIa, MyHC IIx, MyHC IIb の (B) 断面積 (CSA; Cross sectional area) と (C) 全線維に対するそれぞれの線維の割合。**P < 0.01 vs sed. #P < 0.05 vs Con. (D) ヒラメ筋の筋線維タイプ別免疫染色画像。MyHC I (青), MyHC IIa (緑), MyHC IIx (黒)。ヒラメ筋における筋線維タイプ MyHC IIa, MyHC IIx, MyHC IIb の (E) 断面積と (F) 全線維に対するそれぞれの線維の割合。**P < 0.01 vs sed. ###P < 0.01 vs Con. n=4-5, Means + SEM. sed, sedentary (安静群); ex, exercised (運動群). Scale bar, 500 μm.

3.3.3 運動による内因性 miR-23a/b クラスターmiRNA 発現の変動

dKO マウスの運動適応過程における miR-23a/b クラスターmiRNA の補償を確認するために、筋組織内の miR-23a/b クラスターmiRNA の発現量が運動によってどのような変動を示すかを検討した。4 週間の自発走行運動後、Con と dKO マウスの足底筋において、miR-23a と miR-27a が運動により有意な増加を示した (図 25A)。ヒラメ筋においては 4 週間の自発走行運動により Con と dKO マウス両方で miR-24 の有意な増加が認められ、miR-27a では Con マウスのみで有意に増加した (図 25B)。

骨格筋の運動適応は、繰り返される一過性運動の蓄積による適応応答と考えられるため、一過性運動が miR-23a/b クラスターの発現変動に与える影響についても検討した。本研究で行った運動形式は、ホイールを用いた自発走行運動であるため個体間の走る距離を一定にすることが難しく、活動が活発になる暗期の 12 時間における自発走行運動を一過性運動とした¹⁷³⁻¹⁷⁵。miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a の発現量は Con の足底筋において一過性運動後に有意に減少し、miR-23b と miR-27a は dKO の足底筋でも有意な減少が認められた (図 25C)。miR-27b は Con, dKO とも一過性運動による変動を示さなかった。ヒラメ筋では、一過性運動による miR-23a/b クラスターmiRNA の有意な発現変動は認めら

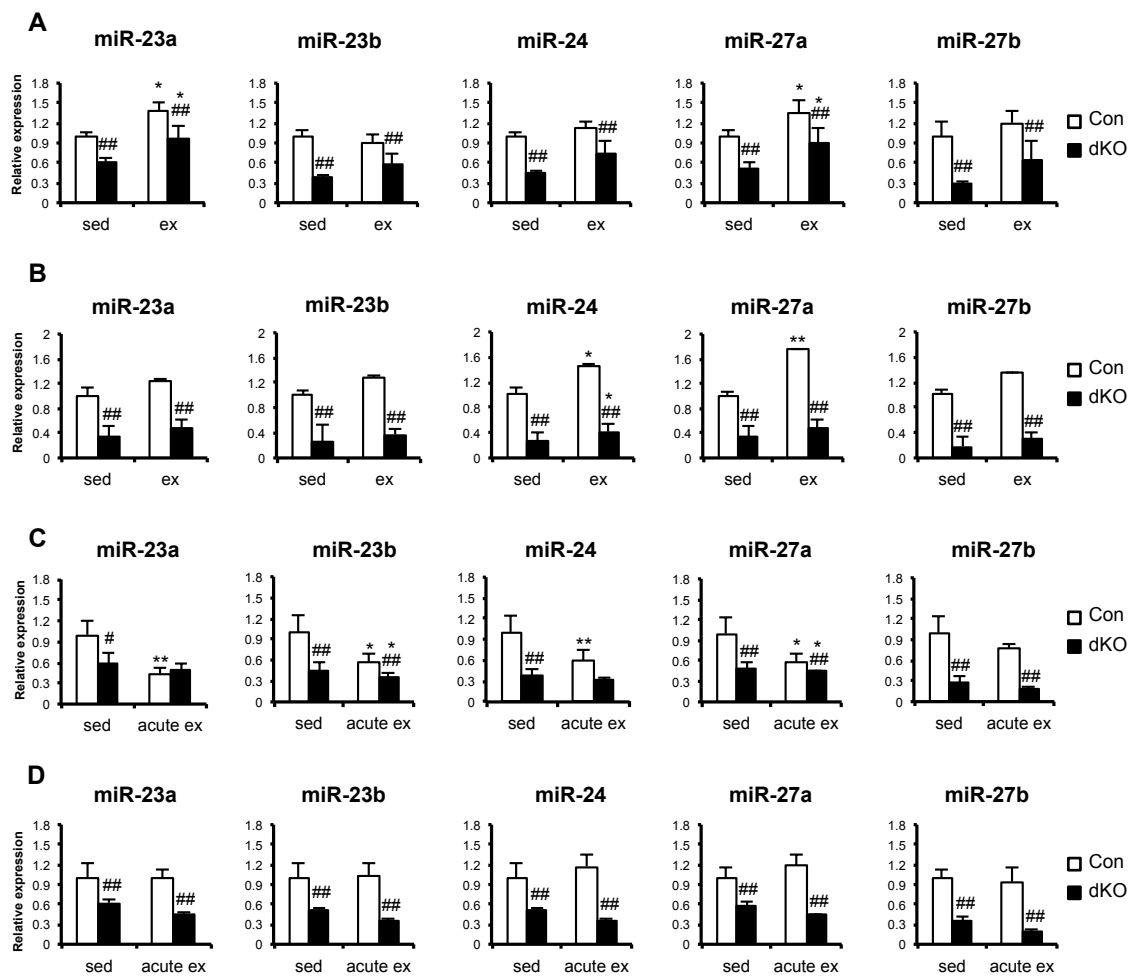


図 25. 4 週間および一過性の自発走行運動による骨格筋組織内 miR-23a/b クラスター miRNAs の発現変動

4 週間の自発走行運動後の (A) 足底筋と (B) ヒラメ筋における miR-23a/b クラスター miRNAs の発現変動. $n=5-6$, Means+SEM. ### $P < 0.01$ vs Con, * $P < 0.05$ vs sed. 一過性の自発走行運動後の (C) 足底筋と (D) ヒラメ筋における miR-23a/b クラスター miRNAs の発現変動. $n=3$, Means+SEM. # $P < 0.05$ vs Con, ### $P < 0.01$ vs Con, * $P < 0.05$ vs sed, ** $P < 0.01$ vs sed. sed, sedentary (安静群); ex, exercise (運動群).

