

博士学位論文

運動誘発性血管新生におけるマイクロ RNA の役割

平成 30 年度

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 スポーツ医学専攻

及 川 哲 志

## 目次

第1章 研究の背景.....	1
第1節 運動による骨格筋適応とその転写制御メカニズム.....	3
1 骨格筋の代謝収縮特性とその決定.....	3
2 持久性運動による骨格筋の代謝収縮特性の適応.....	8
3 持久性運動による毛細血管新生とその調節.....	14
第2節 マイクロ RNA による骨格筋および血管の制御.....	18
1 マイクロ RNA とその機能.....	18
2 マイクロ RNA による骨格筋の代謝収縮特性の制御.....	24
3 持久性運動によるマイクロ RNA の発現変動.....	30
4 マイクロ RNA による毛細血管新生の制御.....	34
第2章 仮説と目的.....	45
第3章 材料と方法.....	46
第1節 動物実験.....	46
第2節 遺伝子欠損マウスの作出.....	46
1 骨格筋特異的 Dicer 欠損マウス.....	46
2 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウス.....	47
3 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス.....	47
4 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウス.....	48
第3節 蛍光免疫染色による筋組織の解析.....	48
第4節 組織化学染色.....	49
第5節 RNA 解析.....	49
1 RNA 抽出.....	49
2 cDNA への逆転写.....	50
3 定量 PCR.....	51
第6節 ウェスタンブロット.....	52
第7節 マウス背部での創傷治癒試験.....	53
第8節 <i>Ex vivo</i> 大動脈リングアッセイ.....	53

第9節 統計処理.....	54
第4章 結果.....	55
第1節 マイクロ RNA 欠損マウスの作出と運動による骨格筋適応の解析.....	55
1 骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスの作出とその表現型.....	56
2 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスの作出.....	57
3 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動による骨格筋適応の解析.....	62
第2節 血管内皮細胞特異的 miRNA 欠損マウスの作出と運動誘発性血管新生の解析.....	68
1 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (Tie2-Cre; Dicer <sup>fl/fl</sup> ) の作出.....	69
2 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生の解析.....	71
3 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (VE-Cad-Cre; Dicer <sup>fl/fl</sup> ) の作出.....	73
4 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスの作出.....	76
5 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスにおける運動誘発性血管新生の解析 .....	81
6 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスにおける血管新生能の解析.....	82
第5章 考察.....	87
第1節 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動による骨格筋適応.....	87
第2節 骨格筋におけるマイクロ RNA の安定性.....	93
第3節 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生.....	98
第4節 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスにおける表現型.....	101
第5節 miR-23 クラスターによる血管新生の制御.....	105
第6章 総合討論.....	112
第7章 結論.....	117
謝辞.....	119
参考文献.....	120

## 第1章 研究の背景

持久性運動は、心血管系機能の向上やエネルギー消費の増大による脂肪量の減少、骨格筋における代謝機能の改善等、全身の組織に多くの有益な効果をもたらす (Hawley et al. 2014). 特に骨格筋は、運動時に直接動員される組織であり、様々な刺激やストレスにより形態や特性が変化する. 長期的な持久性運動トレーニングによっては、筋線維の遅筋化やミトコンドリア新生、毛細血管新生といった骨格筋適応が惹起される (Schiaffino et al. 2011). これらの適応は、運動時および安静時におけるエネルギー消費の増大や、加齢に伴うエネルギー消費量減少の抑制をもたらす可能性がある. これまでのスポーツ医科学の研究においては、持久性運動による骨格筋適応の直接的な効果を証明することはもちろんのこと、分子生物学的、遺伝子工学的手法を用いてこれらの分子メカニズムを理解することも重要な側面として取り組まれてきた. 持久性運動による骨格筋適応の分子メカニズムを明らかにすることは、肥満や糖尿病といった代謝異常や末梢動脈疾患等の血管疾患の治療戦略の発見に寄与することが期待される.

これまでに、持久性運動による骨格筋適応の分子メカニズムについては、遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを中心として研究が発展してきたが、その全貌を解明するまでには至っていない. 近年、マイクロ RNA と呼ばれる約 22 塩基のタンパク質をコードしな

い、ノンコーディング RNA が注目を浴びている (Bartel. 2004). マイクロ RNA は、ゲノム DNA から転写された mRNA のタンパク質への翻訳を阻害する。すなわち、遺伝子の転写後調節により遺伝子発現を負に制御するノンコーディング RNA である。マイクロ RNA を含むノンコーディング RNA は、ゲノム DNA 全体の 97%程の領域にコードされるが、当初これらのノンコーディング RNA は機能を持たないジャンク RNA と考えられていた。しかしながら、マイクロ RNA が発見され、転写後調節を介して遺伝子発現を制御し得ることが明らかにされたことで、ノンコーディング RNA に関する研究分野は大きく発展した。現在では、マイクロ RNA を介した遺伝子の転写後調節は、発生や身体の生理的適応、がん等の疾患においても重要な役割を担うことが明らかにされている (Sayed et al. 2011). また、近年では、マイクロ RNA は骨格筋においても機能を有し、遺伝子発現を制御することや、培養筋細胞の増殖や分化の調節において必須の役割を担っていることも明らかにされてきた (Chen et al. 2006). そこで本博士論文では、持久性運動による骨格筋適応においても、マイクロ RNA が何らかの役割を担うと考え、マイクロ RNA の生合成に必須の酵素である Dicer を欠損させたマウスを作製し、これらのマウスにおいて持久性運動による骨格筋適応の表現型を解析した。さらに、これらのマウスにおいて観察された表現型の原因が血管内皮細胞にあると仮定し、血管内皮細胞特異的なマイクロ RNA 欠損マウスにて解析を行い、責任と

なる細胞およびマイクロ RNA の同定を試みた。

## 第1節 運動による骨格筋適応とその転写制御メカニズム

### 1 骨格筋の代謝収縮特性とその決定

骨格筋は、その収縮特性や代謝特性に基づいて、いくつかのサブタイプに大別される。このような特性の違いは、性質の異なる筋線維から構成されることに起因する。マウスのヒラメ筋は遅筋優位な筋肉であり、主に type I および type IIa 線維から構成され、ミトコンドリアが豊富に存在し高いエネルギー産生能および疲労耐性を持つ。一方で、足底筋や前脛骨筋等の速筋優位な筋は、主に type IIb 線維から構成され、解糖系酵素が豊富であり、強い収縮力を持つ (Schiaffino et al. 2011)。

筋収縮特性は、収縮タンパクであるミオシン重鎖 myosin heavy chain (MyHC) のアイソフォームの発現パターンに依存する。Type I および type IIa 線維は, *Myh7* にコードされる MyHC I および *Myh2* にコードされる MyHC IIa タンパクで構成され、Type IIb 線維は、主に MyHC IIa タンパクおよび *Myh4* にコードされる MyHC IIb タンパクで構成される。筋線維タイプを生み出す MyHC アイソフォームの発現パターンの決定ならびにその収縮特性の維持に寄与するのは、細胞内カルシウム濃度およびその細胞内動態を制御する運動神経入力である。

細胞内カルシウム動態は、MyHC タンパク発現とそれに伴う筋線維タイプの決定に重要であり、細胞内シグナルのメディエーターとしての役割を担う。細胞内カルシウムの変動は、神経筋接合部から始まるアクションポテンシャルに誘導される、筋小胞体からのカルシウム放出および取り込みにより制御されている。速筋線維と比較して遅筋線維では、定常状態において高いカルシウム濃度を保つことが報告されている (Gailly et al. 1993, Carroll et al. 1997)。この筋線維タイプに依存する細胞内カルシウム濃度の差異は、運動ニューロンの発火パターンの違いに依存する。遅筋線維では低頻度 (10-20 Hz) かつ持続的な運動ニューロンの発火が認められ、細胞内カルシウムは高濃度 (100-300nM) に保たれている (Hennig et al. 1985)。一方で速筋線維では、高頻度 (50-90 Hz) かつ一過的な発火パターンを示し、細胞内カルシウム濃度は 50nM 以下の低濃度に保たれている (Westerblad et al. 1991)。また、初代培養骨格筋細胞において、カルシウムイオノフォアによる定常時のカルシウム濃度の増加は、遅筋型 MyHC タンパク発現を促進することや (Kubis et al. 1997)、ネコおよびラットにおいて、遅筋線維の神経を速筋に reinnervation すると遅筋線維の表現型を獲得したことから、運動ニューロンの発火パターンおよび細胞内カルシウム濃度が筋線維タイプの決定に重要な因子であることが示唆された (Buller et al. 1960, Hoh 1975)。

骨格筋における細胞内カルシウムは、筋線維タイプの決定に関連するシグナル経路およ

び遺伝子発現制御において重要なメディエーターである。細胞内カルシウム濃度の摂動を感知し、細胞内シグナルへ変換する役割を担うのは、カルシウム/カルモジュリン調節性タンパクホスファターゼである calcineurin およびその標的の 1 つである転写因子 nuclear factor of activated T-cells (NFAT) である。Calcineurin は触媒サブユニット CnA と調節サブユニット CnB の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、これらのサブユニットには複数のアイソフォームが存在する (CnA $\alpha$ , CnA $\beta$ , CnB1, CnB2)。Calcineurin は、細胞内カルシウム濃度の増加により活性化し、細胞質に存在する NFAT を脱リン酸化する。脱リン酸化された NFAT は核内へ移行し、遅筋線維に関連する遺伝子の転写を活性化する (Rao et al. 1997)。C2C12 筋管細胞における恒常活性型 calcineurin の過剰発現は、troponin I slow (TnI slow) およびミオグロビンのプロモーター活性を増加させ、これらの増加はそれぞれの遺伝子のプロモーター領域に位置する NFAT 結合部位の変異により抑制されたことから、calcineurin による遅筋関連遺伝子のプロモーター活性の増加は NFAT による転写調節に依存することが示された (Chin et al. 1998)。筋型クレアチンキナーゼ (Ckmm) プロモーターにより calcineurin を過剰発現させたマウスでは、後肢筋群 (腓腹筋, 足底筋, ヒラメ筋) における遅筋線維および遅筋に関連するミオグロビンや TnI slow の発現増加が認められた (Naya et al. 2000)。一方で、calcineurin A $\alpha$  または calcineurin A $\beta$  のコンベンショナル KO マウ



スにおいては、遅筋優位および速筋優位な筋の両方で遅筋線維の減少や MyHC I, MyHC IIa/x タンパク発現の減少が認められた (Parsons et al. 2003). さらに、これらのマウスと NFAT レポーターマウスの交配により得られたマウスでは、NFAT によるレポーター活性が低下したことも報告され、calcineurin の欠損による遅筋線維の減少は、NFAT の脱リン酸化抑制によるものである可能性が示唆された。

ミトコンドリアは、糖や脂質を基質として ATP を産生するオルガネラであり、骨格筋の代謝特性の決定に寄与する。骨格筋では、速筋に比べ、遅筋においてミトコンドリアの量が豊富であり、多量の ATP を産生することで遅筋線維の特性である持続的な筋収縮活動や疲労耐性を支持する基盤となっている。ミトコンドリアは、ミトコンドリア DNA と呼ばれる独自のゲノム DNA を有し、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体を構成するタンパク群やその他にも様々な膜タンパク質等をコードする (Mishra et al. 2014)。

筋の代謝特性を決定には、ミトコンドリアの量および活性が関与する。筋のミトコンドリア量および活性を制御する中心的な分子は転写コアクチベーター Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) である。PGC-1 $\alpha$  は、褐色脂肪細胞において peroxisome proliferator-activated receptor の共役因子としてクローニングされた。C2C12 筋芽細胞における PGC-1 $\alpha$  の過剰発現は、ミトコンドリアの酸素消費量を亢進させ、ミトコ

ミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク質である cytochrome *c* complex IV (COX IV) や mitochondrial respiratory chain complex II (COX II), cytochrome *c* (Cyt *c*) のタンパク発現を増加させた (Puigserver et al. 1998). さらにこれらの表現型は、ミトコンドリア新生および活性化に関与することが明らかにされていた転写因子 nuclear respiratory factor A (NRF) との共役による PGC-1 $\alpha$  自身の遺伝子発現の増加、ならびにミトコンドリア DNA の複製を調節する mitochondrial transcription factor A (mtTFA) のプロモーター活性の増強を介していることが明らかにされた. このように PGC-1 $\alpha$  は転写コアクチベーターであることから、NRF との共役が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た (Wu et al. 1999). さらに Gain-of-function または loss-of-function アプローチにより、PGC-1 $\alpha$  の in vivo における機能が解析された. Ckmm プロモーターで PGC-1 $\alpha$  を筋特異的に過剰発現させたマウス (PGC-1 $\alpha$  Tg マウス) では、筋線維の遅筋化およびミオグロビンや TnI slow といった遅筋線維に豊富に存在する遺伝子のタンパク発現ならびに COX IV, Cyt *c* のタンパク発現が増加し、PGC-1 $\alpha$  によるミオグロビンと Tn I slow のプロモーター活性の増加は、恒常活性型 CnA との共発現により増強されることから、PGC-1 $\alpha$  によるこれらの遺伝子発現制御には、calcineurin を介したカルシウムシグナルが協調的に作用する可能性が示唆された (Lin et al. 2002). 同様に PGC-1 $\alpha$  Tg マウスにおいて、トレッドミルを用いた最大運動能力テストの走行距離の延

長および VO2 peak の増加が観察されたことから、PGC-1 $\alpha$  によるミトコンドリア関連遺伝子群の発現増加は、機能的なミトコンドリア新生を誘導し、持久性運動トレーニングにより獲得される表現型を模倣する可能性が示唆された (Calvo et al. 2008).

## 2 持久性運動による骨格筋の代謝収縮特性の適応

骨格筋は高い可塑性を持つ組織であり、様々なストレスに応答し、その特性を変化させる (Schiaffino et al. 2011). 例えば運動時には、骨格筋はダイナミックに動員され、持続的な筋活動に伴い運動神経入力や筋収縮、エネルギーの枯渇など様々なストレスが加わる. これらのストレスに応答し、骨格筋では MyHC タンパク発現の変化に伴う筋線維の遅筋化とミトコンドリア量および活性の増加による代謝機能の向上が惹起される. マウスにおける持久性運動は、速筋優位な腓腹筋と前脛骨筋における type IIa 線維の増加と type IIb 線維の減少を誘導することや (Fitzsimons et al. 1990), ミトコンドリアの量および活性を増加させることが明らかにされ (Hoppeler et al. 1973), そのメカニズムについては、転写制御を中心として多くの検討が行われている.

運動神経入力に伴う筋小胞体からのカルシウムの放出、およびこれにより活性化されるカルシウムシグナルは、遅筋線維の形成や維持に重要な役割を担うことから、持久性運動に

より惹起される筋線維の遅筋化にも何らかの役割を果たすことが想定された。そこで、運動による筋線維の遅筋化については、カルシウムシグナルに関連する転写制御を中心に検討が行われてきた (図 1)。

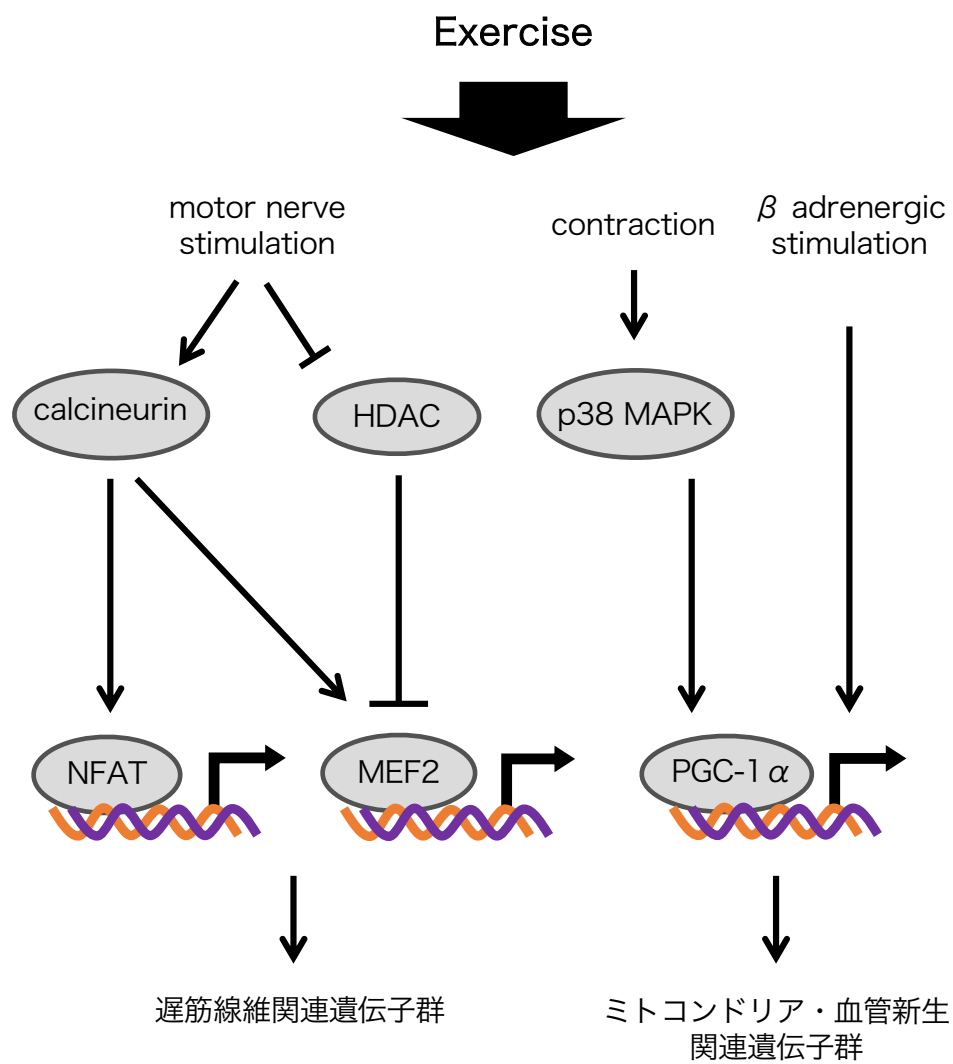


図 1 持久性運動による骨格筋適応における転写制御メカニズム

転写因子 MEF2 は、カルシウムシグナルの下流に位置し、遅筋に豊富に存在する遺伝子群の発現制御を担う転写因子である。MEF2 依存的レポーター遺伝子 (desMEF2-lacZ) マウスでは、MEF2 の転写活性に依存して lacZ 遺伝子が発現し、 $\beta$ -gal 染色により検出することが可能である (Wu et al. 2001)。Wu らは、desMEF2-lacZ マウスにおいて自発走運動ならびに 30 時間の低頻度 (10 Hz) の持続的な運動神経刺激により、ヒラメ筋や足底筋における  $\beta$ -gal 活性が増加したことを報告した。同時に、自発走運動と神経刺激による MEF2 の転写活性は、calcineurin 特異的な阻害剤である cyclosporin A の投与ならびに内因性の calcineurin 阻害タンパク質である Myocyte-enriched calcineurin interacting protein (MCIP1) の Tg マウスとの交配により抑制された。これらのことから、自発走運動および運動神経入力に誘導される MEF2 による遅筋関連遺伝子の発現導入には、calcineurin を介した MEF2 の脱リン酸化が重要であることが示唆された (Wu et al. 2001)。

Class II histone deacetylases である HDAC4 および HDAC5, HDAC9 は、MEF2 との相互作用により、その転写活性を阻害する (McKinsey et al. 2000)。これらの HDAC は、核内において MEF2 と相互作用するが、リン酸化により核外へ輸送される (McKinsey et al. 2000)。HDAC4, 5, 9 のタンパク発現は、速筋優位な足底筋や長趾伸筋と比較して、遅筋優位なヒラメ筋において低く、HDAC5 および HDAC9 のコンディショナル KO, HDAC4 の筋特異的

および HDAC5 のコンディショナル KO, 全ての HDAC のコンディショナル KO マウスでは, type I および type IIa 線維の増加が認められた. さらに, doxycycline 誘導性の HDAC5 Tg マウスにおいては, 4 週間の自発走運動による筋線維の遅筋化が抑制された. 一方で, MEF2C の筋特異的欠損マウスでは type I 線維の減少が認められ, MEF2C の Tg マウスでは, 遅筋線維数および TnI slow やミオグロビンの遺伝子発現, ミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク cytochrome *c* のタンパク発現の増加, さらに最大トレッドミル運動時の運動時間および走行距離の延長が認められた (Potthoff et al. 2007). 以上のことから, HDAC を介した MEF2 の転写活性の抑制解除も, 持久性運動による筋線維の遅筋化において重要なシグナル経路であると考えられる

PGC-1 $\alpha$  の Tg マウスでは, 持久性運動により得られる多くの表現型を模倣するため, 持久性運動に伴う骨格筋適応を担う主要な分子であることが推察される. 急性運動や運動トレーニングは PGC-1 $\alpha$  の mRNA およびタンパク発現を増加させる (Baar et al. 2002, Pilegaard et al. 2003, Russell et al. 2003). 骨格筋特異的 PGC-1 $\alpha$  欠損マウス (Myogenin-Cre; PGC-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ) を用いた loss-of-function 解析から, 持久性運動によるミトコンドリア新生および毛細血管新生が抑制された一方, 筋線維の遅筋化は正常に誘導されたことが示された (Geng et al. 2010). このことは, PGC-1 $\alpha$  による転写調節は, 筋線維の遅筋化に十分ではあるが, 必ずしも必要

ではないことを示唆する。

PGC-1 $\alpha$ に関連する一連の研究から、PGC-1 $\alpha$ はミトコンドリア新生において中心的な役割を担うことが示唆された。そこで、PGC-1 $\alpha$ の発現を制御するシグナル経路に関する研究も発展し、calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)、AMP-activated protein kinase (AMPK) などがその候補として解析されている。CaMKはカルシウムシグナルのイニシエーターであり、calcineurinやNFAT/MEF2シグナルを活性化する (Olson et al. 2000)。CaMKには複数のアイソフォームが存在し、速筋においてアイソフォームの1つであるCaMK IVを恒常的に活性化させると、ミトコンドリア新生の亢進とtype I, type IIa線維の増加が認められた (Wu et al. 2002)。またCa<sup>2+</sup>は、CaMK活性に依存してPGC-1 $\alpha$ のタンパク発現を増加させることから、CaMKとPGC-1 $\alpha$ の機能的関連性が示された (Ojuka et al. 2003)。しかしながら、CaMK IVを筋特異的に欠損したマウスでは、筋収縮活動に伴うPGC-1 $\alpha$ のmRNA発現に差は認められず、4週間の自発走運動によるMyHC IIaやPGC-1 $\alpha$ 、COX IVのタンパク発現もWTマウスと同様に増加したことが報告された (Akimoto et al. 2004)。さらに、CaMK IVはその他のアイソフォームと異なり、骨格筋において発現を確認することができなかった。以上の結果から、CaMK IVは、持久性運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生には影響しないことが示唆された (Akimoto et al. 2004)。

AMPK は、真核細胞においてメタボリックセンサーとして機能し、エネルギーの枯渇を感知することでそのシグナル経路を活性化する (Hardie et al. 2012). また、骨格筋収縮に伴うインスリン非依存的なグルコース取り込みに中心的な役割を担う分子としても注目されている (Sakamoto et al. 2005). AMPK は、触媒サブユニット  $\alpha$  および調節サブユニットの  $\beta$ ,  $\gamma$  より構成される. クレアチンアナログである  $\beta$ -グアニジノプロパン酸 (GPA) 処理により誘導される持久性運動を模倣する慢性的な ATP の枯渇は、PGC-1 $\alpha$  と cytochrome *c* のタンパク発現を増加させるが、これらの増加は AMPK の正常な働きが阻害された dominant-negative AMPK $\alpha$ 2 を過剰発現する Tg マウスにおいて抑制された. すなわち、AMPK は、エネルギー枯渇による PGC-1 $\alpha$  の発現増加およびミトコンドリア新生に必須の分子である可能性が示唆された (Zong et al. 2002). 一方で、同じく dominant-negative AMPK $\alpha$ 2 の Tg マウスを用いた検討において、6 週間の自発的な回転輪運動による PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現の増加およびミトコンドリア関連酵素活性の増加は正常に誘導されるが、MyHC IIa/x タンパクの発現増加が抑制されたことが確認された (Rockl et al. 2007). これらの結果は、AMPK が持久性運動トレーニングによる筋線維の遅筋化に必須であるものの、ミトコンドリア新生に関してはそうでない可能性が示唆された.



