

氏 名	岩崎 広高
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第745号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in human induced pluripotent stem cells (microRNA-494 はヒト iPS 細胞の骨格筋分化において筋線維型制御に 関与する)
審査委員	主査 教授 小島 秀人 副査 教授 松浦 博 副査 教授 久津見 弘

論文内容要旨

※整理番号	752	氏名 (ふりがな)	いわさきひろたか 岩崎広高
学位論文題目	MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in human induced pluripotent stem cells (microRNA-494 はヒト iPS 細胞の骨格筋分化において筋線維型制御に関与する)		
<p>【目的】骨格筋はヒト生体内最大の代謝内分泌器官であり、基礎代謝の22%を担っているが、糖尿病、サルコペニアによって、骨格筋ミトコンドリアの量、質が低下することが知られている。これまでに我々はマウス C2C12 細胞の骨格筋分化において、microRNA-494 (miR-494) がミトコンドリア生合成に関与することを明らかにしている。他方、miR-494 が肥満症患者において運動で減少することが報告されている。そこで我々は、miR-494 が糖尿病やサルコペニアの治療標的となりうると思え、本研究ではまず、miR-494 のヒト骨格筋分化における役割について検討した。</p> <p>【方法】我々は共同研究者の協力を得て、これまで困難であったヒト骨格筋細胞分化システムを確立した。すなわち、ヒト iPS 細胞株に筋分化特異的転写因子(MYOD1/Tet-ON)を発現させ、ドキシサイクリン添加による分化誘導で、高効率に骨格筋細胞へ分化誘導することに成功した。このシステムを用いて、ヒト iPS 細胞から成熟骨格筋細胞への分化過程における miR-494 の発現を Taqman real-time PCR 法で解析した。さらに、miR-494 の骨格筋分化における役割を検討するため、miR-494 inhibitor による阻害実験、および、miR-494 precursor による過剰発現実験を行った。骨格筋細胞特異的遺伝子発現変化の定量には real-time PCR 法および Western Blot 法を、骨格筋細胞の酸素消費速度測定には細胞外セルフラックスアナライザーを、骨格筋細胞のミトコンドリア機能評価には NADH 染色、SDH 染色や mitotracker red 染色を用いて解析した。</p> <p>【結果】miR-494 はヒト骨格筋分化初期(day1)に一過性に発現上昇し、day2 以降において有意に減少することを発見した。まず、miR-494 阻害実験により分化初期(day1)の一過性上昇を抑制したところ、成熟した筋管細胞への分化、骨格筋細胞の酸素消費速度、mitotracker red 染色で染まる筋管細胞の割合には有意な変化を認めなかった。一方、day1 以降における miR-494 の過剰発現実験では、成熟した筋管細胞への分化が45%阻害され、それに対応した骨格筋細胞の酸素消費速度の減少と、mitotracker red 染色の減少を認めた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

また、miR-494 過剰発現によって I 型筋線維マーカータンパク (Myh7) 発現は有意な変化がなかったが、IIa 型筋線維マーカータンパク (Myh2) 発現は有意に低下し、NADH 染色および SDH 染色で濃染される筋管細胞の割合も相関的に減少した。しかし、ミトコンドリア DNA、ミトコンドリア関連タンパク (TFAM、Foxj3、SDHA、MnSOD) 発現については有意な変化を認めなかった。

RNA 干渉法により Myh2 発現をノックダウンすると、骨格筋細胞の酸素消費速度が減少し、miR-494 過剰発現時と同様に mitotracker red 染色で染まる筋管細胞の割合が減少し、さらに NADH 染色および SDH 染色で濃染される筋管細胞の割合も減少した。

【考察】本研究において、miR-494 がヒト iPS 細胞からの骨格筋細胞分化過程で、2 相性に発現変動を示すことを見出した。まず前者の一過性上昇に対する意義について検討するため、miR-494 阻害実験を行ったが、成熟した筋管細胞への分化、骨格筋細胞の酸素消費速度には有意な変化を認めず、すべてネガティブデータであった。この理由として、miR-494 に類似した他の miRNA による代償作用の可能性が考えられた。一方、後者の下降相に対する過剰発現実験では、成熟した筋管細胞への分化が阻害され、骨格筋細胞の酸素消費速度が減少した。ミトコンドリア発現には有意な差を認めず、有酸素的解糖能が高い IIa 型筋線維タンパク (Myh2) 発現のみが有意に抑制されていた。さらに、Myh2 ノックダウン実験により、miR-494 過剰発現と同様の結果が得られたことから、miR-494 は Myh2 発現抑制を介して IIa 型筋線維様の筋管細胞への分化を阻害し、ミトコンドリア生合成には変化を及ぼさずに、骨格筋細胞の酸素消費速度を減少させていると考えられる。糖尿病や筋疾患に対する治療応用に向けて、今後更に miR-494 の標的遺伝子や、miR-494 アイソフォームを明らかにすることが求められる。

【結論】我々は miR-494 が IIa 型筋線維特異的にヒト骨格筋細胞分化・発現を制御することを明らかにした。ヒト筋線維構成機序の一端を示す世界で初めての知見となった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	752	氏名	岩崎 広高
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>骨格筋の代謝状態は糖尿病やサルコペニアなどの疾患の発症進展に重要な役割を持つ。そこで、マイクロ RNA の一つである miR-494 に着目し、発表者らにより開発されたヒト iPS 細胞から筋細胞への分化誘導の系を用いて、細胞の分化誘導、酸素消費量、ミトコンドリア機能に対する作用について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) miR-494 は骨格筋分化初期に一過性に発現したが、それを抑制しても、細胞の分化誘導、酸素消費量、ミトコンドリア機能には影響しなかった。 2) miR-494 を過剰発現させたところ、筋細胞への分化を抑制し、酸素消費量を減少させた。ミトコンドリア機能には明らかな影響を与えなかった。 3) miR-494 の発現により有酸素的解糖能が高い IIa 型筋繊維蛋白である Myh2 の発現が低下していたことから、miR-494 は骨格筋として IIa 型筋繊維への分化を抑制したのではないかと考えられた。 <p>本論文はヒト骨格筋細胞の分化誘導その代謝活性に対する miR-494 の作用として新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 502 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 28 年 1 月 26 日)</p>			