れなかった (図 25D).

3.4 除神経による miR-23a/b dKO マウスの筋萎縮

筋萎縮における miR-23a/b クラスターmiRNA の機能を検討するために、除神経による筋萎縮モデルを用いて実験を行った。

3.4.1 除神経による骨格筋の量的変化

Con 及び dKO マウスの片脚の坐骨神経を切断し、下肢の骨格筋への神経入力を除去した (図 26A)。同じ個体において、手術脚 (denervation, dnv) と手術を行っていない脚 (非手術脚, Contralateral, CL) を比較した。Con と dKO マウスの体重において有意な差は認められなかった (図 26B)。神経切除により CL 脚へ体重負荷が増加する影響を検討するために、まず除神経の手術を行っていない非手術コントロール (normal control) マウスの筋重量を比較した。非手術コントロールマウスではヒラメ筋や足底筋の重量に miR-23a/b クラスター欠損による有意な差は認められなかった (図 26C)。筋力についても Con と dKO マウスの間で有意な差は認められなかった (図 26D)。

除神経手術 1 週間後 (1W)、Con と dKO とともに足底筋、ヒラメ筋において除神経による有意な筋重量の減少が認められた (図 26E)。一方、手術脚 (dnv) と非手術脚 (CL) とともに Con に比べて dKO マウスの足底筋とヒラメ筋の筋重量が有意に大きかった (図 26E)。骨格筋の筋萎縮率については Con と dKO に有意

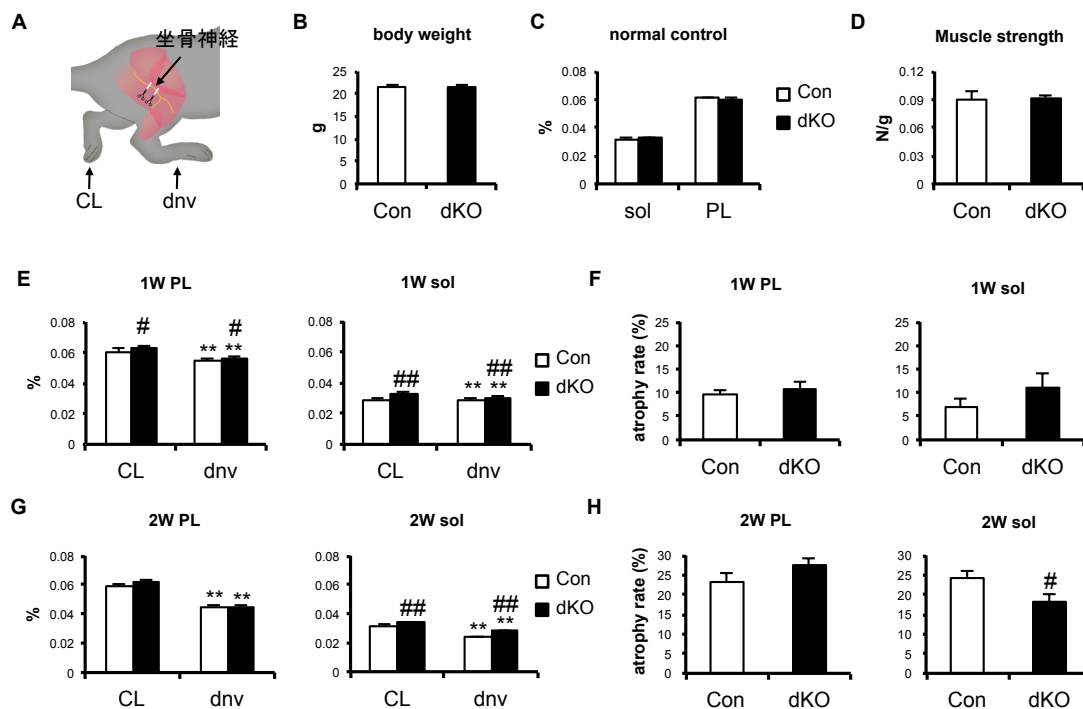


図 26. 除神経による足底筋 (PL) とヒラメ筋 (sol) の重量変化

(A) マウスの下肢における除神経手術の概略図. (B) Con と dKO マウスの体重. (C) 手術を行っていない Con と dKO マウスの骨格筋の重量. (D) Con と dKO マウスの筋力. 除神経手術 1 週間後の足底筋とヒラメ筋の (E) 重量変化と (F) 萎縮率. 除神経手術 2 週間後の足底筋とヒラメ筋の (G) 重量変化と (H) 萎縮率. ** $P < 0.01$ vs CL, # $P < 0.05$ vs Con, ## $P < 0.01$ vs Con. $n=4-5$, Means + SEM. CL, contralateral (非手術脚); dnv, denervation (除神経手術脚).

な差が認められなかった (図 26F).

除神経から 2 週間後 (2W) の足底筋とヒラメ筋では, Con と dKO ともに筋重量の有意な減少が認められた (図 26G). 一方, ヒラメ筋においては手術脚と非手術脚ともに, Con に比べて dKO マウスのヒラメ筋重量が有意に大きかった (図 26G). 足底筋では Con と dKO の萎縮率に有意な差が認められなかったが, ヒラメ筋においては dKO により萎縮率が抑制された (図 26H).