### 3 持久性運動による毛細血管新生とその調節

毛細血管新生は、発生や腫瘍、虚血に対する代償適応、脂肪細胞の肥大等、様々なコンテキストにおいて重要な役割を担うため、それらの基礎的なメカニズムの理解や効果的な治療薬の開発のために多くの検討が行われてきた (Carmeliet et al. 2011, Cao 2013).

新たな毛細血管ネットワークを再構築するためには、通常は静止状態にある血管内皮細胞の遊走や増殖、血管内皮細胞内での tip cell および stalk cell の形成、平滑筋細胞や周皮細胞（ペリサイト）の離脱や再成熟等、様々なプロセスを経る必要がある。

血管新生は、既存の静止状態にある内皮細胞が、血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) といった成長因子の濃度勾配に従い遊走することより始まる。VEGF ヘテロ欠損マウスにおいて血管発生 (Vasculogenesis) および血管新生の異常が認められ、胎生期 11~12 日目に致死となることから、血管新生は発生に重要であることが示唆された (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996).

血管内皮細胞に対して VEGF が作用するためには、VEGF 受容体 (VEGF receptor: VEGFR) への結合が必須である。VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C) および VEGF 受容体 (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) にはそれぞれサブファミリーが存在する。VEGF-A は血管内皮細胞の VEGFR2 に結合し、内皮細胞の増殖や遊走を惹起し血管新生を促進する。同じく VEGF-B

は、血管内皮細胞の VEGFR1 へ結合するが、脂質輸送タンパクの発現調節を介して、血液中から組織への内皮細胞を通した脂質輸送を調節することが明らかにされている (Hagberg et al. 2010, Mehlem et al. 2016). 一方で、VEGF-C は、主にリンパ管内皮細胞に存在する VEGFR3 に結合し、リンパ管のリモデリングに関与する (Nurmi et al. 2015).

血管新生時に出芽、伸長する内皮細胞は、その挙動から 2 つの細胞群に区別される。成長因子の濃度勾配に従って糸状仮足を伸ばし、先頭に立って移動する細胞は tip 細胞と呼ばれ、その伸長する tip 細胞をサポートするために増殖する細胞を stalk 細胞という (Herbert et al. 2011). これら細胞群の運命決定には、Notch シグナルによる側方抑制が重要であることが明らかにされている (Roca et al. 2007). VEGF シグナルが活性化された内皮細胞では、Notch シグナルのリガンドである delta-like 4 (DLL4) の転写が増加する。DLL4 は tip 細胞の細胞膜へ局在し、隣接する内皮細胞の Notch と相互作用することで、Notch シグナルの細胞内リガンドである Notch intracellular domain (NICD) を細胞膜から細胞内へ放出させる。NICD は VEGFR の発現を抑制し、Notch-regulated ankyrin repeat containing protein (NRARP) の発現を増加させ、Wnt シグナルを活性化することで細胞増殖を活発にする (Hellstrom et al. 2007, Leslie et al. 2007, Lobov et al. 2007, Suchting et al. 2007). 近年の研究から、この tip 細胞と stalk 細胞は血管新生時において、ダイナミックに入れ替わり伸長していくことも明らかにされ

ている (Cruys et al. 2016).

骨格筋では、持久性運動による交感神経入力や、活動筋でのエネルギーの枯渇・虚血などの刺激およびエネルギー・酸素の需要に応じて、VEGF などの成長因子が分泌され、既存の毛細血管の内皮細胞を刺激することで内皮細胞が出芽し、新たな毛細血管ネットワークが再構築される (Gute et al. 1996, Waters et al. 2004, Delavar et al. 2014). Breen らは、ラットに対するトレッドミルを用いた急性運動 (1 時間, 15 または 20 m/min, 傾斜 10°C) 後に腓腹筋を摘出し、血管新生を促進する成長因子の mRNA の発現をノザンブロットにより定量した. 急性運動直後において VEGF, トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) の発現が増加し、運動 2 時間後においても VEGF, TGF- $\beta$  の発現の増加は維持され、24 時間後では運動前のレベルまで戻ることが示された (Breen et al. 1996). マウスを用いた逆遺伝学的手法から、骨格筋特異的 VEGF 欠損マウス (Ckmm-Cre; VEGF<sup>fl/fl</sup> マウス) では、VEGFR1 および VEGFR2 発現の低下、および 6 週間のトレッドミル運動トレーニングによる毛細血管新生が抑制されたことから、運動誘発性血管新生において骨格筋の VEGF は必須であることが示された (Olfert et al. 2010, Delavar et al. 2014). さらに、VEGF の発現を制御する詳細なメカニズムの検討が、VEGF の転写制御を中心に行われた.

継続的な持久性運動に伴う筋活動により骨格筋は虚血に陥る。この運動による虚血の程度は、低酸素誘導性因子 hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) を活性化するのに十分であることが報告されている (Richardson et al. 1995)。加えて、HIF-1 $\alpha$  は VEGF のプロモーター領域に結合し、その発現を増加させることから (Forsythe et al. 1996, Ferrara et al. 2003)、骨格筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウス (Ckmm-Cre; HIF-1 $\alpha^{\text{fl/fl}}$ ) を用いて運動誘発性血管新生の解析が行われた。しかしながら、これらのマウスにおける運動後の毛細血管数/筋線維数の比率は、WT マウスと比較して減少せず、むしろ増加することが示された (Mason et al. 2007)。

同様に、PGC-1 $\alpha$  も VEGF のプロモーターに結合し、転写を活性化する転写コアクチベーターであることが報告されている (Arany et al. 2008)。HIF-1 $\alpha$  と同じく低酸素に応答し、エストロゲン関連受容体  $\alpha$  (Estrogen related receptor  $\alpha$ : ERR $\alpha$ ) と共役することで VEGF の転写を活性化する (Arany et al. 2008)。PGC-1 $\alpha$  の Tg マウスでは毛細血管数が顕著に増加し、PGC-1 $\alpha$  欠損マウスでは下肢虚血による血流回復速度が遅延したことや、持久性運動トレーニングによる VEGF のタンパク発現の増加が抑制された (Arany et al. 2008, Leick et al. 2009)。これらのことから、PGC-1 $\alpha$  は運動誘発性血管新生において中心的な役割を担う分子である可能性が示唆された。実際に、MEF2C エンハンサーと myogenin プロモーターにドライブされる Cre マウスと PGC-1 $\alpha^{\text{fllox}}$  マウスとの交配により得られた骨格筋特異的な PGC-1 $\alpha$  欠損マウ

スでは、4 週間の自発走運動による毛細血管新生が抑制された (Chinsomboon et al. 2009).

PGC-1 $\alpha$  および VEGF の発現の増加は、 $\beta 2$  アドレナリン受容体のアゴニストであるクレンブテロールにより誘導され、これらの増加は PGC-1 $\alpha$  ならびに ERR $\alpha$ , それぞれの欠損マウスにおいて抑制された. さらに, ERR $\alpha$  欠損マウスにおいて運動誘発性血管新生は抑制されたことから,  $\beta$  アドレナリン刺激による PGC-1 $\alpha$  の発現増加, PGC-1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  の共役による VEGF の転写活性の増加が, 運動誘発性血管新生において必須のシグナル経路であることが示された. 異なるグループからも, 骨格筋特異的 PGC-1 $\alpha$  欠損マウスにおいて, 持久性運動による血管新生が抑制されたことが報告され, 運動誘発性血管新生における PGC-1 $\alpha$  の重要性が強調された (Geng et al. 2010).

## 第2節 マイクロ RNA による骨格筋および血管の制御

### 1 マイクロ RNA とその機能

1993 年に, 線虫 *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) の発生に重要な Lin-14 タンパク質の発現が, その非翻訳領域 (3'UTR) 依存的に lin-4 という遺伝子に調節されていることが2つの研究グループから報告された (Lee et al. 1993, Wightman et al. 1993). Lee らは, lin-4 がタンパク質をコードしない遺伝子であり, ステムループ様構造を持つ 61 塩基の RNA と 22 塩

基の一本鎖 RNA (small RNA) を作り出していることを見出した。この一本鎖 RNA は、Lin-14 の 3'UTR の複数の領域に相補的な配列を持つことから、Lin-14 のタンパク発現は、lin-14 の 3'UTR と lin-4 から産出される 22 塩基の一本鎖 RNA の直接的な塩基対合を介した相互作用により調節されている可能性が示唆された (Lee et al. 1993)。Wightman らは、lin-4 から産生される small RNA による Lin-14 のタンパク発現の調節時には、Lin-14 mRNA レベルでは変化がないことから、この small RNA は Lin-14 タンパクの翻訳に影響する可能性を示唆している (Wightman et al. 1993)。アンチセンス RNA による mRNA の安定性および翻訳への影響については、1980 年代より複数の報告があった (Simons 1988)。この 2 つの独立したグループから発表されたタンパク質をコードしない RNA (ノンコーディング RNA) の存在は、その後の研究の発展によりマイクロ RNA (microRNA: miRNA) と名付けられ、マイクロ RNA を含むノンコーディング RNA による転写後調節等の遺伝子発現調節は様々な生物学的プロセスにおいて中心的な役割を担っていることが明らかにされている。

マイクロ RNA は、タンパク質をコードしない、約 22 塩基の一本鎖 RNA であり、mRNA の分解や翻訳の抑制といった転写後調節により遺伝子の発現を負に制御する (Bartel 2004)。また、マイクロ RNA は植物から哺乳類に至るまで進化的に保存されているものが多数であり (Hamilton et al. 1999, Reinhart et al. 2000)、その標的となる遺伝子は全遺伝子の 3 分の 1 に

ものぼることがバイオインフォマティクス解析より示唆されている (Farh et al. 2005). 約 22 塩基の内, 2 塩基目から 8 塩基目までがシード配列と呼ばれ, この配列が標的とする mRNA の 3'UTR と相補的な配列を持ち, 遺伝子発現を調節する上で重要な役割を担う (Lewis et al. 2003, Rajewsky et al. 2004). マイクロ RNA による遺伝子の翻訳抑制については, いくつかの異なるメカニズムが関与することが明らかにされており, 未だ議論の余地もある. 現在では, mRNA の脱アデニル化による安定性の低下およびそれに伴う分解が, マイクロ RNA による mRNA の翻訳抑制に伴うタンパク発現減少のメカニズムの大多数を占めるとされ (80%以上), mRNA の発現レベルの変化を伴わない翻訳開始の阻害および翻訳干渉については少数である可能性が示唆されている (Back et al. 2008, Guo et al. 2010).

マイクロ RNA は, RNA ポリメラーゼ II (RNA polymerize II: Pol II) および様々な転写因子により, primary-miRNA (pri-miRNA) として転写される. pri-miRNA は, 1kb 以上の長鎖 RNA でありマイクロ RNA を含むステムループ様構造を有する. これら pri-miRNA から, 核内のリボヌクレアーゼ III である Drosha を中心とするタンパク質複合体によりマイクロ RNA を含むステムループ様構造が切り取られ, precursor-miRNA (pre-miRNA) と呼ばれる 65 塩基程度のヘアピン構造の二本鎖 RNA が生成される (Lee et al. 2003). Drosha は分子量約 160kDa のタンパク質であり, 二本鎖 RNA に特異的に作用するエンドヌクレアーゼであ

る。また Drosha は、補因子である DGCR8 とマイクロプロセッサーと呼ばれるタンパク質複合体を形成することでその作用を発揮する (Denli et al. 2004)。Drosha がヌクレアーゼ活性により pre-miRNA をプロセッシングするのに対し、DGCR8 は 2 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (double-stranded RNA-binding domain: dsRBD) を持ち、pri-miRNA を認識する役割を担う (Han et al. 2006)。Drosha および DGCR8 のそれぞれのコンベンショナル KO マウスは胎生致死であることから、これらマイクロプロセッサーを介したマイクロ RNA の生合成が胚発生に必須であることが示唆される (Wang et al. 2007, Chong et al. 2010)。

核内でプロセッシングを受けた pre-miRNA は、細胞質へ輸送される。この pre-miRNA の細胞質への輸送において、重要な役割を担うと考えられている分子は Exportin 5 である。Exportin 5 は、核外輸送タンパクである Ran-GTP タンパク質と複合体を形成し、pre-miRNA を細胞質へ輸送する (Yi et al. 2003)。長い間、Exportin 5 は pre-miRNA の輸送において中心的なタンパク質であると考えられていたが、近年、Exportin 5 を KO した細胞において、マイクロ RNA の発現への影響は僅かであったことから、Exportin 5 はマイクロ RNA の生合成において必須の分子ではない可能性が示唆された (Kim et al. 2016)。このことから、Exportin 5 に取って代わる pre-miRNA 輸送タンパクが存在する可能性があり、今後の研究の発展が待たれる。



細胞質へ輸送されたヘアピン構造の pre-miRNA は、細胞質のリボヌクレアーゼである Dicer によってそのループ構造が取り除かれ、二本鎖 RNA へプロセシングされる (Bernstein et al. 2001). Dicer は、Dicer 結合ドメインと二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) を有する補因子である TAR RNA-binding protein (TRBP) と相互作用し、その機能を発揮する (Chendrimada et al. 2005). エンドヌクレアーゼである Dicer の C 末端側には、2 つの RNase III domain (RNase III domain a および RNase III domain b) が存在し、RNase III domain a は pre-miRNA の 3'側、RNase III domain b は 5'側をそれぞれ切断する. Dicer によるプロセシングを受けたマイクロ RNA は、Argonaute (Ago) タンパク質へロードされ、RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) と呼ばれるタンパク質複合体を形成する (Hammond et al. 2001). RISC は標的とする mRNA の 3'UTR に存在する相補的配列へ、マイクロ RNA のシード配列を介して結合し、翻訳を阻害する (図 2).

ほぼ全ての成熟マイクロ RNA のプロセシングには Dicer が必要であると考えられているが、極僅かかつ特定のマイクロ RNA は Dicer 非依存的に生成されることも報告されている. Ago2 欠損マウスでは、赤血球生成の破綻により貧血が誘導され、生後間もなく死に至ることが報告された (Cheloufi et al. 2010). この表現型の原因とされたのが miR-451 であり、miR-451 の成熟には、Dicer によるプロセシングは必要でなく、ヘアピン構造を持つ pre-miRNA

の状態で Ago2 へロードされる。Ago2 へロードされた pre-miR-451 は、Ago2 の PIWI ドメインに存在する RNase H のエンドヌクレアーゼ活性の触媒により二本鎖の 3'側が切断され、5'側が Ago2 中に残されることで、RISC としてその機能を発揮することが明らかにされた (Cheloufi et al. 2010, Cifuentes et al. 2010, Yang et al. 2010)。

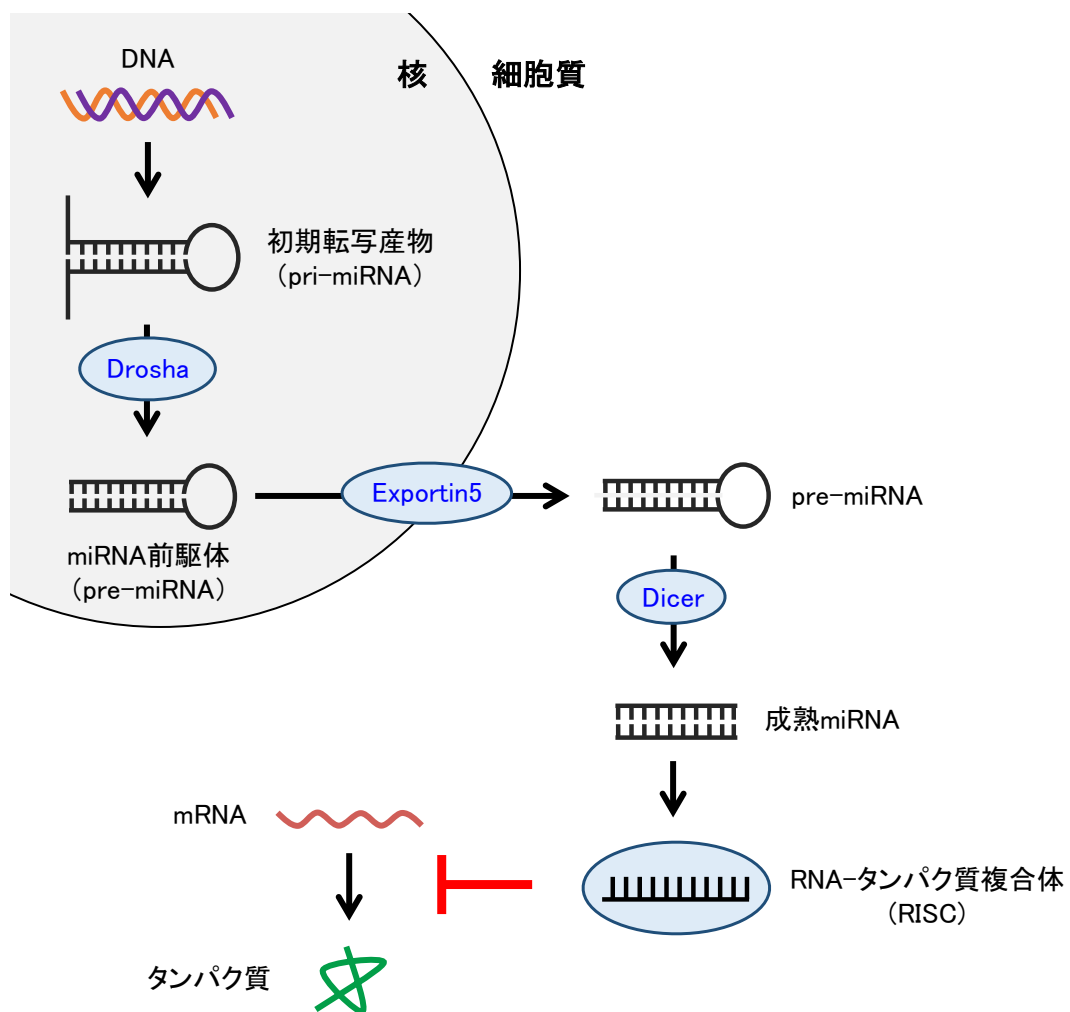


図2 マイクロRNA生合成経路

## 2 マイクロ RNA による骨格筋の代謝収縮特性の制御

骨格筋におけるマイクロ RNA は、筋線維組成およびミトコンドリア量を決定する転写因子ならびにそれらが標的とする遺伝子群を調節することで、骨格筋の代謝収縮特性の決定およびその可塑性制御において重要な役割を担うことが明らかにされている。

骨格筋特異的 Dicer 欠損マウス (MyoD-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>) は、筋の形成不全ならびにアポトーシスの亢進が認められ、胎生致死に至ることから、発生期における骨格筋の形成に Dicer を介したマイクロ RNA の生合成は必須であることが示された (O'Rourke et al. 2007). miR-1 および miR-133a は心筋および骨格筋特異的に発現するマイクロ RNA クラスターであり、これらの miRNA は、それぞれ 18 番染色体の Mindbomb のイントロンに pre-miR-1-2 および pre-miR-133a-1 が、2 番染色体に pre-miR-1-1 および pre-miR-133a-2 がコードされている (Zhao et al. 2005, Chen et al. 2006). これらのマイクロ RNA の発現は、MyoD や Myogenin といった筋原性制御因子 (Myogenic regulatory factor: MRF) や、血清応答因子 (Serum response factor: SRF), MEF2 により制御され、筋芽細胞の増殖や分化に重要であることも明らかにされている (Rao et al. 2006, Liu et al. 2007). miR-133a-1/-2 二重欠損マウス (double knockout: DKO) では、遅筋優位なヒラメ筋において type I 線維および metachromatic ATPase 活性が増加し、MyHC I タンパク発現も増加した。一方で、腓腹筋の遅筋部位と速筋部位のそれぞれ

のミトコンドリアの酸素消費率 (OCR) が有意に低下したことから、ミトコンドリア機能の異常が確認された (Liu et al. 2011). この DKO マウスは、中心核性ミオパチーの病態を示すことも報告され、これらの病態はミトコンドリア機能異常と関連することが示唆されている (Naumann et al. 1995, Jongpiputvanich et al. 2005). また、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy: DMD) を含む筋疾患において、筋保護的メカニズムから遅筋線維の増加が起こることも報告されている (Wang et al. 1999). 以上のことから、miR-133a-1/-2 DKO マウスにおいて観察された代謝収縮特性の変化は、中心核性ミオパチーにより惹起される二次的な結果である可能性が推察された. miR-133a とは対照的に、miR-1 欠損マウスは心臓の形成不全により胎生致死となるものの、骨格筋の異常は観察されず、このことには miR-1 ファミリーに属する miR-206 に代償された可能性が指摘されている (Zhao et al. 2007, Heidersbach et al. 2013). miR-206 は miR-133b とクラスターを形成し、その転写活性は miR-1/133a クラスターと同様、MyoD などの筋分化に関連する転写因子に依存するため、筋特異的に発現する (Rao et al. 2006, Sweetman et al. 2008). miR-1 と miR-206, miR-133a と miR-133b は、それぞれ 4 塩基、1 塩基異なるが、同様のシード配列を有することから、miR-1 の欠損は miR-206 の発現により代償された可能性が指摘された. 一方 miR-206/133b の DKO マウスにおいては、筋線維組成や筋線維サイズ、筋再生を含むいずれの表現型も観察され

ず、これらもまた miR-1/133a クラスターの発現により代償されたものと推察されている (Boettger et al. 2014).