次に、除神経2週間後のヒラメ筋及び足底筋の筋線維断面積を検討した（図 27, 28）。ヒラメ筋を構成する MyHC I, IIa, IIc/x 線維の断面積はジェノタイプに関係なく除神経により有意に減少した（図 27）。足底筋においては最も高い割合を占める MyHC IIb 線維が Con と dKO とともに除神経により有意に減少した（図 28）。また、非手術脚において足底筋を構成するすべての筋線維の平均断面積が dKO により有意に減少した（図 28）。

3.4.2 除神経によるタンパク質合成と分解の変化

骨格筋量は筋線維中のタンパク質の合成と分解のバランスによって調節されるために、miR-23a/b クラスターmiRNA 欠損による骨格筋内のタンパク質合成・分解に関わる分子の変動を検討した。

先行研究において、miR-23 のターゲットとして同定されており¹⁵²、骨格筋の萎縮に重要な筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 と Murf1 は除神経後 1 週間のヒラメ筋においては有意な発現変動を示さなかった（図 29A, B）。足底筋においては、除神経による Atrogin-1 の発現増加が認められたが、Con と dKO の間には有意差が認められなかった（図 29C）。Murf1 の発現量については除神

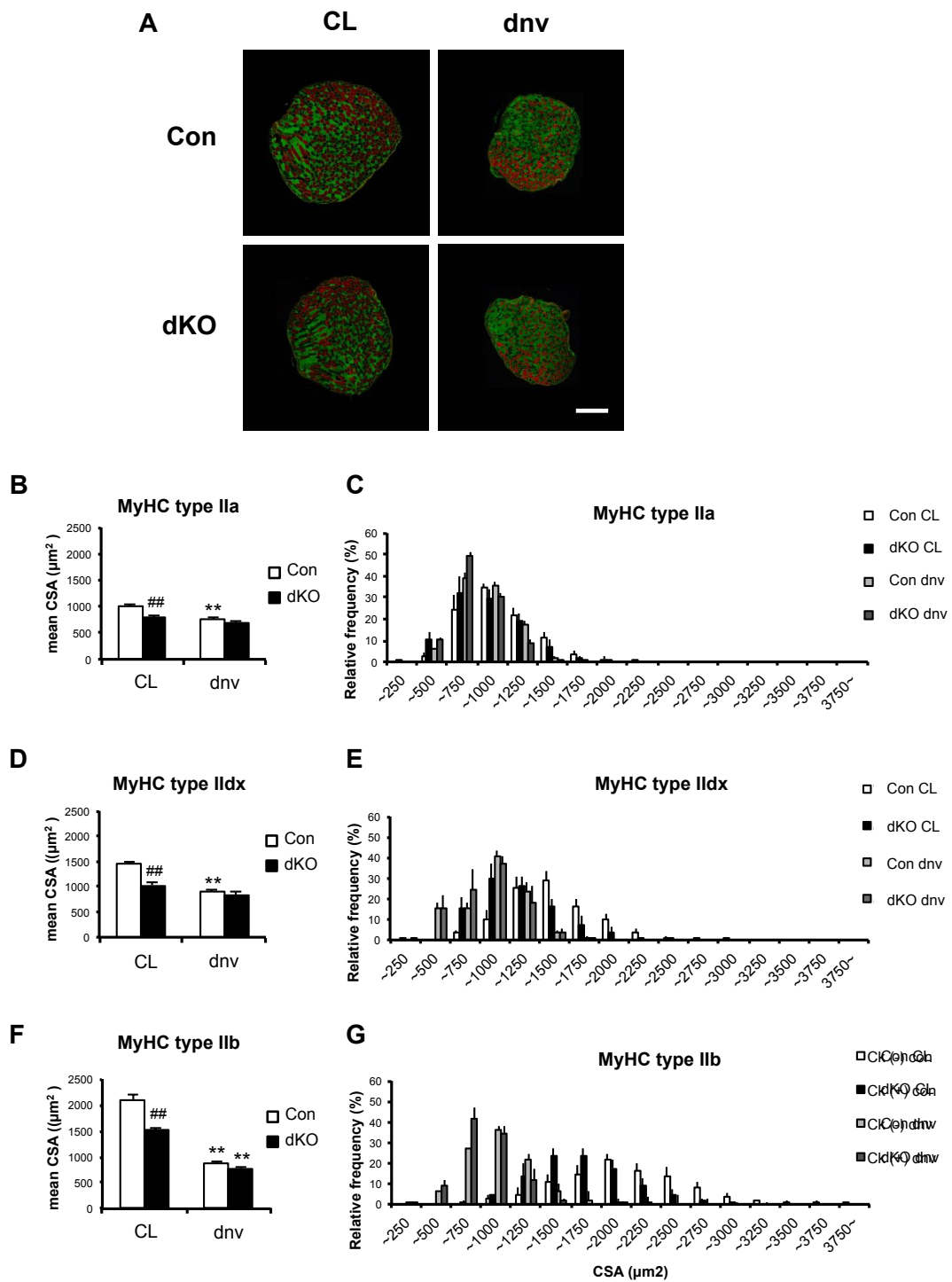


図 28. 2 週間の除神経による足底筋 (PL) の筋線維断面積の変化

(A) 足底筋断面の免疫染色画像. MyHC IIa 線維の平均断面積 (B) と断面積の分布 (C). MyHC II/d/x 線維の平均断面積 (D) と断面積の分布 (E). MyHC IIb 線維の平均断面積 (F) と断面積の分布 (G). $n=5$, $**P < 0.01$ vs CL, $##P < 0.01$ vs Con, Mean+SEM. CL, contralateral (非手術脚); dnv, denervation (除神経手術脚). Scale bar, 500 μm .

少するため（図 18B），足底筋内の IIa 線維の CSA 増加が相殺された可能性も考えられる．一方で，ヒラメ筋では dKO により筋線維の CSA が増加したにも関わらず，筋重量，筋線維組成，筋線維数に有意な変化が認められなかった（表 2，図 18B，19B）．ヒラメ筋を主に構成する MyHC IIa 線維の割合が dKO により減少傾向を示す（図 18B， $P = 0.244$ ）ことと，ヒラメ筋の筋線維数が dKO により減少傾向を示す（図 18C， $P = 0.28$ ）ことで，CSA の増加による筋重量の増加が相殺された可能性が考えられる．CSA は取得した画像をもとにマニュアルで筋線維の輪郭を描いて断面積を算出し，筋線維数も画像から数えているために，微細な差を見いだすことができなかった可能性が考えられる．また，dKO マウスの筋力について有意な変化が認められなかったことから（表 3），miR-23a/b クラスター欠損による筋線維の微細な変化は骨格筋に機能的な影響を及ぼさないことが示唆された．

4.2 骨格筋運動適応における miR-23a/b クラスターmiRNA の機能

4 週間の自発性走行運動により Con と dKO マウスにおいて足底筋とヒラメ筋の肥大が認められた（図 21C，21D）．足底筋は Con と dKO マウスで同様な肥大を示したが，ヒラメ筋においては dKO により有意な筋肥大の亢進が認められた

(図 21D) ことから, miR-23a/b クラスターmiRNA が遅筋の肥大に関与することが示唆された. 4 週間の自発性走行運動は Con と dKO マウスの速筋において IIa 線維の断面積を増加させたが, dKO による IIa 線維の肥大は運動後にも維持されていた. また, ヒラメ筋においても dKO による I と IIa 線維の肥大が運動後にも維持されており, 運動による疲労耐性の高い筋線維の肥大に miR-23a/b クラスターmiRNA の欠損が影響しないことが示唆された. 一方, ヒラメ筋の CSA はジェノタイプに関係なく運動によって有意に減少した (図 24D, E). ヒラメ筋を構成する筋線維の数が運動により増加する傾向を示したことから (Con sed 群, 952 ± 34.16 ; Con ex 群, 1012.2 ± 23.6 ; dKO sed 群, 925.8 ± 25.16 ; dKO ex 群, 956.6 ± 18.12 , vs ex; $P = 0.11$), 運動による筋線維数の増加によりヒラメ筋の重量が増加したと考えられた.

骨格筋における miR-23a/b クラスターの欠損は, 骨格筋内の PGC-1 α , MyHC IIa, COX IV の発現量 (図 22) や SDH 活性に有意な変化を示さなかったが (図 23A), miR-23a を強発現したトランスジェニック (Tg) マウスでは, 遅筋における PGC-1 α , COX IV, Cytochrome c のタンパク質発現が抑制されることが報告されている¹⁹¹. しかし, 筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損マウスのみならず (図 21-24) miR-23a Tg マウスにおいても, 骨格筋の運動適応に有意な変化が認めら

れなかった¹⁹¹。これらの結果は、前述した先行研究¹⁶⁰と矛盾しているが、実施した運動形式の違いによる差である可能性が考えられる。先行研究で行った運動形式は一過性のトレッドミル走行運動であり、本研究と Wada らの研究で行った運動形式は4週間の自発走行運動である。したがって、骨格筋由来の miR-23a/b クラスターmiRNA は一過性トレッドミル走行運動では miR-23 の発現変動を介して PGC-1 α の制御に関与する可能性があるが、長期間の自発走行運動に伴う運動適応には影響しないことが示唆された。

本研究では、ミトコンドリアの量的変化を評価する PGC-1 α や COX IV の発現量を検討した。一方、持久性運動はミトコンドリアの量のみならず機能も亢進することが知られている¹⁹²。また、ミトコンドリアはダイナミックに融合・分裂し、機能不全なミトコンドリアをオートファジー (Autophagy) により選択的に除去すること (mitophagy; マイトファジー) で品質管理を行うことが知られている¹⁹³。骨格筋の酸化的代謝においてミトコンドリア機能の制御は重要であり、ミトコンドリアの量的変化のみならず、電子伝達系と酸化的リン酸化共役による酸素消費量やミトコンドリアの形態変化とマイトファジーを評価し、miR-23a/b クラスターmiRNA の欠損によるミトコンドリアの詳細な機能変化を検討する必要があると考えられる。

4.3 運動誘発性の miR-23a/b クラスター-miRNA 発現変動

本研究により、4 週間の自発走行運動によるマウスの骨格筋適応について、miR-23a/b クラスターの欠損による有意な差は認められなかった。骨格筋は運動トレーニング期間中に行う一過性運動の反復によって、徐々に運動環境に適応していくと考えられている。運動適応過程において、筋組織内の miR-23a/b クラスター-miRNA がどのような発現変化を示すかを検討するため、4 週間の自発走行運動及び一過性運動後の骨格筋における miR-23a/b クラスター-miRNA の発現を検討した。自発走行運動は強制運動によるストレスがない反面¹⁹⁴、マウスの走行行動を制御することが難しいために、本研究ではマウスが活発に活動する暗期時（12 時間）の自発運動を一過性運動とみなした¹⁷³⁻¹⁷⁵。一過性運動後、Con の足底筋において miR-23a/b クラスターの各 miRNA 中、miR-23a、miR-23b、miR-24、miR-27a の発現量が有意な減少を示した（図 25C）。しかし、dKO マウスでは有意な発現の変動が認められなかった。一方、4 週間の自発走行運動後、足底筋において miR-23a と miR-27a、ヒラメ筋において miR-24 と miR-27a（Con のみ）の発現の亢進が示された（図 25A, B）。特に足底筋の場合、dKO マウスにおいて運動後の miR-23a と miR-27a の発現量が安静時の Con の発現量のレベルまで上昇した（図 25A）ことから、miR-23a/b クラスターの dKO による骨格筋

の運動適応反応が補償された可能性が考えられる。しかし、それは運動後の Con マウスの miR-23a と miR-27a の発現レベルまでには達しておらず (図 25A), 4 週間の運動による miR-23a と miR-27a の発現亢進が Ckmm-Cre による miR-23a/b クラスターの欠損を完全に補償した可能性は低いのではないかと考えられる。