miR-208b および miR-499 は、それぞれ  $\beta$  Myosin heavy chain (Myh6) および Myosin heavy chain 7b (MyH7b) のイントロンに存在するマイクロ RNA である。これらの発現は、その宿主遺伝子の発現パターンと一致して、遅筋線維に豊富に発現することが確認された (van Rooij et al. 2009)。Myh6 の mRNA の転写を抑制するプロピルチオウラシル (propylthiouracil: PTU) の処理により、Myh6 mRNA 発現の減少と呼応して、miR-208b の発現レベルも減少したことから、miR-208b の発現レベルは、その宿主遺伝子の発現パターンと一致することが示された。さらに、これらのマイクロ RNA の機能を解析するため、それぞれのマイクロ RNA のコンベンショナル KO マウス、DKO マウスおよび骨格筋特異的 miR-499 Tg (MCK-miR-499 Tg) マウスが作出された。DKO マウスにおいては、遅筋および速筋における type I 線維の低下が認められ、MCK-miR-499 Tg マウスにおいては遅筋、速筋における Myh6、Myh7b およびトロポニン 1 (Troponins 1: TnnI1) といった遅筋関連遺伝子の発現増加ならびに速筋関連遺伝子であるトロポニン 2 (TnnI2) およびトロポニン 3 (TnnT3) の発現低下が認められた。これらの結果から、miR-208b および miR-499 は、その宿主遺伝子である Myh6 および Myh7b の発現を含む筋線維組成をコントロールするマイクロ RNA であることが示

された。これらのマイクロ RNA は、Myh6 の発現を抑制することが報告されている転写因子である Sox6, Pur $\beta$ , Sp3 を標的とすることも明らかにされた (Hagiwara et al. 2005, Azakie et al. 2006, Hagiwara et al. 2007, Ji et al. 2007)。これら一連の検討から、miR-208b および miR-499 は正常な筋線維タイプの構成に必要なマイクロ RNA であり、ミオシン、マイクロ RNA およびそれらの抑制因子はフィードバックループを構成することが示された。さらに、筋線維タイプの遅筋化が認められた MCK-miR-499 Tg マウスを用いて骨格筋の代謝特性の解析も行われた。これらのマウスでは、トレッドミルによる最大運動負荷試験時の走行時間および走行距離の延長が認められ (Gan et al. 2013)、運動時の呼吸交換比 (Respiratory exchange ratio: RER) が顕著に低いことから、エネルギー基質として脂質を用いた代謝が亢進していることが示された (Liu et al. 2016)。さらに、MCK-miR-499 Tg マウスの骨格筋における網羅的な遺伝子発現解析および Gene ontology 解析から、ミトコンドリアに関連する遺伝子群が発現変動遺伝子群として同定された。Real-time PCR ならびにウエスタンブロットにより、核およびミトコンドリア DNA にコードされるミトコンドリア関連遺伝子群の発現増加が確認され、腓腹筋の組織切片での ATPase 活性、SDH 活性の増加も確認されたことから、ミトコンドリア量および活性の増加が示唆された。そのメカニズムについて、AMPK との相互作用タンパクである folliculin-interacting protein-1 (Fnip1) の抑制による AMPK-PGC-1 $\alpha$  シ

グナルの活性化が寄与し (Baba et al. 2006, Reyes et al. 2015, Hasumi et al. 2016), MCK-miR-499 Tg/筋特異的 PGC-1 $\alpha$  欠損マウスではミトコンドリア関連遺伝子群の発現上昇および SDH 活性の増加は抑制されたことから, miR-499 の過剰発現による代謝機能亢進には Fnip1-AMPK-PGC-1 $\alpha$  経路が重要であることが示唆された.

miR-23a は, miR-23a~27a~24-2 クラスターに属するマイクロ RNA であり, 速筋と比較して遅筋で発現が高いことから, 遅筋優位に発現するマイクロ RNA として報告された (Wada et al. 2011). Wang らは, Myh1 (MyHC IIx), Myh2 (MyHC IIa), Myh4 (MyHC IIb) のそれぞれの 3'UTR に miR-23a の結合部位があることを見出し, 実際にこれらの遺伝子は miR-23a により翻訳抑制されることをレポーターアッセイにより確認した (Wang et al. 2012). また, C2C12 筋芽細胞への miR-23a のトランスフェクションにより筋管細胞への分化が抑制されることも示された. miR-23a は, PGC-1 $\alpha$  の 3'UTR にも複数の結合サイトを持つことが明らかにされ, miR-23a Tg マウスの遅筋優位なヒラメ筋において, PGC-1 $\alpha$  およびミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパクである Cyt c および COX IV のタンパク発現が減少したことが報告された (Russell et al. 2013, Wada et al. 2015). さらに, これらのマウスではヒラメ筋における type IId/x 線維の割合が減少したことが示された. miR-149 は, poly (ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) の発現を調節することで細胞内 NAD<sup>+</sup>レベルを増加させる. これに

伴うヒストン脱アセチル化酵素 Sirtuin1 (SIRT1) の活性化により, miR-499 や miR-23a と同じく PGC-1 $\alpha$  を介してミトコンドリア量および活性を制御することが報告された (Mohamed et al. 2014).

これまでミトコンドリア量ならびに活性を調節するとされるマイクロ RNA の多くが, ミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターとされる PGC-1 $\alpha$  を介したシグナルによるものであり, 直接的にミトコンドリア関連遺伝子群を標的とし, 機能的であるとされるマイクロ RNA に関する報告は少ない. その中でも, miR-1 は筋分化過程においてミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子の翻訳を促進するという, 興味深い研究がなされた. まず初めに Zhang らは, NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1) や Cytochrome c oxidase subunit I (COXI) といったミトコンドリア DNA にコードされた遺伝子のタンパク発現は筋分化に伴い徐々に発現が増加する一方, ミトコンドリア DNA のコピー数およびそれらの mRNA の発現変動が認められないことを示した. このことから, ND1 および COXI のタンパク発現増加においては, 何らかの因子が転写後調節メカニズムによりその翻訳を促進している可能性が示唆された. 驚くべきことに, 一般的にマイクロ RNA は mRNA の 3'UTR に結合することで遺伝子発現を負に制御するが, miR-1 と Ago2 の複合体はミトコンドリア内に局在し, ND1 ならびに COXI の 3'UTR 依存的に翻訳を促進することが示された (Zhang



et al. 2014). マイクロ RNA が翻訳を促進するメカニズムについては不明ではあるが、細胞質におけるマイクロ RNA の機能とミトコンドリア内における機能は、根本的に役割が異なる可能性が示唆された。

### 3 持久性運動によるマイクロ RNA の発現変動

マイクロ RNA は、骨格筋の収縮・代謝特性に対し、生理的インパクトを持つことが明らかにされてきた。一方で持久性運動は、骨格筋において、筋線維の遅筋化やミトコンドリア新生、毛細血管新生等のダイナミックな適応を惹起し、これらの適応には、NFAT や PGC-1 $\alpha$  といった分子による転写制御が重要であることが明らかにされてきた (Chin et al. 1998, Wu et al. 2001, Lin et al. 2002)。マイクロ RNA は、これら転写制御に関する遺伝子群を標的とすることから、運動によるこれらの遺伝子群の発現変動がマイクロ RNA により調節を受けている可能性が推察される。そのため、持久性運動によるマイクロ RNA の発現変動は、運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA を介した転写後調節の役割を理解する上で、貴重なデータとなることが期待される。

2009 年に Safdar らは、15 m/min, 90 分間の急性トレッドミル運動 (15 m/min) により、マウスの大腿四頭筋における miR-23a の発現が減少し、miR-107, miR-1, miR-108 の発現が

増加したことを示した。さらに、miR-23a の減少は PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現の増加と負の相関関係にあることも示した (Safdar et al. 2009)。MiR-23a は、PGC-1 $\alpha$  の 3'UTR へ結合し、PGC-1 $\alpha$  mRNA の発現量に影響はないものの、そのタンパク発現を減少させたことから、タンパクへの翻訳抑制を介して PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現を調節することが報告された (Wada et al. 2011, Russell et al. 2013, Wada et al. 2015)。2010 年には、Aoi らが、週 4 回、4 週間のトレッドミルを用いた持久性運動トレーニングにより、マウスの腓腹筋における miR-21 の発現が増加し、miR-696, miR-709, miR-720 の発現が減少したことを報告した (Aoi et al. 2010)。miR-696 の減少は、PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現の増加と負の相関関係を示し、C2C12 への miR-696 の模倣体のトランスフェクションにより PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現が減少したことを示した。さらに PGC-1 $\alpha$  の発現低下に伴い、その下流に位置する酵素である pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4), およびミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する cytochrome c oxidase subunit II (COX II) の発現が減少したことを示した。miR-23a, miR-696 と同様、miR-761 も持久性運動により減少することが報告されたマイクロ RNA の 1 つである。トレッドミルを用いた 4 週間の持久性運動トレーニング (週 5 日) により、マウスの腓腹筋の miR-761 の発現が減少し、PGC-1 $\alpha$  を直接のターゲットとして制御することがルシフェラーゼレポーターアッセイにより確認された (Xu et al. 2015)。同時に、miR-761 の模倣体のトランスフェクションに

よって、PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現に変動はないものの、タンパク発現が減少したことから、mRNA からタンパク質への翻訳抑制を介して PGC-1 $\alpha$  の発現を調節する可能性が示唆された (Xu et al. 2015). 同じくマウスを用いた検討から、回転輪を用いた 8 週間の自発走運動後に、腓腹筋の miR-494 および miR-696 の発現が減少することや (Sun et al. 2016), トレッドミルによる 3 時間の急性運動により前脛骨筋における pri-miR-133a-1, pri-miR-133a-2 および miR-133a の発現が増加すること、6 週間の持久性運動トレーニングによりこれらのマイクロ RNA の発現が増加することが示された (Nie et al. 2016).

運動によるマイクロ RNA の発現変動については、ヒトを対象とした検討も行われている。運動習慣の無い健康な成人男性を対象とし、60 分間 (70%  $\dot{V}O_{2peak}$ ) のエルゴメーターを用いた一過性運動負荷 3 時間後において、外側広筋におけるマイクロ RNA 生合成に関連する Drosha, Exportin 5, Dicer の mRNA 発現が運動前と比較して増加し、筋に豊富に存在する miR-1, miR-133a, miR-133b の発現も増加したことが示された。加えて、miR-9, miR-23a, miR-23b, miR-31 の発現が運動 3 時間後に減少し、miR-181a の発現増加が確認された。さらに、10 日間のエルゴメーターを用いた持久性運動トレーニング後においては、miR-1 および miR-133b の発現は有意に増加したが、miR-133a の発現は有意な変動は認められなかった。同じく筋に豊富に存在するマイクロ RNA である miR-206 は、一過性運動および 10 日間の持久性運

動トレーニングにより影響を受けなかった (Russell et al. 2013). バイオインフォマティクス解析によりマイクロ RNA の標的候補を予測したところ、これらの持久性運動により変動したマイクロ RNA は、NRF1, MFN1/2, HDAC4, FOXO1 などの運動による骨格筋適応に関与することが報告されている分子を標的とすることが見出された. これらマイクロ RNA の発現変動と、標的と予想されたタンパク発現の変動の相関関係を解析すると、eIF4e と miR-1 については正の相関関係が、HDAC4 と miR-9, miR31, NRF1 と miR-31 についてはいずれも負の相関関係が示された. miR-31 は HDAC4 および NRF1 といずれも負の相関関係を示したことから、miR-31 がこれらの分子を直接的に制御し得るかについて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価したところ、HDAC4 および NRF1 の 3'UTR 依存的にレポーター活性を抑制したことが確認された. また異なるグループから、成人男性 23 名、成人女性 2 名の被験者において、自重の 30%の重さの負荷を与えながら 90 分間のトレッドミルランニングを行なった直後において、miR-1-3p, miR-206, miR-208a-5p, miR-499 の発現は、いずれも有意に減少したことが示された (Margolis et al. 2017). また、miR-206 および miR-499 の減少は、放射性同位体である <sup>3</sup>H-phenylalanine により評価された筋タンパク合成率と負の相関関係を示したことから、これらマイクロ RNA の発現低下は、タンパク合成の促進と関連する可能性が示唆された (Margolis et al. 2017).

このように、様々な持久性運動により骨格筋組織中のマイクロ RNA の発現が変動することが報告されている。また、これらの研究において観察されたマイクロ RNA の発現変動は、持久性運動による骨格筋適応に重要な分子である PGC-1 $\alpha$  等と相関関係を示すことも報告されている。これらのことは、運動による骨格筋適応に関与する分子の発現変動が、マイクロ RNA による転写後調節により制御されている可能性を示唆するものである。運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割について、その関連性を真に明らかにするためには、骨格筋における個々のマイクロ RNA または全てのマイクロ RNA をグローバルに欠損させ、その因果関係を証明する必要がある。また、miR-133a については、マウスにおいて急性運動後に増加することが報告されている一方、ヒトの検討においてはその発現が減少するなど、一致した見解が得られていない。これらの矛盾した結果には、対象の違いや、研究毎の異なる運動様式、時間、測定ポイントなどが影響している可能性が推察される。

#### 4 マイクロ RNA による毛細血管新生の制御

毛細血管新生は、持久性運動による骨格筋適応のみならず、がんや創傷治癒、発生や心臓・骨格筋での虚血に対する代償的応答など、様々なコンテキストにおいて重要な役割を担う現象である。マイクロ RNA は、核酸医薬の治療標的として注目されていることもあり、

マイクロ RNA による毛細血管新生の調節およびその制御メカニズムについては、多くの研究が行われている。

マイクロ RNA による毛細血管新生の調節に関する初期の研究では、その関与について概観を得るため、成熟マイクロ RNA のプロセッシングに必須の酵素である Dicer を欠損させ、成熟マイクロ RNA がグローバルに減少したモデルマウス、または細胞を用いた解析が行われた。2005 年に Yang らは、Dicer の exon1 および exon2 を相同組換えによりネオマイシン耐性カセットに置き換える、単純遺伝子破壊によりコンベンショナル KO マウスを作製した。これらのマウスでは、発生の遅延および毛細血管ネットワークの欠陥により E12.5 から E14.5 の間で死に至ることが観察された。さらに、マウス母体と胎児間のガス交換や栄養摂取、血球細胞の産生において重要な役割を担う卵黄囊の毛細血管ネットワークが破綻していることが示された。これらのマウスを用いた詳細な解析から、VEGF 受容体 1 (VEGFR1: flt1) や VEGF 受容体 2 (VEGFR2: kdr) の発現増加、血管内皮細胞の接着分子である Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 (Tie1) の発現低下など、VEGF シグナルおよび細胞接着に関する分子の異常が毛細血管ネットワークの破綻に寄与した可能性が示唆された (Yang et al. 2005)。さらに、ジーントラップ法により、*Dicer1* gene の 24 番目の intron に  $\beta$ -galactosidase-neomycin resistance fusion gene をインサートし、Dicer の発現を欠損

させたマウスでは、女性ホルモンの分泌に関与する卵巣内の黄体が十分に成長せず、その黄体の毛細血管数が顕著に減少していることが示された。これらの原因として、miR-17-5p および let-7b の発現低下、ならびにこれらのマイクロ RNA がターゲットとするマトリクスプロテアーゼである tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) の発現上昇により毛細血管の形成が障害された可能性が示唆され、これらのマイクロ RNA の前駆体を卵巣へ注射することで、毛細血管数が回復したことが確認された (Otsuka et al. 2008)。がん細胞を用いた検討でも、Dicer の欠損によるグローバルなマイクロ RNA の減少は、血管新生を抑制したことが報告された (Fraisl et al. 2009)。非小細胞肺癌細胞における Dicer の欠損は、極度の虚血を惹起するにも関わらず、がん細胞内の毛細血管数および Ki67 陽性細胞により評価された細胞増殖は、顕著に減少していることが示された。このメカニズムとして、HIF-1 $\alpha$  の関与が指摘されている。Dicer の欠損により、VEGF などの血管新生に重要な分子の転写を制御する HIF-response element (HRE) のレポーター活性が低下したことから、HIF-1 $\alpha$  による転写活性が抑制された可能性が示唆された (Fraisl et al. 2009)。この HIF-1 $\alpha$  による転写活性の低下には、HIF-1 $\alpha$  の転写活性を阻害する factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) が関与し、let-7 および miR-125 によりその発現が制御されていることが明らかにされた (Chen et al. 2014)。

VEGF や FGF といった成長因子を産生・分泌するがん細胞や骨格筋細胞のみならず、そ

の刺激を感知し、細胞増殖や遊走により新たな毛細血管ネットワークを再構築する血管内皮細胞の分子シグナルもまた、血管新生において重要な構成要素であると言える (Hamada et al. 2005, Lee et al. 2014, Serra et al. 2015). HUVEC において、siRNA を用いた Dicer のノックダウンは、eNOS のタンパク発現の増加ならびに NO 産生量の増加を示す一方、細胞増殖および血管内皮細胞の管構造形成能の指標である cumulative tube length が減少したことが報告された (Suarez et al. 2007). 同じく HUVEC における Dicer のノックダウンは、Matrigel 上での管構造形成、細胞遊走および細胞生存率を低下させたことが報告された (Kuehbachner et al. 2007). これら in vitro で得られたデータと一致して、Dicer の欠損は in vivo においても血管新生を抑制することが報告されている. Tie2-Cre マウスおよび VE-Cad-Cre<sup>ERT2</sup> マウスと Dicer<sup>flox</sup> マウスの交配により得られた 2 系統の血管内皮特異的 Dicer 欠損マウスにおいて、VEGF 誘導性の血管新生、がん組織内の毛細血管数および腫瘍面積、下肢虚血に対する代償的な血管新生のいずれもが抑制されたことが示された (Suarez et al. 2008). さらに、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスにおいて観察された、様々なコンテキストにおける血管新生の抑制の一部が、miR-17-92 クラスターによる血管新生阻害因子 Thrombospondin 1 (TSP1) の発現増加に起因する可能性が in vitro のデータより示唆された. 一連の Dicer 欠損モデルを用いた検討から、発生やがんにおける Dicer の欠損、および毛細血管ネットワークを形成



する血管内皮細胞における Dicer の欠損は、いずれも毛細血管新生を抑制し、毛細血管ネットワークの破綻を惹起することが示された。Dicer 欠損モデルにおいて観察された表現型のさらなるメカニズムを解明するため、個々のマイクロ RNA と毛細血管新生の関連についての研究も精力的に行われてきた。

miR-126 は、EGF-like domain 7 (Egfl7) のイントロンにコードされ、血管内皮細胞に特異的に発現するマイクロ RNA である (Wang et al. 2008)。この miR-126 を欠失したマウスでは、その胚において、浮腫や出血、網膜における毛細血管エリアの減少など、毛細血管ネットワークの破綻が観察された。発生期のみならず、成体マウスにおいても、大動脈リングより出芽する血管内皮細胞、および心筋梗塞に対する代償的な血管新生が顕著に減少していた。これらのメカニズムの一部として、細胞増殖シグナルである Ras/MAPK シグナルの阻害因子である Sprouty-related protein-1 (Sprd-1) の発現上昇によるものであることが明らかにされた。miR-126 は Sprd-1 の 3'UTR に依存してその発現を抑制し、血管新生を促す機能を有することが明らかにされた。miR-26a は VEGF 刺激により発現が減少し、HUVEC における miR-26a の過剰発現は細胞増殖の抑制を誘導することが報告されている (Icli et al. 2013)。詳細な解析から、miR-26a は BMP/SMAD シグナルを制御することで血管新生を抑制的に調節することが明らかにされた。また、尾静脈注射から miR-26a の模倣体を投与し、miR-26a

を *in vivo* において過剰発現させると、運動誘発性血管新生が抑制されたことが示された。

このように個々のマイクロ RNA の中には、血管新生を促進する作用を有する一方、その逆の作用を有するマイクロ RNA も存在する。これらのことは、マイクロ RNA が相反する作用を有する標的遺伝子を調節することで、その表現型を協調的に制御していることを示唆する。

マイクロ RNA による血管新生の調節においては、単一のマイクロ RNA による調節のみならず、複数のマイクロ RNA が同一の遺伝子座に存在し、初期転写産物である pri-miRNA としてポリシストロニックに転写されるマイクロ RNA クラスターも重要な役割を担うことが報告されている。miR-17-92 クラスターは、典型的なポリシストロニックマイクロ RNA であり、ヒトにおいては、13 番染色体の 800bp 内に miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1 の 6 つのマイクロ RNA がコードされ、それぞれが共通するまたは異なるシード配列を持つ (Mendell 2008)。当初、これらのマイクロ RNA はがん細胞において高発現していることが報告され (Ota et al. 2004, He et al. 2005)、そのコンベンショナル KO マウスでは、胎生致死となる上、肺の形成不全や主な抗体産生細胞である B 細胞の発達の異常が観察された (Ventura et al. 2008)。血管新生においては、大腸がん細胞では抗血管新生因子である TSP-1 および connective tissue growth factor (CTGF) の発現の低下が認められ、miR-17-

92 クラスターに属する 6 つのマイクロ RNA に対するアンリセンスオリゴをトランスフェクションした結果、miR-18 のノックダウンにより CTGF の発現が、miR-19 のノックダウンにより TSP-1 の発現が増加したことが示された (Dews et al. 2006). これらのことは、がん細胞における miR-18 および miR-19 の発現増加は、抗血管新生因子の抑制を介して、がん組織における毛細血管新生を誘導した可能性を示唆する. これらの研究と一致して、miR-17-92 クラスターのうち、miR-17-5p, miR-18, miR-20a の発現は、HUVEC に対する VEGF 刺激により増加し、これらのマイクロ RNA のノックダウンにより細胞密度ならびに細胞数の減少、管構造形成能の低下が誘導された (Suarez et al. 2008). 一方で、同じく miR-17-92 クラスターに属する miR-92a は、血管新生に対して抑制的に作用することも報告されている. HUVEC において、pre-miR-92a のトランスフェクションによる miR-92a の過剰発現は、スフェロイドにおける cumulative sprout length および血管様ネットワークの全長が顕著に減少したことを示した (Bonauer et al. 2009). また、miR-92a の発現レベルは、大腿動脈結紮による下肢虚血時に、顕著に増加し、マイクロ RNA の発現に対して拮抗する一本鎖オリゴである antagomiR-92a の尾静脈を介した in vivo へのトランスフェクションにより、下肢虚血後の血流回復率の上昇および心筋梗塞後の毛細血管新生、心収縮力の指標である  $dP/dt \max$  の増加が認められた. さらに、miR-92a は細胞間接着や細胞遊走に関与する integrin subunits  $\alpha 5$

を標的とすることが明らかにされ、スフェロイドでの miR-92a ノックダウンによる cumulative sprout length の増加は、siRNA による integrin  $\alpha 5$  のノックダウンによりキャンセルされたことが示された (Bonauer et al. 2009). miR-17-92 クラスターの血管新生への関与は、逆遺伝学的手法を用いた解析によっても明らかにされている。VE-Cad-Cre<sup>ERT2</sup> マウスとの交配により得られたタモキシフェン誘導性の血管内皮細胞特異的 miR-17-92 クラスター欠損マウスでは、生後直ぐ (P1~3) のタモキシフェン投与により、網膜における毛細血管エリア、毛細血管の分岐点、長さおよび tip cell の糸状仮足数が減少した (Huang et al. 2002). さらに、VEGF 誘導性の血管新生、腫瘍中の CD31 陽性血管内皮細胞数の顕著な減少も確認された。これらの検討では、シード配列の異なるマイクロ RNA を有する miR-17-92 クラスターの標的遺伝子として、バイオインフォマティクス解析により phosphatase and tensin homolog (PTEN) を同定した。PTEN は、Akt/PI3K シグナル経路のインヒビターであり、PI3K により生成された PIP3 を脱リン酸化することで下流へのシグナル伝達を阻害し、血管新生においては VEGF による Akt/PI3K シグナルの活性化を阻害し、血管新生を抑制する (Huang et al. 2002). このように、ポリシストロニックマイクロ RNA として進化的に保存された miR-17-92 クラスターは、個々または全てのマイクロ RNA が様々な遺伝子を標的とすることで、毛細血管ネットワークの恒常性の維持に寄与していることが伺える。

miR-106b~25 クラスターは、miR-17-92 クラスターのパラログであり、miR-106b, miR-93, miR-25 の3つのマイクロ RNA より構成される (Ventura et al. 2008). miR-93 を過剰発現させたヒト脳腫瘍細胞株 U-87 と血管内皮細胞を共培養すると、内皮細胞の広がり、成長、遊走、管構造形成が増強された (Fang et al. 2011). In vivo においても、pre-miR-93 を骨格筋へインジェクションし過剰発現させることで、毛細血管数の増加および下肢虚血後の血流回復の促進が観察されている (Hazarika et al. 2013). さらに、miR-106b~25 クラスター欠損マウスにおいては、レーザードップラー法により下肢虚血後の血流回復の遅延が観察され、虚血後の毛細血管数も顕著に減少していたことが示された (Semo et al. 2014). 興味深いことに、miR-106b~25 クラスターの発現レベルは、下肢虚血後の骨格筋で増加するが、miR-25 および miR-93 は虚血 21 日後において顕著に増加するのに対し、miR-106b はそのような変化は認められていない (Semo et al. 2014). これらのことは、ポリシストロニックマイクロ RNA として同じ pri-miRNA で転写されるものの、転写後のプロセッシングにより、成熟マイクロ RNA の発現レベルはそれぞれのマイクロ RNA により大きく異なることを示唆する.

miR-23 クラスターは miR-23a クラスター (miR-23a~27a~24-2) と miR-23b クラスター (miR-23b~27b~24-1) の、2つの異なる染色体上に存在するクラスターより構成され、特に血管内皮細胞に豊富に発現するマイクロ RNA であることが報告されている (Zhou et al.

2011). 2007 年に, Kuehbacher らは, 修飾核酸である 2'-O-methyl アンチセンスオリゴヌクレオチドによる miR-27b のノックダウンは, スフェロイドアッセイにおける cumulative sprout length を減少させたことを報告した (Kuehbacher et al. 2007). 続いて Zhou らは, 修飾架橋核酸である locked nucleic acid (LNA) による miR-23/27 のノックダウンは, 細胞増殖シグナルである MAPK-ERK 経路の抑制因子である Sprouty 2 および Semaphorin 6A の増加を介して, HUVEC における増殖・遊走および管構造形成能を抑制することを示された (Zhou et al. 2011). さらに, miR-27b は VEGF 刺激により発現誘導されるマイクロ RNA であり, ゼブラフィッシュおよびマウス大動脈における miR-27b のノックダウンは, Sprouty 2 ならびに Notch シグナルのリガンドである Delta like ligand (Dll4) の発現増加を介して, tip 細胞の運命決定を障害し, 血管内皮細胞の出芽を抑制した (Biyashev et al. 2012). 加えて, miR-27a および miR-27b の阻害は, semaphorin 6A の増加を介して in vitro および in vivo matrigel plug assay における血管新生を抑制したことが示された (Urbich et al. 2012). これらの独立したグループから発表された結果から, miR-27 および miR-23 は, 血管新生を阻害する因子を直接的なターゲットとし, 血管新生を促進するマイクロ RNA であることが推察される. 一方で, miR-24 は, miR-23 クラスターの中で, 血管新生を抑制する作用を持つマイクロ RNA であることが明らかにされている (Zhou et al. 2014). HUVEC における miR-24 の過剰発現は, ス

トレスファイバーならびに葉状仮足形成の抑制および, RhoA 等のアクチン細胞骨格シグナルを抑制することで, 細胞増殖および遊走, 管構造形成を抑制することが示された.

このように, 脊椎動物において進化的に保存されたマイクロ RNA クラスター内のマイクロ RNA は, 異なるシード配列を持ち, 異なる標的遺伝子の発現を調節するものの, 血管新生といった共通の生物学的経路内の分子を協調的にコントロールすることが示唆される.

## 第2章 仮説と目的

これまでにマイクロ RNA は、様々な骨格筋の機能を制御することから、持久性運動による骨格筋適応にも何らかの役割を担う、という仮説のもと、遺伝子改変マウスを用いて持久性運動による筋線維の遅筋化とミトコンドリア新生、毛細血管新生におけるマイクロ RNA の役割を明らかにすることを目的とした。



### 第3章 材料と方法

#### 第1節 動物実験

すべてのマウスは 21℃に保たれた 12 時間明期／12 時間暗期の部屋にて，自由摂食／飲水の条件でケージ飼育した．自発走運動実験では，マウスをランニングホイール(直径 11cm)のついた個別ケージ (15 x 32 cm<sup>2</sup>) で2週間飼育した (Akimoto et al. 2004)．ランニングホイールの回転数をモニターシステムにて計測し (メルクエスト) , CIF3Win Acquisition Software (メルクエスト) にて解析することで走行距離を測定した．マウスは，最後の自発走運動から 24 時間以内に屠殺し，組織サンプルを採取した．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および早稲田大学生物実験管理委員会，遺伝子組換え実験審査委員会の承認を経た上で，東京大学・早稲田大学動物実験実施規則に則って行われた．

#### 第2節 遺伝子欠損マウスの作出

##### 1 骨格筋特異的 Dicer 欠損マウス

骨格筋特異的にマイクロ RNA 合成酵素である Dicer を欠損させるため，Cre-loxP システムを用いた．Ckmm-Cre トランスジェニックマウス (Jackson laboratory) と University of

Florida の Brian Harfe より供与を受けた Dicer<sup>flx</sup> マウス (O'Rourke et al. 2007) の交配により骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスを得た.

## 2 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウス

成熟した骨格筋において Dicer を欠損させるため、タモキシフェン誘導型 Cre 発現マウスである CAG-Cre<sup>ERT2</sup> トランスジェニックマウス (Jackson laboratory) と Dicer<sup>flx</sup> マウスの交配によりタモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスを作製した. Dicer の欠損に当っては, 8 週齢の雄マウスに 5 日間連続で 1mg のタモキシフェンを腹腔内投与した.

## 3 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス

血管内皮細胞特異的に Dicer を欠損させるため、Tie2-Cre マウス (筑波大学生命科学動物資源センター資源開発分野) (Kisanuki et al. 2001) および VE-Cad-Cre マウス (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所実験動物研究資源バンク) (Kogata et al. 2006) を Dicer<sup>flx</sup> マウスと交配させることで血管内皮細胞特異的な Dicer 欠損マウスを作製した.

#### 4 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウス

血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスを作製するため、miR-23 クラスター flox マウス（和田ら、未発表データ）と Tie2-Cre マウスの交配により血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスを作製した。

#### 第3節 蛍光免疫染色による筋組織の解析

摘出した骨格筋は、O.C.T. compound（サクラファインテックジャパン）に包埋し、液体窒素上でシャーベット状になるまで冷却したイソペンタンで凍結し、-80℃で保存した。凍結した組織を凍結マイクローム（Leica）にて、10 μm 厚に薄切し、スライドガラスに貼付した。4%パラホルムアルデヒド／PBS にて固定後、0.3% Titon X／PBS で膜透過処理し、一次抗体を添加後、4℃で一晩インキュベートした。一次抗体（Anti-myosin heavy chain (MyHC) I (BA-F8), IIa (SC-71), IIb (BF-F3) モノクローナル抗体）は University of Iowa の Developmental Studies Hybridoma Bank より入手し、それぞれ 1/25 に希釈して用いた。Anti-Dystrophin (D8043, Sigma), anti-CD31 (MCA2388, AbD serotec) はそれぞれ、1/100 に希釈して用いた。二次抗体は、Anti-mouse IgG2b-Dylight 405 (for MyHC I, Jackson ImmunoResearch laboratories 以下同じ), mouse IgG1-Dylight 488 (for MyHC IIa), mouse IgG1-Dylight 549 (for Dystrophin), mouse

IgM-Dylight 549 (for MyHC IIa), rat IgG-Dylight 488 (for CD31) をそれぞれ 1/100 に希釈して用いた. 抗体の希釈には 5% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch laboratories) を含む PBS を用いた. 画像は, IX-70 蛍光顕微鏡 (Olympus) とデジタルカメラ DS-Ri1 (Nikon) により取得した.

#### 第4節 組織化学染色

O.C.T. compound へ包埋し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した骨格筋切片を用いてコハク酸脱水素酵素染色 (SDH 染色) を行った. 270 mg のコハク酸二ナトリウム (wako), 10 mg のテトラブルーテトラゾリウム (Sigma) を含む 10 ml の PBS (pH 7.6) 溶液中で, 組織切片を貼付したスライドガラスを  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分インキュベートした. 画像は, デジタルカメラ DS-Ri1 (Nikon) により取得した.

#### 第5節 RNA 解析

##### 1 RNA 抽出

動物組織は, RNA 抽出試薬 ISOGEN 2 (wako) 1 ml でホモジナイズしよく懸濁した. 再蒸留水 400  $\mu\text{l}$  を添加し, ボルテックスにより懸濁した. 室温で 10 分放置後, 15 分間 12,000 x

g で遠心した。上清 1 ml を新しいチューブに回収し、等量のイソプロパノールを加えて、よく転倒混和した。室温で 10 分放置後、15 分間 12000 x g で遠心し RNA を沈殿させた。沈殿した RNA ペレットは、75%エタノールで 2 回洗浄後、乾燥させ、再蒸留水に溶解した。

## 2 cDNA への逆転写

RNA 濃度を Nano-Drop を用いて測定した (Nano-Drop ND-1000, Thermo scientific)。cDNA への逆転写は ReverTra Ace® qPCR RT Kit (東洋紡) を用いて行った。氷上にて、溶液の総量が 7  $\mu$ l, RNA が 1 ng となるように RNA 溶液と再蒸留水を混合し、65°C で 5 分間熱変性後、4°C で急冷した。氷上にて、5 x RTbuffer 2  $\mu$ l, Enzyme Mix 0.5  $\mu$ l, primer mix (Random primer + Oligo(dT) primer) 0.5  $\mu$ l を熱変性した RNA に加え、37°C で 15 分間インキュベートし、逆転写反応させ、その後、98°C で 5 分間加熱し酵素を失活させた。

miRNA の逆転写反応には TaqMan®MicroRNA Assays (Applied Biosystems) と TaqMan®MicroRNA RT kit (Applied Biosystems) を用いて、total RNA 10 ng から各 miRNA ごとに逆転写反応を行った。

### 3 定量 PCR

得られた cDNA を鋳型として目的の遺伝子を定量するため、アガロースゲルを用いた電気泳動による半定量 PCR を行った。PCR 反応には Ex Taq hot start version (Takara) を用いた。各遺伝子に特異的な PCR プライマーを用いて、95°C 5 分間の初期変性に引き続き、95°C 15 秒で変性、60°C 15 秒でアニーリング、72°C 15 秒で伸長反応を行った。PCR 産物は 5 µl の臭化エチジウムを含む 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。発光シグナルは LAS3000 (FUJI Film) を用いた。サイクル数は各遺伝子および各組織に適したサイクル数と増幅曲線をもとに事前に決定した。遺伝子発現は、GAPDH または 18S rRNA を内部標準として補正した。定量 PCR に用いたプライマーは表 1 に列記する。

miRNA のリアルタイム PCR では、TaqMan® MicroRNA Assays に付属する各 miRNA に特異的なプライマーペアと TaqMan プローブを用いた。PCR 反応には TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) を用いた。95°C 2 分間の初期変性に引き続き、95°C 15 秒で変性、60°C 60 秒でアニーリング／伸長反応のシャトル PCR を行い、蛍光強度を測定した。すべての miRNA は U6 を内部標準として補正した。

表 1 定量PCRに用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列

遺伝子	配列 (5'→3')
Dicer-F	GGCTGCATCGGATAGTACACC
Dicer-R	CACACGCCTCCTACCACTACAACAC
Cre-F	GCCTGCATTACCGGTTCGATGC
Cre-R	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC
GAPDH-F	GACCCCTTCATTGACCTCAAC
GAPDH-R	TAAGCAGTTGGTGGTGCAGGA
18S rRNA-F	CTTAGAGGGACAAGTGGCGTTC
18S rRNA-R	CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG

## 第6節 ウェスタンブロット

組織を 2 x sample buffer complete (Tris-HCL, pH 6.8, 100 mM, SDS 1%, Glycerol 20%, DTT 80mM, 2-Mercaptoethanol 285mM, complete mini (Roche) 2 x conc., Phosphatase inhibitor cocktail 1 & 2 (Sigma) 2 x conc.) にてホモジナイズし, 必要に応じてガラスウールを詰めたカラムを通過させ, 粘性を除去した. 95°C, 5 分間煮沸後, SDS-PAGE に供した. 一次抗体には, 抗 PGC-1 抗体 (1/500, AB3242, Millipore), 抗 COX IV 抗体 (1/1000, #4844, Cell Signaling Technology), 抗 MyHC IIa (1/100, SC-71, DSHB), 抗  $\gamma$ -tubulin 抗体 (1/1000, Ak-15, Sigma) を用いた. 二次抗体は anti-Rabbit Immunoglobulin HRP (1/5000, NA9340, GE Healthcare) または anti-mouse Immunoglobulin (H+L) -HRP (1/2000, 1721011, Bio-Rad) を用いた. ECL prime (GE Healthcare) を用い, 発行シグナルを LAS3000 (FUJIFILM) により検出した.

## 第7節 マウス背部での創傷治癒試験

ソムノペンチルによる麻酔を行い、マウス背部の毛を剃った。イソジンで消毒を行い、5 mm 径のバイオプシーパンチを用いて2つの創傷を作製した。その後、2日ごとに8日後まで、イソフルランによる麻酔下でノギスを用いて創傷の大きさを測定した (Dioufa et al. 2010)。

## 第8節 *Ex vivo* 大動脈リングアッセイ

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、大動脈を無菌操作下で摘出し、~1 mm の大きさのリングにカットし、serum reduced Opti-MEM で一晩、37°C, 5%CO<sub>2</sub> でインキュベートし、血清飢餓とした。翌日、24 well cell culture plate を 40 µl の growth factor reduced-Matrigel でコートし、血清飢餓にしたリングを置いた。さらにその上から 40 µl の growth factor reduced-Matrigel を加え、リングを Matrigel 中に包埋した。Matrigel 中へ包埋した大動脈リングは、2.5% FBS を含む 1 ml の Opti-MEM で培養した。内皮細胞の出芽を誘導するため、培養液中には 50 ng/ml の血管内皮増殖因子 (Vascular endothelia growth factor: VEGF) を添加した。2日ごとに培地を交換し、7日後に顕微鏡下でデジタルカメラ DS-Ri1 (Nikon) を用いて画像を取得した (Baker et al. 2011)。



## 第9節 統計処理

データは平均±標準誤差で示した．統計処理は2群間では Student's t-test, 他群間では二元

配置分散分析に続く Turkey-kramer test を行い P 値  $< 0.05$  を統計的有意差とした．

## 第5章 結果

本研究では、筋線維タイプの遅筋化やミトコンドリア新生、血管新生といった持久性運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を明らかにするため、主に成熟マイクロ RNA へのプロセッシングに必須の酵素である Dicer の欠損マウスを用いた。また、タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスの解析により、運動誘発性血管新生が抑制されたことから、これらの原因が血管内皮細胞にあると考え、以降の検討は血管内皮細胞特異的なマイクロ RNA 欠損マウスを用いて、運動誘発性血管新生の解析を行った。

### 第1節 マイクロ RNA 欠損マウスの作出と運動による骨格筋適応の解析

持久性運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を概観するため、Dicer 欠損マウスを用いて自発走運動による筋の適応を観察した。骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスは、原因不明の理由により生後まもなく死に至るため、タモキシフェン誘導性 Cre マウスを用いて成熟した骨格筋の Dicer を欠損させる戦略をとった。これらのマウスにおいて自発走運動による骨格筋適応を解析した結果、筋線維タイプの遅筋化ならびにミトコンドリア新生は正常に誘導されたが、血管新生の抑制が観察された。

## 1 骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスの作出とその表現型

まず初めに、運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を概観するため、骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスを作出した。組織特異的な Dicer の欠損には、Cre-loxP システムを用いた。Cre はバクテリオファージ P1 に由来する部位特異的 DNA 組み換え酵素であり、loxP 配列を認識し、その配列に挟まれた領域を切り出すことで遺伝子の特定部位を欠損させることが可能である。さらに、この Cre 酵素を組織特異的な遺伝子のプロモーターの下流に挿入することで、組織特異的な遺伝子の欠損を可能とする (Gu et al. 1994)。本研究では、Ckmm の下流に Cre が組み込まれた ckmm-cre マウスと、Dicer<sup>fllox</sup> マウスを交配することで Ckmm-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスを作出した。しかしながら、これらのマウスでは成長の遅延が認められ、生後数週間で死に至ったため、自発走運動試験に供することができなかった。また、同じく筋特異的 Cre マウスである MyoD-Cre マウスとの交配により得られた筋特異的 Dicer 欠損マウス (MyoD-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>) においても、生後直ちに死に至ることが報告されている (O'Rourke et al. 2007)。これらの結果は、骨格筋における Dicer および生成されるマイクロ RNA がマウスの正常な発生および発達に重要であることを示す。これらのことから、生体マウスにおける解析が困難であったため、同じく Cre-loxP システムの改良型である Cre<sup>ERT2</sup> システムを用いて生後の骨格筋において Dicer を欠損させることを試みた。

## 2 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスの作出

骨格筋特異的 Dicer 欠損マウスに代わり，タモキシフェン誘導性 Cre マウスを用いて，タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウス（CAG-Cre<sup>ERT2</sup>;Dicer<sup>fl/fl</sup>; iDicer KO）を作出した (Hayashi et al. 2002). Cre<sup>ERT2</sup> は Cre 酵素の改良型であり，Cre にエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインと核内移行シグナルが付加され，エストロゲン類似化合物のタモキシフェンと結合することで，Cre<sup>ERT2</sup> が核内へ移行し，遺伝子の切り出しを行う．8 週齢の雄マウスに 5 日間連続で 1 mg のタモキシフェンを腹腔内投与し，翌週より 2 週間の回転輪による自発走運動に供した（図 3）.

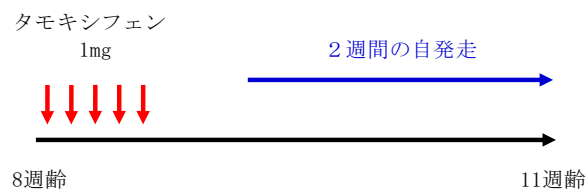


図 3 実験デザイン

タモキシフェン投与の翌週に、ヒラメ筋および足底筋を摘出、RNA を回収し、RT-PCR により Dicer mRNA を定量した。Dicer mRNA を検出するプライマーは loxP 配列に挟まれた Dicer のエクソン 24 の両側に位置し、タモキシフェン投与による Cre<sup>ERT2</sup> の核内移行によりエクソン 24 が切り出されることで、小さな mRNA が検出される (図 4 A)。ヒラメ筋、足底筋とも iDicer KO マウスにおいて、タモキシフェン投与により顕著な Dicer mRNA の減少が確認された (図 4 B, C)。次に、real-time PCR により骨格筋に豊富に存在する成熟マイクロ RNA の発現レベルを定量した。Dicer mRNA は顕著に減少した一方で、iDicer KO マウスのヒラメ筋における miR-1, miR-133a, miR-208b, miR-499, miR-133b, miR-206, miR-23a の発現レベルは 10~50%の減少、足底筋における miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 の発現レベルは 20~30%の減少に留まり、miR-23a に関しては減少が認められなかった (図 5 A, B)。

以上の結果から、骨格筋においては、成熟マイクロ RNA へのプロセッシングに必須の酵素とされている Dicer が著しく減少したにも関わらず、骨格筋中の成熟マイクロ RNA はその発現レベルを維持し、高い安定性を持つ可能性が示唆された。これまでに小脳皮質に存在するプルキンエ細胞や、心筋細胞においても成熟マイクロ RNA が高い安定性を保つことが報告されている (Schaefer et al. 2007, van Rooij et al. 2007)。これらを踏まえると、骨格筋における成熟マイクロ RNA も何らかの理由により高い安定性を示した可能性が示唆される。

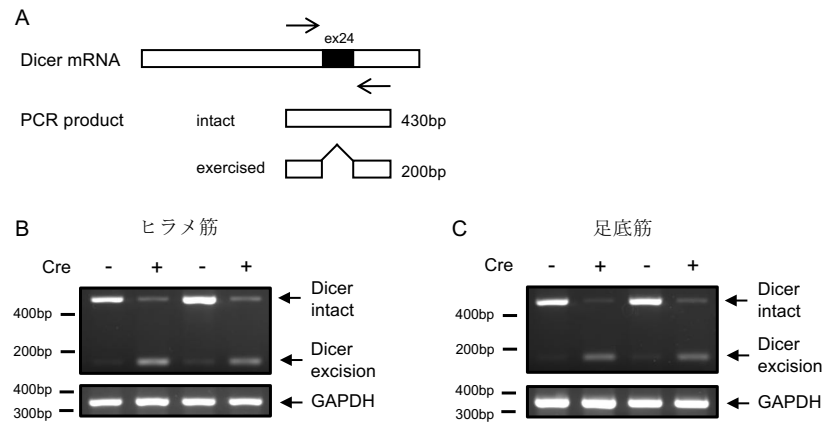


図4 タモキシフェン投与によるDicer mRNA発現

(A) Dicer mRNAにおけるプライマーの位置. (B, C) タモキシフェン投与の翌週に、遅筋（ヒラメ筋）および速筋（足底筋）におけるDicer mRNAの発現をRT-PCRにより定量した. GAPDHは内部標準として用いた.