4.4 運動誘発性血管新生における miR-23a/b クラスターmiRNA の機能

運動による血管新生は骨格筋に必要なエネルギーや酸素供給のために重要な適応反応であり、先行研究により miR-23a/b クラスターの各 miRNA が血管新生に関わることが報告されてきた。miR-23 と miR-27 は血管新生を阻害する Sprouty 2 と Semaphorin 6A を抑制し血管新生を促進する反面¹⁹⁵, miR-24 は血管内皮細胞の分化に重要である GATA-binding factor (GATA) 2 と Serine-threonine-protein kinase PAK 4 (PAK4) を抑制し、血管内皮細胞のアポトーシスを促進、血管新生を抑制することが報告されている¹⁹⁶。本研究により、dKO マウスは持久性運動による骨格筋毛細血管新生に有意な変化を示さないことが明らかになり (図 23B, C, D), 筋線維由来の miR-23a/b クラスターmiRNA は運動誘発性血管新生に影響しないことが示唆された。血管内皮細胞特異的な miR-23a/b クラスターの欠損マウスにおいても、2 週間の自発走行運動による足底筋の血管新生に有意な変

化が認められず、血管内皮細胞由来の miR-23a/b クラスターmiRNA が血管新生に重要でないことが示唆されている¹⁹⁷。しかし、前述のように miR-23a/b クラスターの各 miRNA が主に *in vitro* において血管新生の亢進と抑制機能を有すると報告されているため^{195,196}、miR-23a/b クラスターmiRNA を全て欠損させることにより血管新生への影響が相殺された可能性も考えられる。したがって、miR-23a/b クラスターmiRNA の血管新生における機能をより深く検討するためには、今後 miR-23a/b クラスターの各 miRNA を個別に欠損あるいは導入するモデルで血管新生に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

4.5 筋量の調節に関する miR-23a/b クラスターmiRNA の機能

miR-23a/b クラスターを構成する miRNA 中、miR-23 は筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA を 3'UTR 依存的に抑制し¹⁵²、miR-27 は骨格筋成長の阻害因子である Myostatin の発現を抑制する¹⁶³。miR-24 も筋萎縮を促進する TGF- β ファミリーシグナルの Alk4¹⁶⁹ と Smad2/4^{168, 170} を標的とする。したがって、骨格筋における miR-23a/b クラスターの欠損は、これらの標的遺伝子による骨格筋萎縮の抑制を解除するために、骨格筋の萎縮を亢進すると予想した。しかし、本研究では dKO マウスの骨格筋において除神経による筋萎

縮が抑制された (図 26). 特に, 遅筋線維が優位に存在するヒラメ筋において miR-23a/b クラスターの欠損により萎縮率が有意に減少した (図 26H). ヒラメ筋において Atrogin-1 と Murf1 の発現量が dKO による変化を示さなかったことから (図 29), dKO マウスの遅筋における筋萎縮抵抗性に筋特異的ユビキチンリガーゼによるタンパク質の分解は抑制されていないことが示唆された. しかし, Atrogin-1 や MuRF1 欠損マウスにおいて飢餓によるオートファジーが正常に亢進することから¹⁹⁸, オートファジーがユビキチン・プロテアソームシステムとは独立して筋萎縮を制御することが明らかになった. オートファジーの抑制は炎症性サイトカインや酸化ストレスによる筋萎縮を阻害することが報告されているが¹⁹⁹⁻²⁰², 除神経による骨格筋の萎縮では飢餓や Rapamycin によるオートファジーの亢進が筋萎縮の程度に影響しないことが報告されている²⁰³. 筋萎縮時におけるタンパク分解はユビキチン・プロテアソームシステムのみならずオートファジーによって調節されており, 様々な筋萎縮モデルにおいてその作用機序が異なる. したがって, miR-23a/b クラスターmiRNA の欠損による筋萎縮の影響を明らかにするためには, 今後 dKO マウスにおけるオートファジーの変化や, 飢餓, 後肢懸垂, ギムス固定など他の筋萎縮モデルを用いたより詳細な検討が必要であると考えられる.

一方、除神経による筋萎縮の際、骨格筋ではタンパク質の分解のみならず、筋萎縮に対する適応反応としてタンパク質の合成も亢進することが報告されている²⁰⁴。特に、除神経の期間が長くなるほどタンパク質の合成シグナルがより亢進していくことが報告されている²⁰⁴。dKO マウスにおいて除神経手術2週間後にヒラメ筋の萎縮抑制が認められ、Akt のリン酸化が有意に亢進することから（図 31A）、除神経の後期に亢進するタンパク質の合成シグナルが dKO によって増幅された可能性が考えられた。Akt シグナルの下流である S6K のリン酸化も、統計的な有意差は認めなかったが、ヒラメ筋において dKO により亢進する傾向を示した（図 31B）。これらのことから、dKO マウスのヒラメ筋においてタンパク質の分解は変動せず、タンパク質合成が亢進することで、除神経による筋萎縮が抑制された可能性があると考えられた。

除神経モデルを用いて筋萎縮を研究する際、多くの研究では筋萎縮の比較対象として手術を受けたマウスの除神経していない脚（非手術脚; Contralateral, CL, 図 26A）の骨格筋を用いている。しかし、片脚の除神経手術により移動の際の体重負荷が非手術脚に集中するので、厳密には非手術脚に通常より大きい負荷がかかっている状態となる。除神経の手術を行っていない（normal control）マウスの骨格筋においては dKO による筋重量の変化が認められず（図 26C）、Akt

のリン酸化にも有意な変化が認められなかった (図 20B). 一方, 非手術脚において dKO によりヒラメ筋重量が有意に増加し (図 26E, G), 4 週間の自発走行運動によってヒラメ筋重量の増加が dKO で有意に大きく (図 21D), Akt シグナルの有意な亢進も認められた (図 31A). これらの結果は, dKO マウスの遅筋ではメカニカルストレス増加による筋肥大に対して, 感受性が高まっていることを示唆するのかもしれない. 筋肥大における miR-23a/b クラスター-miRNA の機能を明らかにするために, 今後筋肥大モデルを用いた検討が必要であると考えられる.