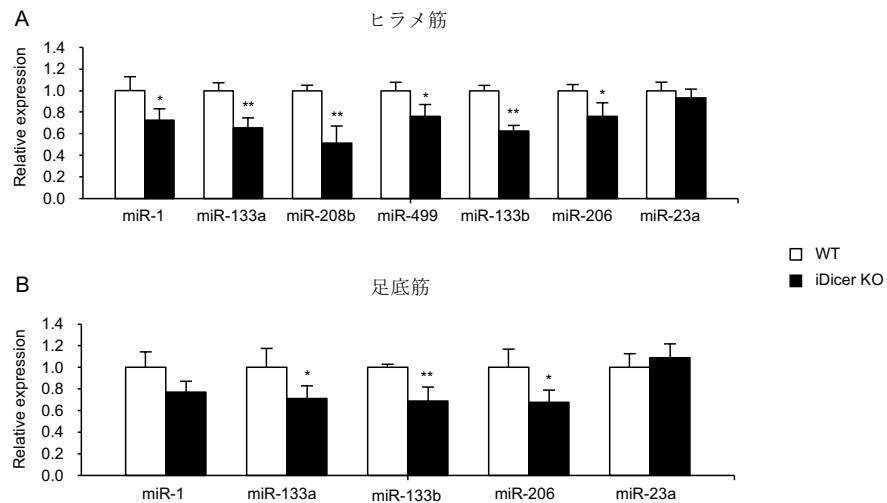


図5 タモキシフェン投与翌週のマイクロRNAの発現

(A, B) 筋に豊富に存在するマイクロRNAの発現を、野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の (A) 遅筋（ヒラメ筋）、(B) 速筋（足底筋）にて real-time PCRにより定量した. マイクロRNAの発現はU6の値をもとに補正した. 値はWTに対する相対値で示した. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. WT,  $n = 4-6$ , mean + sem.

CAG-Cre<sup>ERT2</sup> トランスジーンは, chicken beta actin プロモーター/エンハンサーとサイトメガロウイルスのエンハンサーにより発現が誘導されるため (Hayashi et al. 2002), 理論上は全組織においてトランスジーンが発現することとなる. そこで, タモキシフェン投与の 4 週間後において, WT マウスおよび iDicer KO マウスの褐色脂肪組織, 肝臓, 小腸の Dicer mRNA 発現を RT-PCR により定量した. さらに, これらの組織に豊富に発現する成熟マイクロ RNA の発現レベルを real-time PCR により定量した. タモキシフェン投与の 4 週間後において, iDicer KO マウスの褐色脂肪組織の Dicer mRNA は顕著に減少した (図 6 A). 一方で, 肝臓および小腸の Dicer mRNA 発現レベルは僅かな減少に留まった (図 6 B, C). さらに, Dicer mRNA の発現レベルに付随して, 足底筋および褐色脂肪組織に豊富に存在する miR-1, miR-133a および miR-193b, miR-378 はそれぞれ 50%~70%の減少を示したが, タモキシフェン投与による Dicer 欠損の 4 週間後においても約 50%の成熟マイクロ RNA が検出可能であるという驚くべき結果が得られた (図 7 A, B). 一方で, 肝臓および小腸に豊富に存在する miR-193a, miR-21, miR-214 の発現レベルに変化は認められなかった (図 7 C, D). さらに, iDicer KO マウスの組織ごとに Dicer mRNA および成熟マイクロ RNA の減少の程度が異なる原因として, Cre<sup>ERT2</sup> トランスジーンが発現レベルが異なると考え, Cre mRNA に特異的なプライマーを用いて発現量を定量した. これまでの Dicer mRNA および成熟マイクロ RNA の発現

レベルのデータと一致して、Cre mRNA の発現レベルは、肝臓および小腸と比較して、足底筋および褐色脂肪組織で顕著に高いことが認められた (図 8)。

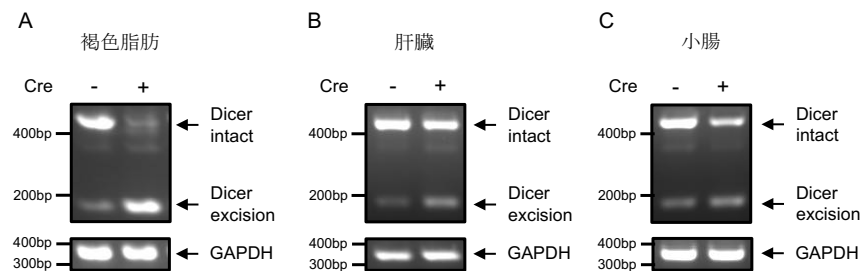


図6 タモキシフェン投与4週間後の各組織におけるDicer mRNAの発現  
野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の  
(A) 褐色脂肪, (B) 肝臓, (C) 小腸におけるタモキシフェン投与4週間後のDicer mRNA  
発現をRT-PCRにより定量した. GAPDHは内部標準として用いた.

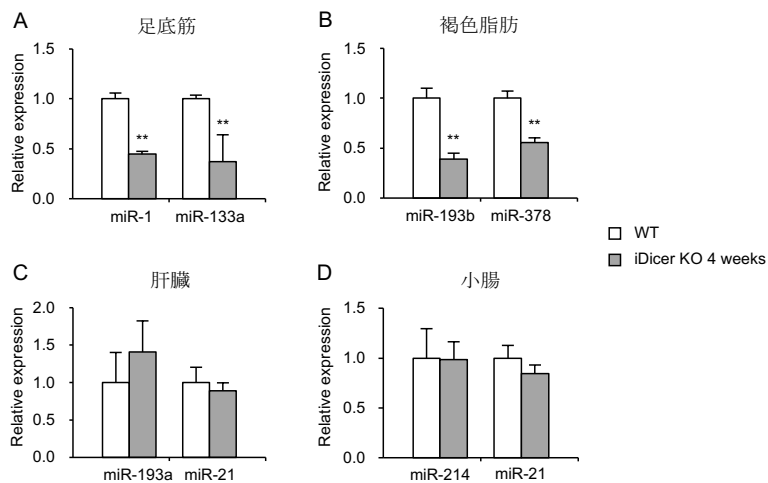


図7 タモキシフェン投与4週間後の各組織におけるDicer mRNAの発現  
野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の  
(A) 速筋 (足底筋), (B) 褐色脂肪, (C) 肝臓, (D) 小腸における, タモキシフェン  
投与4週間後のマイクロRNAの発現をreal-time PCRにより定量した. マイクロRNAの  
発現はU6の値をもとに補正した. 値はWTに対する相対値で示した. \*\* $P < 0.01$  vs. WT,  
 $n = 3-5$ , mean + sem.



これら一連の結果から、タモキシフェン投与により組織ごとに **Dicer mRNA** および成熟マイクロ RNA の発現レベルの減少の程度が異なるのは、**Cre<sup>ERT2</sup>** のトランスジーンが発現の違いによるものである可能性が示唆された。その一方で、これまで成熟マイクロ RNA へのプロセッシングに必須の酵素とされていた **Dicer** の欠損後においても、成熟マイクロ RNA が検出可能であるという驚くべき結果が得られた。

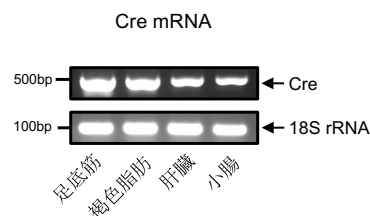


図8 CAG-**Cre<sup>ERT2</sup>**マウスにおける**Cre mRNA**の発現  
CAG-**Cre<sup>ERT2</sup>**マウスの足底筋, 褐色脂肪, 肝臓, 小腸における**Cre mRNA**発現を  
RT-PCRにより定量した. 18S rRNAは内部標準として用いた.

### 3 タモキシフェン誘導性 **Dicer** 欠損マウスにおける運動による骨格筋適応の解析

長期間の持久性運動は、足底筋などの速筋優位な骨格筋において、筋線維の遅筋化、ミトコンドリア新生、血管新生等の適応を誘導することが知られている (Gute et al. 1996, Waters et al. 2004, Schiaffino et al. 2011, Delavar et al. 2014). タモキシフェン誘導性 **Dicer** 欠損マウス (**iDicer KO** マウス) において、**Dicer mRNA** の顕著な減少ならびに成熟マイクロ RNA の部分的な減少が認められたことから、これらのマウスを回転輪を用いた 2 週間の自発走運動に供した. **WT** マウスまたは **iDicer KO** マウスを、それぞれランニングホイールを設置した

ケージで一匹ずつ飼育した。ランニングホイールの回転数から走行距離を算出した結果、

WT と iDicer KO マウスの 1 日当たりの走行距離に違いは認められなかった (図 9)。

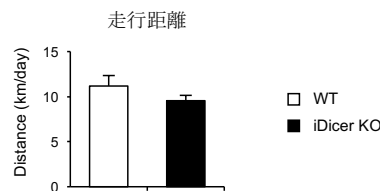


図 9 野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の 2 週間の回転輪による自発走期間における 1 日当たりの走行距離を回転数より算出した.  $n = 6-7$ , mean + sem.

2 週間の自発走運動後、遅筋優位なヒラメ筋および速筋優位な足底筋を摘出し、蛍光免疫染色により筋線維タイプ組成を解析した。遅筋優位なヒラメ筋の type I 線維および type IIa 線維については、自発走運動および Dicer 欠損による影響はいずれも認められなかった (図 10 A, B)。WT マウスの足底筋において、酸化的特性を持つ速筋である type IIa 線維が有意に増加し、iDicer KO マウスにおいてもこれらの増加が認められた (図 10 C, D)。同様に、解糖系の特性を持つ type IIb 線維および type IIc 線維の減少も、WT マウスおよび iDicer KO マウスにおいて観察された (図 10E)。これらの結果から、iDicer KO マウスにおいても、WT マウスと同様に筋線維の遅筋化が誘導されたことが示唆された。続いて、ミトコンドリア活性を評価するため、組織切片を用いてコハク酸脱水素酵素染色 (succinate dehydrogenase; SDH 染色) を行った。筋線維の遅筋化と同様に、2 週間の自発走運動により WT マウスお

よび iDicer KO マウスにおいて SDH 活性の増加が認められ, WT マウスと iDicer KO マウス

の間に顕著な差は認められなかった (図 11).

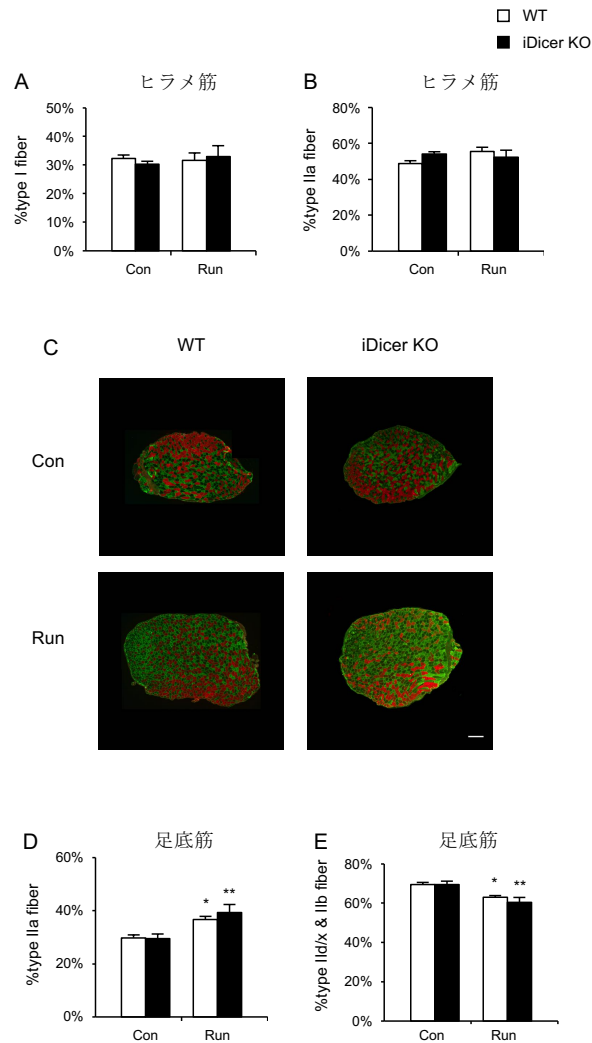


図 10 2 週間の自発走運動に伴う筋線維組成の変化

野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の 2 週間の自発走運動後のヒラメ筋切片および足底筋切片を, 抗MyHC1抗体 (青), 抗MyHC2a抗体および抗ジストロフィン抗体 (緑), 抗MyHC2b抗体 (赤) で免疫染色した. (A)遅筋 (ヒラメ筋) の各筋線維数を定量し, 全線維数に対する各線維タイプの割合で示した. (B, C)速筋 (足底筋) の各筋線維数を定量し, 全線維に対する各線維タイプの割合で示した. バールは200  $\mu$ m. c, n = 5-7, mean + sem.

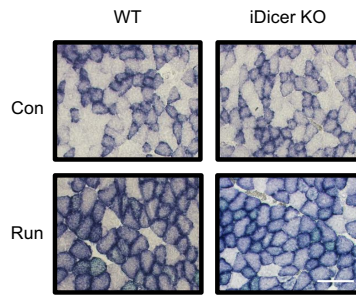


図 1 1 2 週間の自発走運動に伴う速筋（足底筋）のミトコンドリア活性の変化  
 野生型マウス（WT）およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス（iDicer KO）の  
 2 週間の自発走運動後の足底筋切片を用いてコハク酸脱水素酵素染色を行った。  
 バーは100  $\mu$ m, mean + sem.

さらに、ウェスタンブロットによりミオシン重鎖 type IIa (MyHC IIa), ミトコンドリア新生のマスターレギュレーターおよび血管新生に必須の転写コアクチベーターPGC-1 $\alpha$ , ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成するタンパクである COX IV の発現を足底筋において定量した (図 12 A). WT マウスにおいて, 2 週間の自発走運動に伴い MyHC IIa, PGC-1 $\alpha$ , COX IV のタンパク発現は顕著に増加した (図 12 B, C, D). これらのタンパク発現は iDicer KO マウスにおいても顕著な増加が認められた. しかしながら, iDicer KO マウスにおいては運動を行っていないコントロール群 (Con) のマウスにおいて, これらのタンパク発現の増加傾向が認められたため, 統計的有意差を検出するには至らなかった. これらの結果を踏まえると, iDicer KO マウスにおいては, 2 週間の自発走運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生は, WT マウスと同様に正常に誘導されることが示された.

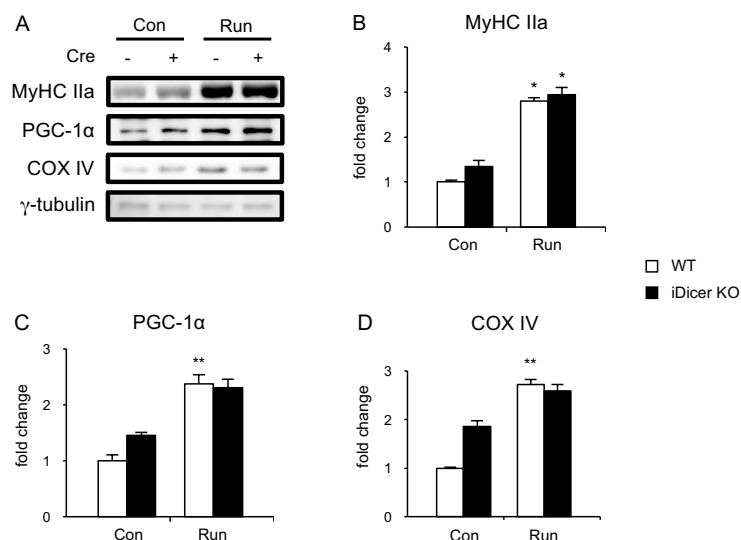


図12 2週間の自発走運動に伴う速筋（足底筋）の骨格筋適応関連遺伝子のタンパク発現  
 (A) 野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の2週間の自発走運動後の足底筋におけるMyHC IIaおよびPGC-1α, COX IVのタンパク発現をウエスタンブロットにより解析した. (B, C, D) MyHC IIa, PGC-1α, COX IVのタンパク質発現の定量値.  $\gamma$ -tubulinを内部標準として用いた., \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 各非運動群  $n = 5-6$ , mean + sem.

続いて、蛍光免疫染色により血管内皮マーカーである CD31 および筋線維を染色し、血管新生の指標として筋線維当たりの毛細血管数を定量した. WT マウスにおいては、2 週間の自発走による毛細血管新生が誘導された一方で、iDicer KO マウスにおいて毛細血管新生は誘導されなかった (図 13). これまでに、マイクロ RNA が *in vitro* において血管内皮細胞の増殖や遊走を調節することや (Kuehbach et al. 2007, Suarez et al. 2007), 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスの解析から、腫瘍内の毛細血管数の減少や、血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) による血管新生が抑制されることが示されている (Suarez et al. 2008). 本研究で用いたタモキシフェン誘導性 Cre マウスは全身の組織で Cre<sup>ERT2</sup> トラン

スジーンの発現が誘導されるため、血管内皮細胞が豊富な肺組織において、Dicer mRNA の発現レベルを定量した結果、iDicer KO マウスにおいて、肺の Dicer mRNA の減少が認められた (図 14)。

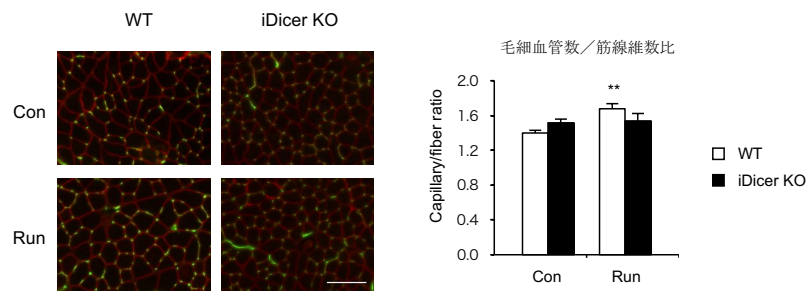


図 1 3 2 週間の自発走運動に伴う速筋（足底筋）の毛細血管新生  
(A) 野生型マウス (WT) およびタモキシフェン誘導性Dicer欠損マウス (iDicer KO) の 2 週間の自発走運動後の足底筋切片を、抗CD31抗体 (緑)、抗ジストロフィン抗体 (赤) で免疫染色した。(B) 毛細血管数および筋線維数を定量し、筋線維 1 本あたりの毛細血管数を示した。バーは100  $\mu$ m.  
\*\* $P < 0.01$  vs. 非運動群,  $n = 5-7$ , mean + sem.

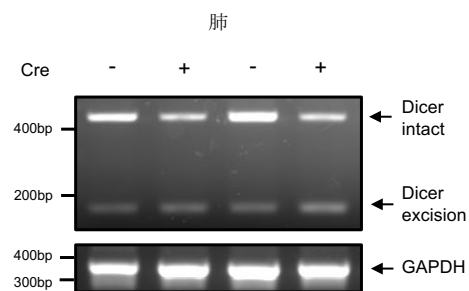


図 1 4 タモキシフェン投与による肺におけるDicer mRNA発現  
(A) タモキシフェン投与の翌週に、肺におけるDicer mRNAの発現をRT-PCRにより定量した。GAPDHは内部標準として用いた。

以上のタモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスを用いた解析から、運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生は WT マウスと同様に正常に誘導された一方、運動誘発性の毛細血管新生は Dicer の欠損において抑制された。さらに、運動誘発性血管新生に必須である PGC-1 $\alpha$  の発現が iDicer KO マウスにおいても WT マウスと同様に増加したことは (Chinsomboon et al. 2009), 骨格筋から毛細血管への刺激は十分であるにも関わらず、その刺激を受取る血管内皮細胞に何らかの異常が生じている可能性を示唆するものである。先行研究で報告された、マイクロ RNA による血管新生の調節および血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを用いた結果を踏まえると、iDicer KO マウスにおいて認められた運動誘発性血管新生の抑制は、血管内皮細胞の Dicer およびマイクロ RNA の減少に起因することが想定される。そのため以降の検討は、血管内皮細胞の Dicer およびマイクロ RNA に着目し、運動誘発性血管新生に関する解析を行なった。

## 第2節 血管内皮細胞特異的 miRNA 欠損マウスの作出と運動誘発性血管新生の解析

タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスを用いた検討から、2 週間の自発走運動による足底筋の毛細血管新生が抑制されたことが示された。また、運動誘発性血管新生において必須の分子である PGC-1 $\alpha$  が増加したこと、先行研究において血管内皮細胞の Dicer およびマイ

クロ RNA が血管新生を調節することが報告されていることから, Dicer の欠損による運動誘発性血管新生の抑制は, 血管内皮細胞の Dicer およびマイクロ RNA の減少に伴う血管新生応答シグナルの破綻が原因であると仮定し, 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを作出し, 運動誘発性血管新生を解析した. さらに, 血管新生を調節するマイクロ RNA として miR-23 クラスターに着目し, 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスを作出し, 血管新生に関する表現型を観察した.

## 1 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>) の作出

運動誘発性血管新生における血管内皮細胞の Dicer の関与を検証するため, まず初めに, 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを作出した. 血管内皮細胞および造血幹細胞特異的 Cre 発現マウスである Tie2-Cre マウス (Kisanuki et al. 2001) と Dicer<sup>fl/ox</sup> マウスの交配により血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウス: Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスの作出を試みた. しかしながら, Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/+</sup>マウスと Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスの交配からホモ欠損マウスである Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> の仔を得ることはできなかった. これらのブリーディングペアにより期待された仔の遺伝子型のメンデル比と実際に得られたメンデル比を比較したところ, 期待される正常なメンデル比を示さなかった (表 2).



$\text{♂Tie2-Cre;Dicer}^{fl/+} \times \text{♀Dicer}^{fl/fl}$		n = 37	
	$\text{Dicer}^{fl/+} \text{ or } \text{Dicer}^{fl/fl}$	$\text{Tie2-Cre; Dicer}^{fl/+}$	$\text{Tie2-Cre; Dicer}^{fl/fl}$
expected	50.0%	25%	25%
observed	59.5%	40.5%	0%

表2 血管内皮細胞特異的Dicer欠損マウスのメンデル比

♂Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/+</sup>マウスと♀Dicer<sup>fl/fl</sup>マウスの交配により得られた37頭の新生仔において、期待されたメンデル比および実際に得られた新生仔のメンデル比を示した。

血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスが生存可能であり、成熟したマウスにおいて解析がなされている一方 (Suarez et al. 2008, Zhou et al. 2009), 近年, 同様に血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスが胎生致死であることが報告された (Gauvrit et al. 2014). これら矛盾した結果の原因は不明であるが, それぞれの研究において用いられたマウスの由来が異なることが確認された。少なくとも Tie2-Cre マウス (Kisanuki et al. 2001, Koni et al. 2001), Dicer<sup>fllox</sup> マウス (Cobb et al. 2005, O'Rourke et al. 2007) とともに2つの独立した研究室から作製されている。今回用いたペアは, 2014年に Gauvrit らが用いた胎生致死となるマウスのブリーディングペアと同様であった。そのため, 今回作出を試みた血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウスも, 胎生致死である可能性が示唆された。

血管内皮細胞特異的 *Dicer* ホモ欠損マウスを得ることができなかったため、ヘテロ欠損マウスを用いて以後の検討を行うのと並行して、異なる血管内皮細胞特異的 *Cre* 発現マウスを用いてホモ欠損マウスの作出を試みた。

## 2 血管内皮細胞特異的 *Dicer* 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生の解析

*Tie2-Cre* マウスと *Dicer*<sup>f/f</sup> マウスの交配によっては血管内皮細胞特異的 *Dicer* ホモ欠損マウスを得ることができなかったため、以後の検討はヘテロ欠損を用いて解析を行なった。

血管内皮細胞特異的 *Dicer* ヘテロ欠損マウス (Het) の肺組織において、*Dicer* の mRNA を定量したところ、WT マウスと比較して約 40%の減少が認められた (図 15 A, B)。しかしながら、血管内皮細胞に特異的に発現する miR-126 の発現レベルを real-time PCR を用いて定量したところ (Wang et al. 2008), WT マウスと Het マウスでその発現レベルに差は認められなかった (図 15 C)。

次に、これらのマウスに2週間の回転輪による自発走運動を行わせ、足底筋を摘出し、免疫染色により運動誘発性血管新生を評価した。また、これらの実験では運動群のみ設置した。2週間の自発走運動後において、WT マウスと Het マウスの間に、毛細血管数/筋線維数比の顕著な差は認められなかった (図 16)。

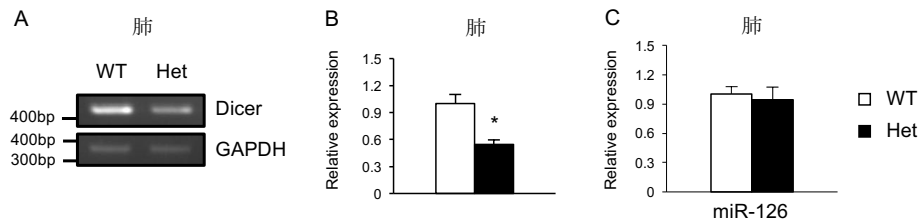


図 1 5 血管内皮細胞特異的Dicerヘテロ欠損マウスの肺におけるDicer mRNAおよびマイクロRNAの発現  
 (A) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的Dicerヘテロ欠損マウス (Het) の肺におけるDicer mRNAの発現をRT-PCRにより定量した。(B) Dicer mRNA発現の定量値. GAPDHは内部標準として用いた。  
 (C) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的Dicerヘテロ欠損マウス (Het) の肺において, 血管内皮細胞特異的なマイクロRNAであるmiR-126の発現をreal-time PCRにより定量した. マイクロRNAの発現はU6の値をもとに補正した. 値はWTに対する相対値で示した. \* $P < 0.05$  vs. WT,  $n = 3-5$ , mean + sem.

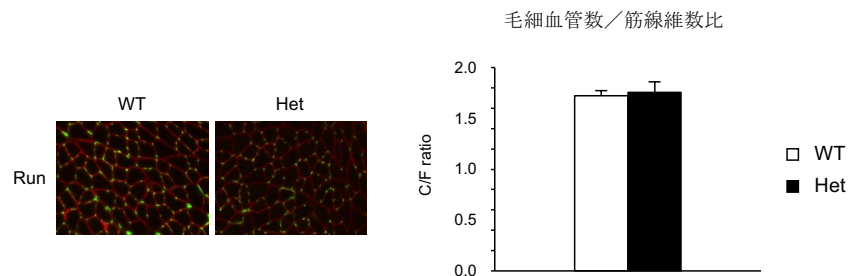


図 1 6 2週間の自発走運動に伴う速筋（足底筋）の毛細血管新生  
 (A) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的Dicerヘテロ欠損マウス (Het) の2週間の自発走運動後の足底筋切片を, 抗CD31抗体 (緑), 抗ジストロフィン抗体 (赤) で免疫染色した. 実験は自発走運動群のみ行った. 毛細血管数および筋線維数を定量し, 筋線維1本あたりの毛細血管数を示した. バーは100  $\mu\text{m}$ . 非運動群,  $n = 5-6$ , mean + sem.

血管内皮細胞特異的 Dicer ヘテロ欠損マウスにおいては、Dicer mRNA の減少が認められたものの、片アリの Dicer の残存により、miRNA の発現レベルに差は認められなかった可能性があり、運動誘発性血管新生においても顕著な表現型は観察されなかった。これらの可能性を排除するため、異なる血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウスを用いて両アリの欠損させたマウスを作出し、表現型を解析することを試みた。

### 3 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (VE-Cad-Cre; Dicer<sup>f/f</sup>) の作出

Tie2-Cre マウスに代わり、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスの作出に VE-Cad-Cre マウスを用いた。VE-Cadherin は血管内皮細胞特異的な細胞接着分子であり、Tie2 とは対照的に造血幹細胞への発現は認められない (Giannotta et al. 2013)。VE-Cadherin のプロモーターの下流に Cre が組み込まれたトランスジーンを持つ VE-Cad-Cre マウスを用いて (Kogata et al. 2006), Dicer<sup>fllox</sup> マウスとの交配により血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウス: VE-Cad-Cre; Dicer<sup>f/f</sup> の作出を試みた。マウス尻尾からゲノム DNA を抽出し、PCR を用いてジェノタイピングを行なった結果、VE-Cad-Cre の発現が認められる Dicer<sup>f/f</sup> マウス (KO) を得ることができた (図 17)。しかしながら、これら KO マウスの肺組織において RT-PCR により Dicer mRNA を定量したところ、Dicer mRNA の減少は認められなかった (図 18)。さらに、

real-time PCR により血管内皮細胞に豊富に存在する miR-126, miR-23a, miR-24, miR-214 の発現レベルを定量したものの, Dicer mRNA の発現と同様に WT マウスと KO マウスの間に差は認められなかった (図 19).

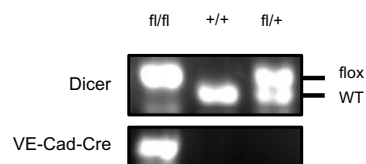


図 1 7 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (VE-Cad-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>) の作出  
血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウスである VE-Cad-Cre マウスと Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスの交配により得られた, 野生型ならびに血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスのジェノタイプングの結果を示した.

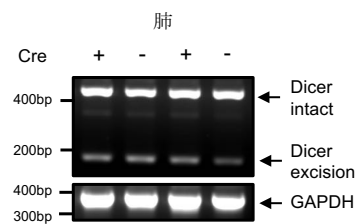


図 1 8 血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウスの肺における Dicer mRNA の発現  
野生型マウスおよび血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウスの肺における Dicer mRNA の発現を RT-PCR により定量した. GAPDH は内部標準として用いた.

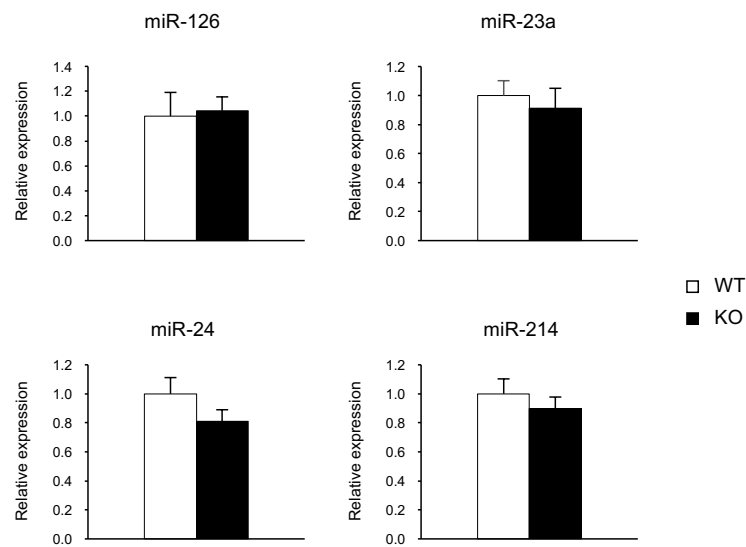


図 19 血管内皮細胞特異的Dicerホモ欠損マウスの肺におけるマイクロRNAの発現  
野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的Dicerホモ欠損マウス (KO) の肺において, 血管内皮細胞に特異的または豊富に存在するマイクロRNAの発現をreal-time PCRにより定量した. マイクロRNAの発現はU6の値をもとに補正した. 値はWTに対する相対値で示した. n = 6

先行研究において, これら VE-Cad-Cre マウスは血管内皮細胞特異的 Cre マウスとして機能することが, 複数の独立した検討より確認されている (Kogata et al. 2006, Iesato et al. 2013, Aspalter et al. 2015, Gao et al. 2016). 遺伝子型の判定上はホモ欠損マウスが得られているにも関わらず, Dicer mRNA が全く減少しないことについて, 正確な原因は不明である. しかしながら, その一因として, VE-Cadherin プロモーターによりドライブされる Cre の発現量が少ないのではないかと考え, VE-Cad-Cre マウス, 比較対象として Tie2-Cre マウスおよび CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスの肺組織において Cre の mRNA を定量した. Tie2-Cre マウスおよび CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスと比較して, VE-Cad-Cre マウスにおいて, Cre mRNA 発現がやや低い傾向が

観察されたが、顕著な差は認められなかった (図 20)。

以上の結果から、VE-Cad-Cre マウスを用いて血管内皮細胞特異的な Dicer 欠損マウスを作出したものの、Dicer mRNA および血管内皮細胞に豊富に存在するマイクロ RNA の発現の減少は認められなかった。

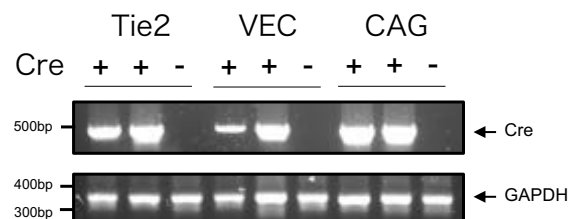


図 20 Tie2-Cre, VE-Cad-Cre, CAG-Cre<sup>ERT2</sup>マウスの肺におけるCre mRNAの発現レベル  
Tie2-Creマウス, VE-Cad-Creマウス, CAG-Cre<sup>ERT2</sup>マウスの肺組織におけるCreのmRNA発現をRT-PCRにより定量した. GAPDHは内部標準として用いた。

#### 4 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスの作出

血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスの作出および表現型解析と並行して、タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおいて観察された、運動誘発性血管新生の抑制に寄与する血管内皮細胞のマイクロ RNA を特定するため、miR-23 クラスターに着目した。

これまでに、血管内皮細胞の miR-23 クラスターは、主に *in vitro* において血管新生を調節することが明らかにされている (Zhou et al. 2011, Biyashev et al. 2012, Urbich et al. 2012, Zhou

et al. 2014). しかしながら、血管内皮細胞の miR-23 クラスターの in vivo における役割は十分に明らかでない。

また、我々のグループでは、この miR-23 クラスターを遅筋優位に発現するマイクロ RNA として同定し、タンパク分解経路の阻害を介した筋萎縮の抑制や、骨格筋におけるミトコンドリア量の制御に寄与することを明らかにしてきた (Wada et al. 2011, Wada et al. 2015). さらに我々のグループでは、miR-23 クラスターの両側に loxP 配列を持つ miR-23 cluster<sup>fllox</sup> マウスを作出した (和田ら, 未発表データ).

miR-23 cluster<sup>fllox</sup> マウスは、筑波大学生命科学動物資源センター資源開発分野より供与を受けた pDT-loxP-loxPFRT-PGKneo-loxPFRT をプラットフォームベクターとし、miR-23a, b 両クラスターを挟み上流 4kb, 下流 2kb をそれぞれ長腕と短腕とするターゲティングベクターが作製された (図 21, 22). C57Bl6/J マウスから樹立した ES 細胞へターゲティングベクターを導入し、PCR スクリーニングを経て得られたコロニーのゲノムを用いてサザンブロット解析が行われた. 長腕 5' 上流ならびに短腕 3' 下流にデザインしたプローブによるサザンブロット解析の結果、複数の ES 細胞クローンで相同組換えが確認された. 得られた ES 細胞クローンからキメラマウスが作出された.



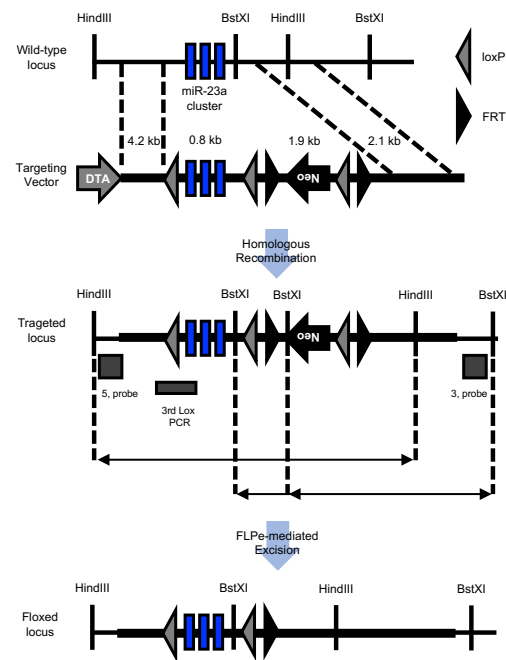


図 2 1 miR-23a クラスターターゲットベクター概略図

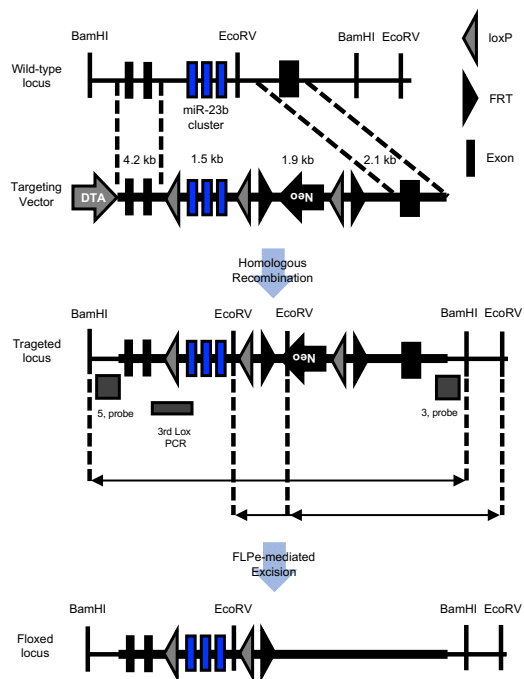


図 2 2 miR-23b クラスターターゲットベクター概略図

キメラマウスを CAG-FLPe マウスに交配し，得られた F1 の生殖系列細胞レベルでターゲットベクターに由来するネオマイシン耐性カセットを抜去した．また，F1 世代において行なった 3rd LoxP 配列に対するジェノタイピングの結果，相同組換え体 ES 細胞由来の遺伝子型が確認されたことから，遺伝子ターゲットされた ES 細胞の生殖系列細胞へのトランスミッションが確認された（和田ら，未発表データ）．

これらのマウスを Tie2-Cre マウスと交配することで，血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスを作出した．マウス尻尾から抽出したゲノム DNA において，PCR によりジェノタイピングを行なった結果，Tie2-Cre 陽性の miR-23 cluster<sup>flox</sup> マウス（DKO）が確認された（図 23）．DKO マウスは生存可能であり，成熟期まで正常に発達し，胎児期および成熟期において著しい表現型は認められていない．

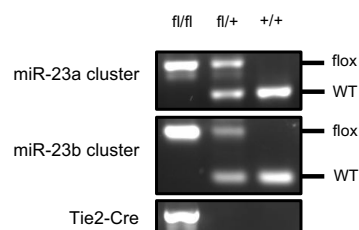


図 23 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスの作出  
血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウスである Tie2-Cre マウスと miR-23a/b cluster<sup>flox</sup> マウスの交配により得られた，野生型ならびに血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスのジェノタイピングの結果を示した．

DKO マウスにおいて、KO の効率を確認するため、血管内皮細胞が豊富に存在する肺および大動脈、陰性コントロールとしてヒラメ筋において、miR-23 クラスターの個々のマイクロ RNA ならびに血管内皮細胞特異的に発現する miR-126 の発現を real-time PCR により定量した。WT マウスと比較して、DKO マウスの肺組織においてそれぞれマイクロ RNA の有意な減少が確認された（図 24 A）。大動脈組織においては、DKO マウスにおいて統計的有意差は検出できなかったものの、それぞれのマイクロ RNA の発現レベルの減少は肺組織と同様の傾向を示した（図 24 B）。陰性コントロールであるヒラメ筋における miR-23 クラスターの発現を定量したが、いずれのマイクロ RNA においても WT マウスと DKO マウスで差は認められなかった（図 24 C）。また、マイクロ RNA の陰性コントロールとして定量した miR-126 の発現は、肺、大動脈およびヒラメ筋のいずれの組織においても WT マウスと DKO マウスの間に差は認められなかった。これらの結果から、Tie2-Cre マウスと miR-23 cluster<sup>fllox</sup> マウスの交配により、血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスの作出が確認されたため、成熟したマウスにおいて運動誘発性血管新生を解析した。

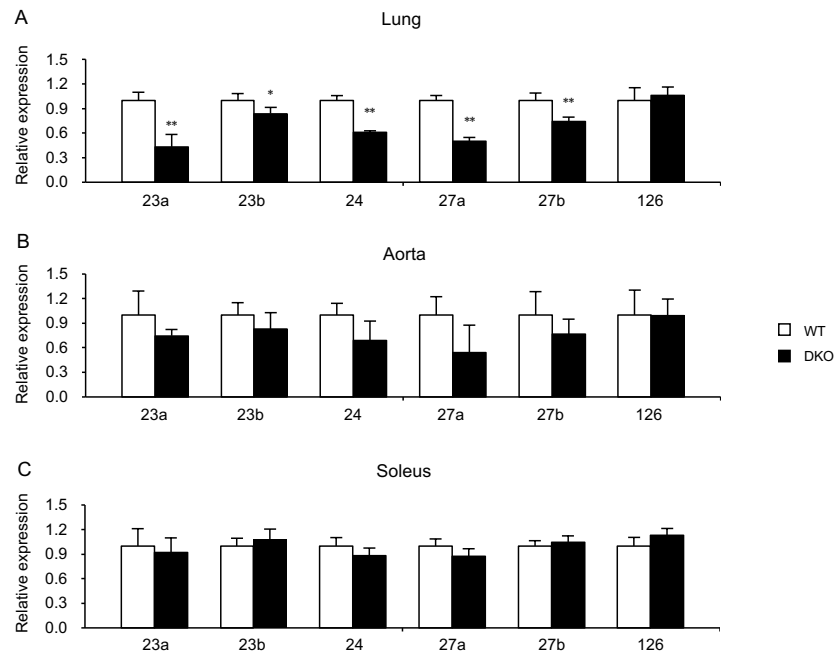


図2-4 血管内皮細胞特異的 miR-23 cluster 欠損マウスにおけるマイクロRNAの発現

(A, B) miR-23a clusterおよびmiR-23b clusterのそれぞれのマイクロRNAの発現ならびに、血管内皮細胞特異的なマイクロRNAであるmiR-126の発現を、野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的 miR-23 cluster 欠損マウス (DKO) の (A) 肺, (B) 大動脈, (C) 遅筋 (ヒラメ筋) において、real-time PCRにより定量した。マイクロRNAの発現はU6の値をもとに補正した。値はWTに対する相対値で示した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. WT,  $n = 4-6$ , mean + sem.

## 5 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスにおける

### 運動誘発性血管新生の解析

これまでに、血管内皮細胞における miR-23 クラスターに属するそれぞれのマイクロ RNA

は、主に *in vitro* の実験系において、血管内皮細胞の増殖や遊走、および血管様管構造の形

成を介して血管新生を制御することが明らかにされている (Kuehbach et al. 2007, Zhou et al.

2011, Biyashev et al. 2012, Urbich et al. 2012, Zhou et al. 2014). そこで, *in vivo* での血管内皮細胞の miR-23 クラスターの役割を明らかにするため, 作出した DKO マウスに, 2 週間の回転輪による自発走運動を行わせた.

2 週間の自発走運動期間中において, WT マウスと DKO マウスの間で, 1 日当たりの自発走行距離に差は認められなかった (図 25 A). 2 週間の自発走運動後の足底筋を用いて凍結切片を作製し, 蛍光免疫染色により血管新生を評価した結果, WT マウスにおいて有意な毛細血管数の増加が認められた. さらに, 自発走運動による毛細血管数の増加は, DKO マウスにおいても同様に観察された (図 25 B, C).

これらの結果から, 血管内皮細胞特異的な miR-23 クラスター欠損マウスにおいて, 運動誘発性血管新生は正常に誘導されることが示された.

## 6 血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスにおける血管新生能の解析

血管内皮細胞特異的な miR-23 クラスター欠損マウスにおいては, 運動誘発性血管新生が正常に誘導された. これまでに多くの研究が血管内皮細胞における miR-23 クラスターの血管新生への関与を示唆している一方, *in vitro* のデータが *in vivo* において必ずしも再現され

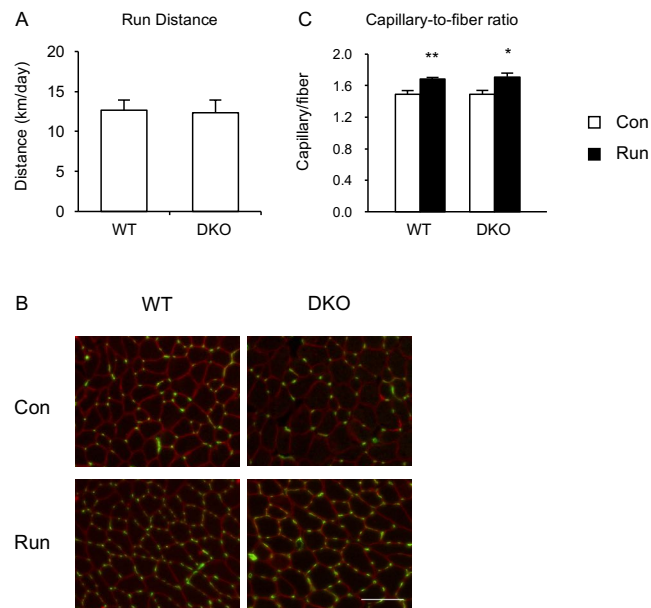


図 2-5 2 週間の自発走運動に伴う速筋（足底筋）の毛細血管新生

(A) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的 miR-23 cluster 欠損マウス (DKO) の 2 週間の回転輪による自発走期間における 1 日当たりの走行距離を回転数より算出した. (B) 2 週間の自発走運動後の足底筋切片を, 抗 CD31 抗体 (緑), 抗ジストロフィン抗体 (赤) で免疫染色した. バーは 100  $\mu$ m. (C) 毛細血管数および筋線維数を定量し, 筋線維 1 本あたりの毛細血管数を示した. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 各非運動群,  $n = 5-6$ , mean + sem.

るとは限らない. In vivo における miR-23 クラスターとの関係性について洞察を深めるため, 異なるコンテキストにおいて血管新生能を評価した.