4.6 Ckmm-cre による筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損モデルについて

本研究では, 骨格筋における miR-23a/b クラスター-miRNA の機能を解析するために, これまでに多くの研究で用いられている cre-driver である Ckmm-cre (Mck-cre) を用いて筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損マウスを作製した. Muscle creatinine kinase (Mck) プロモーターは発生段階において primary 筋線維が形成される胎生 13.5 日に初めて活性化し²⁰⁵⁻²⁰⁷, 未分化の筋芽細胞ではなく分化が完了した多核の筋線維でのみ活性化することが報告されている¹⁸⁵. 本研究でも Cre によるゲノムレベルでの組換えや, miR-23a/b クラスター-miRNA 発現量

の減少が、単離した筋線維特異的に認められた (図 15, 16).

dKO マウスの骨格筋において Ckmm-cre による miR-23a/b クラスター-miRNA の有意な減少が認められたものの, 20%以上の miRNA が残存していた (図 16).

骨格筋組織には血管や神経, 線維芽細胞など Ckmm-cre に影響されない多くの細胞が存在することに加え, 筋線維の基底膜と形質膜の間にサテライト細胞と呼ばれる単核の骨格筋組織幹細胞も存在する. 筋線維からサテライト細胞を除いた筋線維の筋核のみを抽出することは技術的に困難であり, 本研究でも単離した dKO マウスの筋線維において miR-23a/b クラスター-miRNA の発現が検出された (図 16C). サテライト細胞や筋芽細胞, 線維芽細胞を含んだ細胞分画において Ckmm-cre によるゲノムの組換えが起きておらず (図 15C, D), miR-23a/b クラスター-miRNA の発現量の低下が認められないことから (図 16D), dKO マウスの骨格筋で残存した miR-23a/b クラスター-miRNA は, これらの細胞由来である可能性が高いと考えられた. 一方で, Ckmm-cre の不十分なゲノムの組換えにより miR-23a/b クラスター-miRNA が dKO マウスの骨格筋で残存した可能性も考えられる. 本研究と同一な Ckmm-cre マウス (Transgenic, Stock# 006475, The Jackson laboratory) を用いた先行研究により, マウス骨格筋の筋核の付加が完了した 1.5 ヶ月齢の筋線維において, Ckmm-cre が筋線維のすべての筋核で活性化

することが報告された¹⁸⁵ことから、本研究でも Ckmm-cre の mosaicism による影響は低いのではないかと考えられた。しかし、Transgenic マウスは transgene の発現の程度が世代によって異なる可能性があるために、dKO マウスの Ckmm-cre によるゲノムの組換え効率をより詳細に検討する必要があると考えられる。

dKO マウスにおいて miR-23a クラスター-miRNA が miR-23b クラスター-miRNA よりも骨格筋に多く残存していた (図 16)。一方、血管内皮細胞特異的な miR-23a/b クラスター欠損マウスの肺組織においては miR-23b クラスター-miRNA が多く残存していることが報告されている¹⁹⁷。miR-23a/b クラスターの転写調節機構はまだ明らかになっていないが、miR-23a クラスターと miR-23b クラスターにおいて Mef-2C と PGC-1 α によるプロモーター活性化様式が異なることが報告されている¹⁶³。また、筋芽細胞と線維芽細胞においても miR-23a クラスターのプロモーター活性化様式が異なることも報告されており²⁰⁸、各細胞における miR-23a/b クラスターの転写調節の違いが dKO マウスの骨格筋組織において異なる発現パターンを誘導した可能性が考えられる。

Ckmm-cre は心筋にも発現しており¹⁸⁶、miR-23a/b クラスターの成熟型 miRNA の発現量が dKO マウスの心臓において減少していた (図 16F)。一方、dKO と

Con マウスの間で心重量 (表 2) や、持久性運動による心重量 (図 21B) の増加と走行距離 (表 3) に有意な差は認められなかった。また、1 年齢以上の dKO マウスを観察した結果、心疾患による突然死など成長過程に異常が観察されていないことから、マウスの心臓に dKO による機能不全は生じていないと考えられた。しかし、dKO マウスの表現型において、心筋における miR-23a/b クラスター miRNA の減少が及ぼす影響を確認するためには、dKO による心臓の構造・機能的変化をより詳細に検討する必要があると考えられる。

現在まで、様々な miRNA の欠損マウスの多くが顕著な表現型を示さないと報告されてきた²⁰⁹。miRNA の機能は 7 塩基の Seed 配列に依存しており、単一の mRNA が複数の miRNA により標的となり得るために、ある種の miRNA の欠損が他の miRNA によって代償される可能性が高いと考えられる。さらに、miRNA が細胞からエクソソームにより血中に放出され²¹⁰、遠隔の細胞における遺伝子発現調節に関与する可能性も考えられている。これらのことから、筋特異的な miR-23a/b クラスター miRNA の欠損により生じる骨格筋内の miRNA 発現パターンの変化や、他組織からのエクソソーム miRNA により dKO マウスの表現型が影響される可能性が考えられる。また、miRNA のみならず様々な mRNA も発現変化を示すと考えられ、本研究で観察された dKO マウスの表現型を解析するに

あたり、骨格筋における miRNA や mRNA の発現変動を網羅的に検討する必要があり、今後、責任遺伝子やシグナルを同定する必要があると考えられる。

5. 結論

Ckmm-cre による筋特異的 miR-23a/b クラスター欠損 (dKO) マウスは正常な骨格筋の発達・成長を示し、定常状態において野生型マウスと同様な表現型を示した。dKO マウスの自発走行運動による骨格筋の適応において、通常骨格筋運動適応を示したが、ヒラメ筋において運動による筋肥大の増大が認められた。また、除神経による筋萎縮の際、dKO マウスにおいてヒラメ筋における筋萎縮の抑制が認められ、Akt のリン酸化が亢進していた。さらに、dKO マウスにおいて体重負荷が増加する非手術脚で、ヒラメ筋が筋肥大を示していた。