まず初めに, マウス背部への創傷治癒試験を行なった. 創傷治癒過程において血管新生は重要な構成要素であり, 既存の毛細血管から出芽し, 毛細血管網を拡大することで創傷部へ酸素や栄養を運搬する役割を担う (Tonnesen et al. 2000). また, 血管内皮細胞における血管新生シグナルは, 血管新生能および創傷の回復へ影響を及ぼすことが報告されている (Sawada et al. 2014, Xu et al. 2017). 5mm の生検パンチを用いて, マウスの背部の皮膚へ全層

欠損層を作製した。その後2日毎に8日後まで、ノギスを用いて創傷の大きさを測定したが、DKO マウスにおける創傷の治癒速度は、WT マウスと同程度であった（図 26 A, B）。

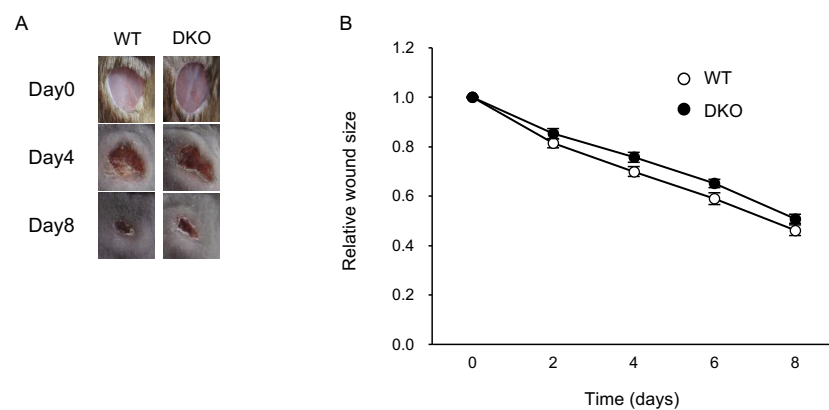


図 26 マウス背部における創傷治癒試験

(A) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的 miR-23 cluster 欠損マウス (DKO) の背部に生検パンチを用いて 5 mm の創傷を作製し、8 日後まで 2 日ごとに観察した。  
(B) 計測した創傷の大きさを、創傷作製時の相対値で示した。n = 8-10, mean + sem.

次に、マウス胸部大動脈を用いた *ex vivo* 大動脈リングアッセイを行なった。大動脈リングアッセイでは、マウスの大動脈を摘出し、リング状にカットした上で細胞外基質である Matrigel 中へ包埋し、大動脈中に存在する既存の血管内皮細胞からの新たな血管内皮細胞の出芽を顕微鏡下で観察する実験手法であり、培養下で直接的に血管内皮細胞の増殖、遊走ならびに毛細血管様の管構造形成能を評価することが可能である (Baker et al. 2011)。WT マウスおよび DKO マウスから胸部大動脈を摘出、Matrigel 中に包埋し、血管内皮細胞の出芽を

観察した。また、血管新生を誘導するために VEGF (50 ng/ml) を添加し、包埋の 7 日後に顕微鏡下で撮影し、大動脈リングの周囲に広がる血管内皮細胞の面積を定量した。VEGF を添加しないグループにおいては、大動脈における血管内皮細胞の出芽面積に顕著な差は認められなかった。さらに、WT マウス、DKO マウスともに VEGF 刺激により顕著に毛細血管面積は増加したが、ジェノタイプ間での顕著な差は認められなかった (図 27 A, B)。

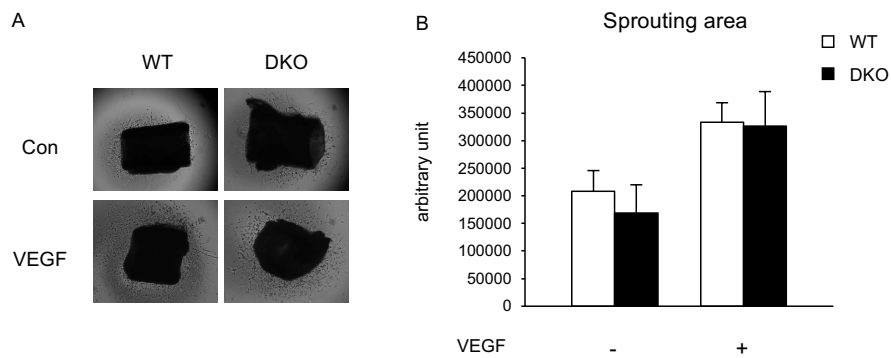


図 27 マウス大動脈を用いた血管新生能の評価

(A) 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的 miR-23 cluster 欠損マウス (DKO) から大動脈を摘出し約 1mm のリングにした上で、細胞外マトリクスタンパク質を豊富に含む matrigel へ包埋し、血管内皮細胞の出芽および増殖を 7 日目まで観察した。(B) 顕微鏡下で撮影した画像より血管内皮細胞の出芽面積を定量した。4 ring/mice, n = 5-8, mean + sem.

以上の結果から、in vitro の実験系において miR-23 クラスターに属する個々のマイクロ RNA が内皮細胞の増殖や遊走の調節を介して血管新生を調節することが示唆されていた一



方, in vivo において, miR-23 クラスター単位で全てのマイクロ RNA を欠損させた場合には, 血管新生への影響は限定的である可能性が示唆された.

## 第5章 考察

### 第1節 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動による骨格筋適応

まず初めに、筋線維の遅筋化やミトコンドリア新生、血管新生などの持久性運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を明らかにするため、マイクロ RNA 前駆体から成熟マイクロ RNA へのプロセッシングに必須のリボヌクレアーゼである Dicer を筋特異的に欠損するマウスの作出を試みた。しかしながら、筋特異的 Cre 発現マウスである Ckmm-Cre マウスとの交配により得られた筋特異的 Dicer 欠損マウス (SM-Dicer KO) は、生後数週間で死に至ることが観察され、成熟した個体において解析を行うことが不可能であった。また、その詳細なメカニズムについても不明である。同様に、筋特異的 Cre 発現マウスである MyoD-Cre マウスとの交配により得られた筋特異的 Dicer 欠損マウスも生後直ちに死に至ることが報告されている (O'Rourke et al. 2007)。Ckmm は筋型クレアチンキナーゼであり、骨格筋および心筋にて発現が確認されている。さらに、胎児期 16 日目で成熟した筋に発現し、出生 1 日後には 10 倍程度に増加する。生後 14 日後で発現レベルは最大に達し、その後成体マウスの成熟した骨格筋において発現レベルを維持する (Trask et al. 1990)。一方で MyoD は、骨格筋細胞の運命決定および筋細胞への分化に必須のタンパク質群である MRF の 1 つであり、basic helix-Loop-helix (bHLH) 構造を持つ転写因子である (Davis et al. 1987)。MyoD

は、胎児期の 9.5 日目に筋前駆細胞に発現し、発生期に高い発現レベルを維持するが、成体においてその発現はほとんど確認されない (Sassoon et al. 1989). O'Rourke らは、MyoD-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスにおいて、骨格筋線維数の減少に伴う筋線維横断面積の増加や筋線維の形成異常、細胞死 (アポトーシス) の増加を報告している. これら MyoD-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスにおいて観察された表現型は、胎児期の E15.5 から E17.5 の時点において観察されている.

Ckmm が胎児期の 16 日目に発現を始めることから、MyoD-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスと SM-Dicer KO マウスの表現型は異なる可能性が推察される. また、Ckmm は心臓でも発現し、発生期の心臓特異的な Dicer の欠損は胎生致死に至ることから (Zhao et al. 2007, Chen et al. 2008), SM-Dicer KO マウスが死に生後数週間で死に至る要因として、心臓における Dicer 欠損の関与が示唆される.

発生期に Cre を発現するマウスとの交配による筋特異的 Dicer 欠損マウスでは、成熟した筋における運動適応を観察することは困難であったため、Cre<sup>ERT2</sup> システムを用いて、タモキシフェン誘導性に成熟した骨格筋において Dicer を欠損させる戦略を採用した. 全身性に Cre<sup>ERT2</sup> 遺伝子が発現する CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスと Dicer<sup>fllox</sup> マウスの交配により CAG-Cre<sup>ERT2</sup>; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウス (iDicer KO マウス) を作出した. Dicer の欠損を誘導するため、8 週齢の雄マウスに 5 日間連続でタモキシフェンを腹腔内投与した. その翌週に Dicer mRNA および筋

に豊富に存在するマイクロ RNA の発現を定量したところ、ヒラメ筋および足底筋における Dicer mRNA の顕著な減少が認められた (図 4B, C). さらに、筋に豊富に存在するマイクロ RNA を定量したところ、完全な減少ではないものの、ヒラメ筋においては 20~50%, 足底筋においては 20~30%の減少が確認された. そのため、これらのマウスに回転輪による 2 週間の自発走運動を行わせ、速筋である足底筋において骨格筋適応に関する表現型を解析した.

まず初めに、2 週間の自発走運動後において、遅筋優位なヒラメ筋の筋線維組成を観察したが、ジェノタイプ間、自発走運動の有無で筋線維タイプの組成に変化は認められなかった (図 10A, B). 遅筋線維の筋線維組成におけるマイクロ RNA の役割について、これまでに複数の研究でその関連性が示唆されている. miR-208b および miR-499 は、遅筋を構成する主要なミオシン重鎖である  $\beta$ -Myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) および Myosin heavy chain 7b (Myh7b) のイントロンにそれぞれコードされるマイクロ RNA であり、宿主遺伝子と同様、ヒラメ筋や心筋にその発現が確認され、腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋といった速筋優位な筋において発現は確認されない (van Rooij et al. 2009). これらマイクロ RNA それぞれのコンベンショナル KO マウス、ダブル KO マウス (dKO) および miR-499 のトランスジェニックマウス (miR-499 Tg) を用いて解析が行われた. その結果、dKO マウスにおいてはヒラメ筋における type I 線維の減少したのに対して、miR-499 Tg マウスにおいてはその増加が

認められた。さらに、miR-499 Tg マウスでは、ヒラメ筋および速筋優位な前脛骨筋において、 $\beta$ -MHC, Myh7b および心筋、骨格筋の収縮機構を構成する troponin I の発現が増加したことが報告された。一方で、心筋および骨格筋特異的に発現する miR-133a のコンベンショナル KO マウスにおいては、miR-208b/499 の dKO マウスとは相反するフェノタイプが報告されている。また、miR-133a-1/-2 のコンベンショナル dKO マウスの速筋では、中心核性ミオパチーの病態を示すとともに、酸素消費速度、脂質酸化の減少などのミトコンドリア機能障害も確認された (Liu et al. 2011)。このマウスのヒラメ筋の筋切片を解析したところ、type I 線維の数の増加が認められた。さらに、ウエスタンブロットにより MyHC I の発現増加、MyHC IIa, MyHC IIx/d, MyHC IIb のタンパク発現の減少が確認され、miR-133a コンベンショナル dKO マウスにおいては、遅筋線維の増加を示したことが報告された (Liu et al. 2011)。

しかしながら、この type I 線維の増加は、筋ジストロフィーにおいて観察されるミトコンドリア機能障害に対する代償的な応答である可能性があり (Cros et al. 1989, Wang et al. 1999), 中心核ミオパチーに伴う二次的な表現型である可能性も考慮する必要がある。これらの結果を踏まえると、本研究で用いたタモキシフェン誘導性 Dicer 欠損モデルでは、成熟マイクロ RNA のプロセシングに必須の酵素である Dicer の欠損に伴い、すべてのマイクロ RNA が減少したため (図 5A, B), 先行研究において報告されている、それぞれのマイクロ RNA 欠

損マウスによる表現型が相殺された可能性が推察される。さらに, iDicer KO マウスでは miR-133a および miR-208b, miR-499 の発現の減少は 20~50%程度であるのに対し, 先行研究のコンベンショナル KO マウスにおいては, ほぼ 100%の発現低下が確認されている (van Rooij et al. 2009, Liu et al. 2011). これらのことから, iDicer KO マウスにおいては, Dicer を欠損させた後においても成熟したマイクロ RNA が残存したことで表現型が観察されなかった可能性が推察される。

次に速筋優位な足底筋において, 筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生を組織染色およびウエスタンブロットにより観察したが, 筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生, さらに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 $\alpha$ , ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する COX IV の発現の増加は, いずれも WT マウスと同様, iDicer KO マウスにおいても観察された (図 10C-図 12D). 2016 年に, 前述した miR-133a-1/-2 のコンベンショナル dKO マウスを用いて, 持久性運動による骨格筋適応および運動耐容能についての表現型解析の結果が報告された (Nie et al. 2016). miR-133a dKO マウスにおいては, 急性のトレッドミル運動時の走行スピード, 時間, 距離が WT マウスと比較して減少しており, 運動耐容能の障害が示唆された。さらに, これらのマウスに対し 6 週間のトレッドミルによる持久性トレーニング (週 5 日, 1 日当たり 60 分, 14 m/min) を行わせ, 運動による筋線

維の遅筋化, ミトコンドリア新生を観察したところ, これらの適応が抑制されたことが示唆された. さらに, PGC-1 $\alpha$  およびそのホモログである PGC-1 $\beta$ , ミトコンドリア DNA の維持に必須の転写因子であるミトコンドリア転写因子 A (transcriptional factor A, mitochondrial: TFAM), ミトコンドリア DNA および核 DNA にコードされるミトコンドリア関連遺伝子を制御する転写因子である Nuclear respiratory factor 1 (NRF1) の遺伝子発現が抑制された. これら持久性運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生の抑制のメカニズムとして, miR-133a が標的とするインスリン様成長因子-1 受容体の発現増加による, Akt シグナルの活性化およびその下流に存在する転写因子 forkhead box protein O1 (FOXO1) による PGC-1 $\alpha$  の転写抑制が原因である可能性が示唆されている. 以上のことから Nie らは, miR-133a dKO マウスにおける筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生の抑制は, Akt シグナルの活性化による PGC-1 $\alpha$  の転写抑制が原因であると指摘している. しかしながら, 骨格筋特異的な PGC-1 $\alpha$  欠損マウスにおける解析から, 持久性運動による筋線維の遅筋化において, PGC-1 $\alpha$  は必須ではないことが明らかにされており (Geng et al. 2010), miR-133a dKO マウスにおける筋線維の遅筋化の抑制については, 異なるメカニズムを考慮する必要があるかもしれない. 一方で, 本研究においては, iDicer KO マウスにおいて筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生が WT マウスと同様に誘導されたことを, 組織染色およびウエスタンブ

ロットにより確認した。本研究と先行研究の大きな相違点の 1 つは実験モデルであり、本研究で用いた iDicer KO マウスでは、タモキシフェンの投与により Dicer の mRNA がほぼ完全に欠失したにも関わらず、miR-133a の発現レベルは 20%程度の減少に留まった。さらに、足底筋における miR-133a の発現レベルはタモキシフェン投与の 4 週間後においても 60%程度の減少に留まった。一方で、miR-133a dKO マウスにおいては、miR-133a は 100%に近い減少率であることが示されているため (Liu et al. 2011, Nie et al. 2016), 本研究と先行研究の表現型の相違は、マイクロ RNA の減少の程度に依存することが推察される。

## 第 2 節 骨格筋におけるマイクロ RNA の安定性

本研究では、グローバルにマイクロ RNA を欠損させるため、成熟マイクロ RNA のプロセシングに必須の酵素である Dicer を、成体マウスにおいて欠損させた。しかしながら、タモキシフェン投与の翌週に Dicer mRNA の 90%近い減少が確認されたにも関わらず、成熟マイクロ RNA の発現は最大でも 50%の減少に留まった (図 5)。さらに、驚くべきことに、タモキシフェン投与の 4 週間後に足底筋の成熟マイクロ RNA の発現を定量すると、約 50%のマイクロ RNA が未だに検出可能であった (図 6)。さらに、CAG-Cre<sup>ERT2</sup> トランスジーンは全身で発現するため、骨格筋において確認された成熟マイクロ RNA の高い安定性が、骨



骨格筋においてのみ存在するか否かを検討した。褐色脂肪および肝臓、小腸における Dicer mRNA および、それぞれの組織に豊富に存在するマイクロ RNA を定量した。褐色脂肪においては、タモキシフェン投与の 4 週間後において、Dicer mRNA の顕著な減少が認められた。その一方で、肝臓及び小腸においては Dicer mRNA の減少は僅かであった。さらに、褐色脂肪における成熟マイクロ RNA の発現レベルは骨格筋と同様に約 50%程度の減少に留まった。また、肝臓及び小腸においては、Dicer mRNA と同様、成熟マイクロ RNA の発現レベルにも変化は認められなかった。これらの結果から、タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスの骨格筋および褐色脂肪においては、Dicer 欠損の 4 週間後においても成熟マイクロ RNA は約 50%程度残存することが示された。

本研究と同様、先行研究において成熟マイクロ RNA が高い安定性を持つことが報告されている。小脳皮質に存在するプルキンエ細胞特異的な Dicer 欠損マウスを用いた検討では、Cre による組み換えが確認された 4 週齢の約 2 ヶ月後においても、miR-107, miR-134, miR-138, miR-143, miR-149, miR-212, miR-221, miR-329 が検出されたことが報告された (Schaefer et al. 2007)。また、心筋特異的に存在するミオシン重鎖タンパク質である  $\alpha$ -MHC のイントロンにコードされる miR-208a の発現レベルも高い安定性を保つことが報告されている。甲状腺ホルモン合成の阻害剤であるプロピルチオウラシル (PTU) による  $\alpha$ -MHC 発現阻害の

9 日後において、 $\alpha$ -MHC の発現レベルは完全に消失する一方、そのイントロンに存在する miR-208a の発現は同じ 9 日後において約 40%しか減少しておらず、その後も宿主遺伝子の完全な消失にも関わらず、薬理的阻害の 21 日後においても約 30%の発現レベルが確認された (van Rooij et al. 2007). さらに、肝臓特異的に存在する miR-122 においては、pri-miR-122 および pre-miR-122 の発現レベルは概日リズムを有し、1 日の中で 5 倍近い変動を示すのに対して、成熟した miR-122 の発現レベルは 1 日を通して安定した発現レベルを保つことから、pre-miRNA と成熟した miR-122 の発現レベルには乖離が認められた (Gatfield et al. 2009). これらのデータは、今回観察した骨格筋および褐色脂肪のみならず、脳や心臓、肝臓などの様々な組織において、ある特定の成熟したマイクロ RNA が安定した状態で存在することを示唆するデータである.

今回観察した、Dicer 欠損後における成熟マイクロ RNA の高い安定性について、そのメカニズムは明らかでない. また、成熟マイクロ RNA の安定性や分解の機構については、現在研究が発展しており、これらの分子メカニズムの解明が待たれる. しかしながら、いくつかの先行研究において、今回観察された *in vivo* における成熟マイクロ RNA の高い安定性に関するデータが *in vitro* の実験系において報告されている. 2012 年には、Dicer 欠損後の哺乳類細胞における成熟マイクロ RNA のターンオーバーに関する報告がなされ (Gantier et

al. 2011), マウス胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEF) における Dicer 欠損後の成熟マイクロ RNA の発現レベルおよびそれらから数学的モデルを用いて算出したマイクロ RNA の半減期は, 約 119 時間 (約 5 日) 程度であることが示唆された (Gantier et al. 2011).

また, 異なる研究では, 細胞の状態に依存してマイクロ RNA が安定性を保持することが示された. 非増殖性の静止期にある不死化された IL-3 依存的な造血幹細胞において, 成熟したマイクロ RNA は, RISC を構成するタンパク質の 1 である Argonaute タンパク質へロードされた形で細胞内に保持されることが示された. さらに, これらの Argonaute タンパク質と成熟マイクロ RNA の複合体は, 静止期では RISC を構成せず低分子量の複合体として存在する一方で, 増殖刺激により RISC を再構成し, 標的とする mRNA の翻訳抑制または翻訳を行うことが示された. また, この低分子量の複合体は, 静止期の細胞において, 少なくとも 3 週間は安定であることが示唆された (Olejniczak et al. 2013). このように, in vitro の実験からも, 成熟マイクロ RNA が高い安定性を持つ可能性が示唆されている.

以上の成熟マイクロ RNA の安定性制御機構に加え, 骨格筋における Dicer 欠損後の成熟マイクロ RNA の残存に寄与するメカニズムとして, Dicer 非依存的なマイクロ RNA の生合成および異なる組織からの循環中を介したマイクロ RNA の流入を考慮する必要がある. はじめに, Dicer 非依存的なマイクロ RNA の生合成について, これまでにいくつかの異なる

経路が報告されている。miR-451 は Dicer 非依存的なマイクロ RNA の 1 つであり、その成熟には Dicer を必要とせず、pre-miR-451 が直接、Argonaute protein 2 (Ago2) へロードされ、Ago2 の触媒活性によりプロセッシングを受けることが報告されている (Cheloufi et al. 2010, Cifuentes et al. 2010)。また近年では、同じく pre-miRNA が Ago2 へロードされ、エキソヌクレアーゼなどの何らかのメカニズムにより 3' strand がプロセッシングを受け、5' strand が ago 中へ存在することが報告された (Kim et al. 2016)。しかしながら、これらの Dicer 非依存的なプロセッシングを受けるマイクロ RNA はごく一部であると考えられており、Dicer 非依存的な成熟マイクロ RNA の合成経路が積極的に関与していることは考え難い。次に、循環中マイクロ RNA による異なる組織からの流入について、2017 年に、脂肪組織由来のマイクロ RNA が、細胞外小胞であるエクソソームへ包含された形で異なる組織へ流入し、その組織において遺伝子発現を制御し得る可能性が示唆された (Thomou et al. 2017)。これらのデータは、細胞内で産生されたマイクロ RNA が同細胞内における遺伝子発現を制御する古典的なマイクロ RNA の作用に加え、エクソソームへ包含された循環マイクロ RNA として異なる組織へ運ばれ、その組織において遺伝子発現および生理作用を制御し得る、マイクロ RNA を介した組織間のダイナミックな相互作用機構の存在を示唆するものである。本研究で、足底筋において発現を定量した miR-133a および miR-1 については、心臓においてもその発現

が確認されることから、これらの miRNA の流入の可能性は否定できない (Kim et al. 2006).

今回用いた CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスにおいて、肝臓および小腸では Dicer mRNA の減少が確認されなかった. Hayashi らは、CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスの組織ごとの Cre による組換え効率を、Rosa26 レポーターマウスとの交配により得られたマウスにおいて評価した. その結果、脳、心臓、腎臓、肺においては X-gal 染色によるシグナルが強く、組換え効率が高い可能性が示唆された一方、肝臓では X-gal による染色が弱いため、Cre<sup>ERT2</sup> による組換えの効率が低い可能性が示唆された (Hayashi et al. 2002). これらの結果から、本研究において、タモキシフェンを投与したにも関わらず肝臓における Dicer mRNA が変化しなかったのは、Cre による組換え効率の低さがその一因であると考えられる.

### 第3節 タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生

本研究で用いた iDicer KO マウスにおいて、運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生は、WT マウスと同様に誘導された一方、運動誘発性血管新生は抑制された. この iDicer KO マウスにおいて確認された運動誘発性血管新生のメカニズムについて、血管内皮細胞に原因があると仮説を立てた.