これらのことから、本研究により筋線維由来の miR-23a/b クラスターmiRNA は骨格筋の発達や成長、運動に適応する際に生じる収縮・代謝特性の変化には関与しないことが示唆された。一方、骨格筋の量的可塑性に関与することが示唆され、特に、メカニカルストレス増加に対する遅筋の筋肥大を miR-23a/b クラスターmiRNA が抑制している可能性が示唆された。

6. 謝辞

本稿の作成に当たり、物心両面にご助言、ご指導をいただきました牛田 多加志先生、秋本 崇之先生に心より深く感謝を申し上げます。研究計画から論文執筆まで 4 年間の博士課程の間、多くのご指導をいただき、常に私を励まし続けていただきました。心より深く感謝を申し上げます。

研究室のメンバーである佐古 博皓さんと及川 哲志さんに日々の研究室生活の中で、多くの助けをいただきました。また、先輩方のおかげでいつも刺激を受けつつ、楽しく研究生活が送れました。心より深く感謝を申し上げます。

最後に、韓国にいる家族の励ましと支えにより私は他国にいても心強く過ごすことができました。長い日本留學生活を支えていただきました両親と兄に心より深く感謝を申し上げます。

本研究の一部は *Scientific Reports* に掲載された.

引用文献

- 1 Smerdu, V., Karsch-Mizrachi, I., Campione, M., Leinwand, L. & Schiaffino, S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* **267**, C1723-1728, doi:10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1723 (1994).
- 2 Maughan, R. J., Watson, J. S. & Weir, J. Relationships between Muscle Strength and Muscle Cross-Sectional Area in Male Sprinters and Endurance Runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **50**, 309-318 (1983).
- 3 Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447-1531, doi:10.1152/physrev.00031.2010 (2011).
- 4 Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S. G., K. & Lomo, T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* **10**, 153-160 (1990).
- 5 Sandona, D. *et al.* Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PLoS One* **7**, e33232, doi:10.1371/journal.pone.0033232 (2012).
- 6 Prince, F. P., Hikida, R. S. H., F. C., Staron, R. S. & Allen, W. H. A morphometric analysis of human muscle fibers with relation to fiber types and adaptations to exercise. *J Neurol Sci* **49**, 165-179 (1981).
- 7 Eddinger, T. J. & Moss, R. L. Mechanical properties of skinned single fibers of identified types from rat diaphragm. *Am J Physiol* **253**, C210-218, doi:10.1152/ajpcell.1987.253.2.C210 (1987).
- 8 Musarò, A. *et al.* Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* **27**, 195-200, doi:10.1038/84839 (2001).
- 9 Handschin, C. S., B.M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature* **454**, 463-469 (2008).
- 10 Wu, Z. *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124, doi:10.1016/s0092-8674(00)80611-x (1999).

- 11 St-Pierre, J. *et al.* Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* **278**, 26597-26603, doi:10.1074/jbc.M301850200 (2003).
- 12 Mootha, V. K. *et al.* Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6570-6575, doi:10.1073/pnas.0401401101 (2004).
- 13 Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1a drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801, doi:10.1038/nature00936 (2002).
- 14 Calvo, J. A. *et al.* Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol (1985)* **104**, 1304-1312, doi:10.1152/jappphysiol.01231.2007 (2008).
- 15 Geng, T. *et al.* PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C572-579, doi:10.1152/ajpcell.00481.2009 (2010).
- 16 Zechner, C. *et al.* Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab* **12**, 633-642, doi:10.1016/j.cmet.2010.11.008 (2010).
- 17 Fan, W. *et al.* ERRgamma Promotes Angiogenesis, Mitochondrial Biogenesis, and Oxidative Remodeling in PGC1alpha/beta-Deficient Muscle. *Cell Rep* **22**, 2521-2529, doi:10.1016/j.celrep.2018.02.047 (2018).
- 18 Olfert, I. M. *et al.* Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. *J Physiol* **587**, 1755-1767, doi:10.1113/jphysiol.2008.164384 (2009).
- 19 Gustafsson, T., Puntschart, A., Kaijser, L., Jansson, E. & Sundberg, C. J. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**,

- microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C124-137, doi:10.1152/ajpcell.00142.2010 (2011).
- 164 Callis, T. E. *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* **119**, 2772-2786, doi:10.1172/JCI36154 (2009).
- 165 Bell, M. L., Buvoli, M. & Leinwand, L. A. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol Cell Biol* **30**, 1937-1945, doi:10.1128/MCB.01370-09 (2010).
- 166 Allen, D. L. *et al.* Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E918-927, doi:10.1152/ajpendo.00798.2007 (2008).
- 167 Huang, Z., Chen, X., Yu, B., He, J. & Chen, D. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 265-269 (2012).
- 168 Sun, Y. *et al.* miR-24 and miR-122 Negatively Regulate the Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Pathway in Skeletal Muscle Fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids* **1**, 528-537 (2018).
- 169 Wang, Q. *et al.* MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* **111**, 588-595 (2008).
- 170 Ma, Y. *et al.* Functional screen reveals essential roles of miR-27a/24 in differentiation of embryonic stem cells. *EMBO J* **34**, 361-378 (2014).
- 171 Li, H., Chen, J., Chen, S., Zhang, Q. & Chen, S. Antifibrotic effects of Smad4 small interfering RNAs in injured skeletal muscle after acute contusion. *Int J Sports Med* **32**, 735-742 (2011).
- 172 Akimoto, T., Ribar, T. J., Williams, R. S. & Yan, Z. Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **287**, C1311-C1319, doi:10.1152/ajpcell.00248.2004 (2004).
- 173 Wu, H. *et al.* Activation of MEF2 by muscle activity is mediated

- through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J* **20**, 6414-6423, doi:10.1093/emboj/20.22.6414 (2001).
- 174 Choi, S. *et al.* Transcriptional profiling in mouse skeletal muscle following a single bout of voluntary running: evidence of increased cell proliferation. *J Appl Physiol (1985)* **99**, 2406-2415, doi:10.1152/jappphysiol.00545.2005 (2005).
- 175 Akimoto, T. *et al.* Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* **280**, 19587-19593, doi:10.1074/jbc.M408862200 (2005).
- 176 Brüning, J. C. *et al.* A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* **2**, 559-569 (1998).
- 177 Truett, G. E. *et al.* Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29**, 52, 54, doi:10.2144/00291bm09 (2000).
- 178 Nachlas, M. M., Tsou, K. C., De Souza, E., Cheng, C. S. & Seligman, A. M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* **5**, 420-436, doi:10.1177/5.4.420 (1957).
- 179 Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* **6**, 275-277, doi:10.1038/nmeth.1314 (2009).
- 180 Goodman, C. A. & Hornberger, T. A. Measuring protein synthesis with SUnSET: a valid alternative to traditional techniques? *Exerc Sport Sci Rev* **41**, 107-115, doi:10.1097/JES.0b013e3182798a95 (2013).
- 181 Pasut, A., Jones, A. E. & Rudnicki, M. A. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *J Vis Exp*, e50074, doi:10.3791/50074 (2013).
- 182 Gallot, Y. S., Hindi, S. M., Mann, A. K. & Kumar, A. Isolation, Culture, and Staining of Single Myofibers. *Bio Protoc* **6**, e1942, doi:10.21769/BioProtoc.1942 (2016).
- 183 Cabe, P. A., Tilson, H. A., Mitchell, C. L. & Dennis, R. A simple recording grip strength device. *Pharmacol Biochem Behav* **8**, 101-102

- (1978).
- 184 Maurissen, J. P. J., Marable, B. R., Andrus, A. K. & Stebbins, K. E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology* **25**, 543-553, doi:10.1016/s0892-0362(03)00073-4 (2003).
- 185 Bi, P. *et al.* Stage-specific effects of Notch activation during skeletal myogenesis. *Elife* **5**, e17355, doi:10.7554/eLife.17355 (2016).
- 186 Johnson, J. E., Wold, B. J. & Hauschka, S. D. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **9**, 3393-3399 (1989).
- 187 Holloszy, J. O. Biochemical Adaptations in Muscle *J Biol Chem* **242**, 2278-2282 (1967).
- 188 Bengtsson, J., Gustafsson, T., Widegren, U., Jansson, E. & Sundberg, C. J. Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflugers Arch* **443**, 61-66, doi:10.1007/s004240100628 (2001).
- 189 Lira, V. A., Benton, C. R., Yan, Z. & Bonen, A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E145-161, doi:10.1152/ajpendo.00755.2009 (2010).
- 190 Okamoto, T., Torii, S. & Machida, S. Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx/Atrogin-1 and MuRF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. *J Physiol Sci* **61**, 537-546, doi:10.1007/s12576-011-0175-6 (2011).
- 191 Wada, S. *et al.* MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch* **467**, 389-398, doi:10.1007/s00424-014-1517-z (2015).
- 192 Tonkonogi, M. & Sahlin, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* **30**, 129-137 (2002).
- 193 Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J. J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462** 245-253 (2007).

- 194 Goh, J. & Ladiges, W. in *Current Protocols in Mouse Biology* Vol. 5 283-290 (Curr Protoc Mouse Biol., 2015).
- 195 Zhou, Q. *et al.* Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8287-8292, doi:10.1073/pnas.1105254108 (2011).
- 196 Fiedler, J. *et al.* MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* **124**, 720-730, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039008 (2011).
- 197 Oikawa, S., Wada, S., Lee, M., Maeda, S. & Akimoto, T. Role of endothelial microRNA-23 clusters in angiogenesis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **315**, H838-H846, doi:10.1152/ajpheart.00742.2017 (2018).
- 198 Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**, 458-471 (2007).
- 199 Aucello, M., Dobrowolny, G. & Musarò, A. Localized accumulation of oxidative stress causes muscle atrophy through activation of an autophagic pathway. *Autophagy* **5**, 527-529 (2009).
- 200 McClung, J. M., Judge, A. R., Powers, S. K. & Yan, Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C542-549 (2010).
- 201 Paul, P. K. & Kumar, A. TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy* **7**, 555-556 (2011).
- 202 Bhatnagar, S., Mittal, A., Gupta, S. K. & Kumar, A. TWEAK causes myotube atrophy through coordinated activation of ubiquitin-proteasome system, autophagy, and caspases. *J Cell Physiol* **227**, 1042-1051 (2012).
- 203 Pigna, E. *et al.* Increasing autophagy does not affect neurogenic muscle atrophy. *Eur J Transl Myol* **28**, 7687 (2018).
- 204 Quy, P. N., Kuma, A., Pierre, P. & Mizushima, N. Proteasome-dependent activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is essential for autophagy suppression and

- muscle remodeling following denervation. *J Biol Chem* **288**, 1125-1134, doi:10.1074/jbc.M112.399949 (2013).
- 205 Lyons, G. E. *et al.* Developmental regulation of creatine kinase gene expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle. *Development* **113**, 1017-1029 (1991).
- 206 Kelly, A. M. The Histogenesis of Rat Intercostal Muscle. *The Journal of Cell Biology* **42**, 135-153, doi:10.1083/jcb.42.1.135 (1969).
- 207 Harris, A. J., Duxson, M. J., Fitzsimons, R. B. & Rieger, F. Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* **107**, 771-784 (1989).
- 208 Hernandez-Torres, F., Aranega, A. E. & Franco, D. Identification of regulatory elements directing miR-23a-miR-27a-miR-24-2 transcriptional regulation in response to muscle hypertrophic stimuli. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 885-897, doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.009 (2014).
- 209 Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20-51 (2018).
- 210 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007).