その根拠として、まず1点目に、今回用いた CAG-Cre<sup>ERT2</sup> マウスが持つ Cre<sup>ERT2</sup> トランス

ジーンは、chicken beta actin promoter/enhancer および cytomegalovirus (CMV) enhancer により制御されているため (Hayashi et al. 2002), 全身の組織において発現が確認されている。実際に血管内皮細胞を豊富に含む肺組織において Dicer mRNA の発現を確認すると、マイルドではあるがその減少を確認した (図 14)。

2 点目に、先行研究において、血管内皮細胞におけるマイクロ RNA は *in vitro*, *in vivo* の両方の実験系において、血管新生に必須の分子であることが報告されている。血管内皮細胞の培養細胞である HUVEC および EA.Hy.926 を用いた検討において、siRNA により Dicer をノックダウンした結果、ブロモデオキシウリジン (Bromodeoxyuridine: BrdU) により評価した細胞増殖およびマトリゲル上での管構造形成時の平均 cumulative tube length が減少したことが報告されている (Suarez et al. 2007)。また、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウス (Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>) を用いた解析では、VEGF 誘導性の血管新生、腫瘍中の毛細血管密度および下肢虚血による代償性血管新生のいずれもが抑制されたことが示された (Suarez et al. 2008)。

Dicer による血管新生の制御には、プロセッシングを受けるマイクロ RNA が重要な役割を担い、血管内皮細胞におけるマイクロ RNA も血管新生の調節因子であることが明らかにされている。血管内皮細胞に豊富に存在する miR-23 クラスターは、5 つのマイクロ RNA により構成されるが (miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b), それぞれのマイクロ RNA

が異なる遺伝子を制御することで内皮細胞における血管新生シグナルを協調的に調節していることが明らかにされている (Zhou et al. 2011, Biyashev et al. 2012, Urbich et al. 2012, Zhou et al. 2014). マイクロ RNA17-92 クラスターは、がんに関連するマイクロ RNA として同定されたポリシストロニックマイクロ RNA である (Mendell 2008). これらのマイクロ RNA は、VEGF 刺激により発現が増加し、がん抑制遺伝子である phosphatase and tensin homolog (PETN) の遺伝子発現を抑制することで、血管内皮細胞の増殖を調節することが報告された (Chamorro-Jorganes et al. 2016). 以上のことより、血管内皮細胞におけるマイクロ RNA は、細胞増殖や遊走といった細胞の機能を調節することで血管新生に寄与する、重要な分子であることが示唆されている.

3 点目に、運動誘発性血管新生に必須の分子である PGC-1 $\alpha$  のタンパク発現が、iDicer 欠損マウスの骨格筋においても WT マウスと同程度に増加したことが挙げられる (図 12). PGC-1 $\alpha$  は、転写因子である ERR $\alpha$  と共役し、血管内皮細胞の増殖および遊走を刺激する VEGF の転写を活性化することや (Arany et al. 2008, Chinsomboon et al. 2009), 分泌型リン酸タンパク質 SPP1 の分泌によりマイクロファージを活性化し、単球遊走因子 MCP-1 の分泌を促すことで、周皮細胞 pericyte や血管平滑筋細胞を細動脈および毛細血管の周囲に動員し血管の成熟を促進することが明らかにされている (Rowe et al. 2014). さらに、VEGF も運動

誘発性血管新生に必須のタンパク質であることが、骨格筋特異的 VEGF 欠損マウスを用いた検討により明らかにされている (Olfert et al. 2010). これら一連の研究から、PGC-1 $\alpha$  および VEGF を中心とした骨格筋におけるシグナルは、機能的な毛細血管の再構築に重要な役割を担うことが示唆される.

以上のことを踏まえると、運動による毛細血管新生という最終的な表現型に至るまでの細胞内、細胞間シグナル伝達において、骨格筋内のシグナルは正常に働いている一方で、その骨格筋のシグナルを受け取る、血管内皮細胞に何らかの原因があることが推察された. そこで、iDicer 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生の抑制が、血管内皮細胞の Dicer およびマイクロ RNA に起因するか検討するため、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを作製し、運動誘発性血管新生を評価することとした.

#### 第4節 血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスにおける表現型

タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおいて観察された、運動誘発性血管新生の抑制が、血管内皮細胞の Dicer およびマイクロ RNA に起因するか否かを検討するため、血管内皮細胞特異的な Dicer 欠損マウスを作出した. しかしながら、作出を試みた Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスは胎生致死であった. 先行研究において、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスが作



出され、成体マウスまで成長することが確認されている一方 (Suarez et al. 2008, Zhou et al. 2009), 同じく血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスが, 胎生期 E12.5 から E14.5 にかけて, 血管とリンパ管の分離不全, 浮腫, 出血が確認され, 胎生致死となることが報告された (Gauvrit et al. 2014). このような矛盾するデータが報告された一因として, それぞれの研究で用いられたマウスの系統の相違が考えられる. 2008 年および 2009 年に報告された, 成体マウスまで成長するとされる報告では, Dicer<sup>fllox</sup> マウスは Imperial College London のグループが作製したものであるのに対し, 本研究および Gauvrit らが報告した Dicer<sup>fllox</sup> マウスは, フロリダ大学のグループにより作製されている (O'Rourke et al. 2007). また, 独立したグループより作製された Dicer<sup>fllox</sup> マウスの詳細な差異は, Dicer1 遺伝子上の loxP 配列の位置である. Dicer は pre-miRNA が有するヘアピン構造を取り除き, 二本鎖 RNA を生成するため, 2 つの ribonuclease domain を有する (MacRae et al. 2007). Imperial College London のグループが作製した Dicer<sup>fllox</sup> マウスでは, loxP 配列は Dicer1 の ribonuclease III domain a に含まれるエクソン 20 および 21 を挟んでいるのに対し, 本研究で用いたフロリダ大学由来の Dicer<sup>fllox</sup> マウスについては, loxP 配列は ribonuclease III domain b に含まれるエクソン 24 の両側に挿入されている. そのため, 同じ Dicer1 遺伝子を欠損させているにも関わらず, 結果としてそれぞれ異なる exon, 如いては ribonuclease domain が欠損する. エクソン 24 を含む ribonuclease

III domain b は、ヘアピン構造の 5'側をプロセッシングすることが明らかにされている。この 5'側は guide strand と呼ばれ、成熟マイクロ RNA として Ago2 と RISC を形成し、passenger strand と呼ばれる 3'側と比べその生物学的活性がより高いことが報告されている (Ha and Kim. Nature review mol cell biol. 2014)。しかしながら、このような Dicer<sup>fllox</sup> マウスの loxP 配列の挿入位置の相違が、マイクロ RNA のプロセッシングおよび表現型に影響するか否かは定かではなく、さらなる検討および考察が必要である。

血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウス (Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウス) は胎生致死であったため、血管内皮細胞特異的 Dicer ヘテロ欠損マウス (Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/+</sup> マウス: Het) を用いて検討を行った。まず初めに、血管内皮細胞が豊富に存在する肺組織から RNA を抽出し、Dicer mRNA および血管内皮細胞特異的な miR-126 の発現を定量した。Dicer mRNA は有意な減少を示したのに対し、miR-126 の発現は WT マウスと Het マウスで顕著な差は認められなかった (図 13A-C)。また、これらのマウスに 2 週間の自発走運動を行わせ、運動誘発性血管新生を評価したが、WT マウスとの差は認められなかった (図 16)。本研究とは対照的に、褐色脂肪組織 (brown adipose tissue: BAT) 特異的な Dicer ヘテロ欠損マウス (UCP1-Cre; Dicer<sup>fl/+</sup>) においては、Dicer mRNA の発現はわずかな減少であるのに対し、BAT に豊富に存在する miR-193b および 365 の発現は 50%の減少が確認されている。さらに、これらのマウ

スにおいては、脱共役タンパク質の発現低下、寒冷曝露に対する抵抗性の低下、高脂肪食負荷による糖代謝異常の悪化等の表現型が示されている (Oliverio et al. 2016). これらの結果は、Dicer による成熟マイクロ RNA へのプロセッシング、およびこれらによる表現型への影響には、組織依存的な機能的冗長性が大きく異なる可能性を示唆するものである.

血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウスが胎生致死であったため、ホモ欠損マウスの作出を試みた. 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所実験動物研究資源バンクより分与を受けた VE-Cad-Cre マウスを Dicer<sup>fllox</sup> マウスと交配させることにより VE-Cad-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウス (EC-Dicer KO) を作出した. VE-Cadherin は血管内皮細胞特異的な細胞接着分子であり、Tie2 とは異なり、造血幹細胞系列への発現は認められるため、より血管内皮細胞特異的な Cre マウスである (Giannotta et al. 2013). ジェノタイピングの結果、VE-Cad-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup> マウスを得ることができた. しかしながら、肺組織において Dicer mRNA ならびにマイクロ RNA の発現を定量すると、WT マウスと EC-Dicer KO マウスの間で顕著な差は認められなかった (図 18, 19). 今回用いた VE-Cad-Cre マウスは、複数の独立した研究室から Cre マウスとして機能することが報告されていることから (Kogata et al. 2006, Iesato et al. 2013, Aspalter et al. 2015, Gao et al. 2016), 本研究において Dicer の mRNA の発現に変化が認められなかった原因は不明である. その要因の 1 つとして、Cre<sup>ERT2</sup> の発現レベルが影響し

ていると仮定し、同じく肺組織において Cre mRNA の発現を定量した (図 20)。しかしながら、その発現は、Tie2-Cre マウスと比較して VE-Cad-Cre マウスでやや低い傾向を示したものの、顕著な差ではなかった。肺組織は血管内皮細胞の他にも線維芽細胞や免疫系の細胞を多く含むため、肺組織よりフローサイトメトリーや抗体を用いて血管内皮細胞のみを単離し、より精密に血管内皮細胞の Dicer mRNA およびマイクロ RNA が減少しているか否かについて検討する必要があると考えられる。

以上のことより、血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスにおいては、2つのモデルマウスを用いて運動誘発性血管新生を評価することを試みたが、いずれもモデルマウスの問題により、表現型を観察することができなかった。このことから、血管内皮細胞特異的な Dicer 欠損マウスには、VE-Cad-Cre<sup>ERT2</sup> マウスや PDGFB-Cre<sup>ERT2</sup> マウスといったタモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Cre マウスを用いる必要があり、今後はこれらのマウスを用いてタモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを作出し、運動誘発性血管新生を評価する必要があると考えられる (Claxton et al. 2008, Pitulescu et al. 2010)。

## 第5節 miR-23 クラスターによる血管新生の制御

タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウスにおける運動誘発性血管新生の抑制のメカニズ

ムを明らかにするため、血管内皮細胞における Dicer に着目すると同時に、血管内皮細胞における miR-23 クラスターに着目し、Tie2-Cre マウス miR-23 クラスター<sup>flax</sup> マウスの交配により血管内皮細胞特異的に miR-23a クラスターおよび miR-23b クラスターの両方を欠損した二重欠損マウス (Tie2-Cre; miR-23a<sup>fl/fl</sup>/23b<sup>fl/fl</sup>; DKO) を作出した。これらのマウスを用いて、運動誘発性血管新生を初めとする血管新生に対する血管内皮細胞の miR-23 クラスターの影響を検討した。

DKO マウスは、際立った発育・発達異常も無く、成体マウスに成長した。ジェノタイプリングにより DKO マウスであることが確認され (図 23)、続いてマイクロ RNA の発現を定量した。血管内皮細胞を豊富に含む肺、大動脈、陰性コントロールとしてヒラメ筋における miR-23 クラスターの発現を確認した。肺においては、miR-23 クラスター内の全てのマイクロ RNA が有意な減少を示した。大動脈においては、有意ではないもののそれぞれのマイクロ RNA は減少し、さらに、肺と同様の減少パターンを示した (図 24)。肺組織および大動脈において、miR-23 クラスターのそれぞれのマイクロ RNA は最大でも 60%程度の減少に留まった (図 24)。これには、肺組織および大動脈中に血管内皮細胞以外の細胞が存在することが影響することが推察される。肺組織は、線維芽細胞や上皮細胞、免疫系の細胞が存在し、大動脈は平滑筋細胞および線維芽細胞を含むなど複数の細胞により構成されている。ま

た、miR-23 クラスターは血管内皮細胞に最も高く発現するものの、免疫系の細胞や線維芽細胞でもその発現は確認されている (Zhou et al. 2011). そのため、血管内皮細胞以外の細胞における miR-23 クラスターの発現により、完全な欠損が認められない可能性が推察される。

これらのマウスに 2 週間の自発走運動を行わせ、筋切片を用いて毛細血管新生を評価したが、WT マウスと DKO マウスの間に有意な差は観察されなかった (図 25). miR-23 クラスターはこれまで、主に *in vitro* の実験系において、血管新生を調節することが複数報告されている。しかしながら、*in vitro* の実験結果を *in vivo* で再現できるとは限らない。そこで、*in vivo* においては miR-23 クラスターの欠損は血管新生に影響を及ぼさない、という結論を支持するデータを補強するため、異なるコンテキストにおいて血管新生を評価した。はじめに、WT マウスおよび DKO マウスの背部に生検パンチにより全層欠損層を作製し、その創傷の治癒過程を観察することで血管新生の関与を評価した。創傷治癒過程においては、免疫系細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などの様々な細胞が関与する。中でも血管内皮細胞は、虚血となる創傷部位に新たな毛細血管を出芽させ、その部位で活性化される免疫系細胞や線維芽細胞へ酸素や栄養素を供給する役割を担う (Tonnesen et al. 2000). これまでに、血管内皮細胞特異的な遺伝子改変マウスを用いた検討から、血管内皮細胞における血管新生関連シグナルの制御は、創傷治癒過程に影響を及ぼすことが明らかにされている。例えば、血

管内皮細胞特定 PGC-1 $\alpha$  Tg マウスでは、血管新生時の tip cell および stalk cell の運命決定に重要な Notch シグナルの抑制により、血管新生の抑制および創傷治癒の遅延が認められた。対照的に血管内皮細胞特異的な PGC-1 $\alpha$  KO マウスでは、創傷治癒が促進することが示された (Sawada et al. 2014)。さらに、アデノシン代謝酵素であるアデノシンキナーゼの血管内皮細胞特異的な KO マウスにおいては、血管新生に関連する遺伝子発現のエピジェネティックな制御により血管新生を促進し、それに伴い創傷治癒も促進することが報告されている (Xu et al. 2017)。しかしながら本研究では、WT マウスおよび DKO マウスの間で、創傷治癒過程に顕著な差は認められなかった (図 26)。さらに、マウス大動脈を用いて血管内皮細胞の出芽を観察する ex vivo 大動脈リングアッセイを行なった。しかしながら、運動誘発性血管新生および創傷治癒と同様、大動脈リングからの血管内皮細胞の出芽についても、WT マウスと DKO マウスの間に顕著な差は認められなかった (図 27)。これらのデータから、DKO マウスでは、血管新生に関する顕著な表現型は観察されず、in vivo における miR-23 クラスターの欠損は血管新生に影響しないという結論を支持するものである。本研究において、DKO マウスにおいて、血管新生に関する顕著な表現型が得られなかった要因として、miR-23 クラスター内に属する個々のマイクロ RNA が血管新生に対して相反する作用を有することが挙げられる。これまでに、miR-23 および miR-27 については、血管新生を阻害する因

子である *sprouty 2* や *semaphorin 6A* を介して血管新生を促進する作用を有することが報告されている一方、*miR-24* はアクチン細胞骨格シグナルを調節し、細胞の運動性を制御することで血管新生を抑制する作用を有することが報告されている (Zhou et al. 2011, Urbich et al. 2012, Zhou et al. 2014). 今回用いた DKO マウスでは、*miR-23* クラスターに属する 5 つ全てのマイクロ RNA が欠損していることから (図 24), *in vivo* における *miR-23* クラスターの欠損により血管新生に対して顕著な影響が認められなかった要因の 1 つとして、血管新生に対して相反する作用を持つクラスター内のマイクロ RNA が、同時に減少したため、その作用が相殺されたためと推察される. *miR-23* クラスターに限らず、マイクロ RNA クラスター内のそれぞれのマイクロ RNA は、生物学的プロセスを制御するシグナル経路内の、異なる遺伝子を調節することで、その生物学的プロセスを協調的にコントロールすることが明らかにされている (Chen et al. 2006, el Azzouzi et al. 2013, Chamorro-Jorganes et al. 2016). また、*miR-23* または *miR-27* のノックダウンは、それぞれ *miR-27* または *miR-23* の代償的な発現増加を誘導し、*miR-23* および *miR-27* のノックダウンにより *miR-24* の発現増加が認められるなど (Zhou et al. 2011), クラスター内において 1 つのマイクロ RNA が阻害されると、その失われたマイクロ RNA の機能を補うために代償的にマイクロ RNA が増加していることが想定される. これらのことから、血管内皮細胞における *miR-23* クラスターは、血管新



生の促進ならびに抑制の両方を調節することで、血管新生という生物学的プロセスを協調的に制御している可能性が示唆された。

2016 年に Li らによって、miR-23 に関する非常に興味深い報告がなされた。miR-23a (AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC) と miR-23b (AUCACAUUGCCAGGGAUUACC) は、異なる染色体ならびにクラスターに属するマイクロ RNA であるが、2 塩基目から 8 塩基目までのシード配列は同一であり、異なるのはシード配列外の 18 塩基目のウリジン: U またはアデニン: A のみである。Li らは、この 1 塩基の違いにより標的遺伝子および血管新生への影響が異なる可能性を示唆した (Li et al. 2016)。miR-23a の過剰発現は、matrigel 上での HUVEC における管構造形成に影響しない一方、miR-23 の過剰発現は、管構造形成を抑制したことが報告された。さらに、同じシード配列を持つマイクロ RNA にも関わらず異なる作用を示した原因として、miR-23a と miR-23b の間で唯一異なる 18 塩基目が原因である可能性が示唆されている。miR-23a および miR-23b が標的とする、細胞接着分子 Junctional adhesion molecule (JAM-C) のタンパク発現は、miR-23a の過剰発現により顕著に減少するが、miR-23b の過剰発現によっては、有意ではあるものの僅かな減少であった。同様に、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、miR-23a により顕著にレポーター活性が抑制されたのに対し、miR-23b によるその抑制レベルは有意に低いことを示した。しかしながら、この miR-

23a と miR-23b による JAM-C のレポーター活性への影響は、シード配列外の 1 塩基の変異によりキャンセルされた。これらのことから、miR-23a と miR-23b はシード配列が同一であるにも関わらず、標的遺伝子の翻訳及び分解に影響しないと考えられているシード配列外の 1 塩基の違いが、翻訳抑制の効率に影響する可能性が示唆された。一方で、これらの研究においては、シード配列外の 1 塩基の違いにより標的遺伝子の翻訳抑制へ影響する可能性が示唆されたが、これらの相違が真に血管新生の表現型にまで影響を及ぼすかは明らかでなく、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

miR-23 クラスター欠損マウスを用いて、運動誘発性血管新生および創傷治癒、大動脈リングアッセイを表現型として解析した結果、WT マウスとの顕著な差は認められなかった。また、これらの結果には、相反する作用を有する miR-23 クラスター内の、個々のマイクロ RNA が同時に減少したことにより、それぞれの血管新生に対する作用が相殺された可能性が推察される。今後、培養細胞を用いて、これら *in vivo* で観察された結果を再現することができるか、検討を行なう必要があると考えられる。

## 第6章 総合討論

本研究では、持久性運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を探るため、成熟マイクロ RNA へのプロセシングへ必須の酵素である Dicer を欠損させたマウス（タモキシフェン誘導性 Dicer 欠損マウス: iDicer KO）を作出し、表現型を解析した。iDicer KO マウスの骨格筋において Dicer の mRNA は 90%近い KO 効率であったのに対し、成熟マイクロ RNA は最大でも 50%の減少に留まった。これらのマウスに2週間の自発走運動を行わせ、筋線維の遅筋化とミトコンドリア新生を評価したが、WT マウスと iDicer KO マウスの間に顕著な差は認められなかった。一方で、生体マウスでの全身的な Dicer の欠損により運動誘発性血管新生が抑制されたことが明らかとなった。

iDicer KO マウスにおいて観察された運動誘発性血管新生の抑制について、iDicer KO マウスは全ての組織・細胞で Dicer が欠損していること、先行研究において血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスでは血管新生が抑制されることが報告されていること、運動誘発性血管新生に必須の分子である PGC-1 $\alpha$  は iDicer KO マウスでも顕著に増加したことから、毛細血管を構成する血管内皮細胞に原因があると仮定し、血管内皮細胞のマイクロ RNA に着目し以降の検討を行った。2系統の Cre マウスを用いて血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスの作出を試みたが、血管内皮細胞特異的 Dicer ホモ欠損マウスを得ることはできなかった。運

運動誘発性血管新生の抑制における責任のマイクロ RNA を同定するため、miR-23 クラスターに着目した。miR-23 クラスターは血管内皮細胞に豊富に存在するマイクロ RNA であり、主に *in vitro* の実験系において、内皮細胞の増殖や遊走を調節することで血管新生に寄与することが明らかにされていた。そこで、Tie2-Cre マウスと miR-23 クラスター<sup>flox</sup> マウスの交配により血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウス (DKO) を作出した。DKO マウスに 2 週間の自発走運動を行わせたが、運動誘発性血管新生は WT マウスと同様に誘導された。さらに、毛細血管新生を異なるコンテキストで評価するため、創傷治癒試験および大動脈リングアッセイを行なったが、DKO マウスにおいて顕著な表現型は得られなかった。miR-23 クラスター内にコードされる個々のマイクロ RNA は、血管新生に対して相反する作用を有するため、クラスター単位での欠損によっては個々のマイクロ RNA の作用が相殺され、表現型が得られなかった可能性が考えられた。以上の結果から、iDicer KO マウスにおいて観察された運動誘発性血管新生の抑制には、異なる細胞やマイクロ RNA が寄与する可能性が示唆された。

iDicer 欠損マウスにおいて、運動誘発性血管新生が抑制された一方で、筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生は正常に誘導された。しかしながら、100%近い KO 効率を示す個々のマイクロ RNA のコンベンショナル KO マウスにおいては、筋の収縮・代謝特性の決定

に関する表現型が観察されている。そのため、本研究の結果から持久性運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生へのマイクロ RNA 関与を結論付けることはできないと考える。今後は、個々のマイクロ RNA を欠損するマウスまたは、Dicer 欠損以外の方法によりマイクロ RNA をグローバルに欠損させるモデルを用いて、持久性運動による骨格筋適応に関する表現型の解析を行なう必要があると考えられる。

iDicer KO マウスにおいて、Dicer 欠損後においても成熟マイクロ RNA が残存する詳細な分子メカニズムについては明らかでない。2017 年に、エンドヌクレアーゼ Tudor-SN が、成熟マイクロ RNA の特異的な配列を認識し切断すること、および Tudor-SN が RISC を構成するタンパク質の 1 つであることが明らかにされるなど、成熟マイクロ RNA のターンオーバーの制御メカニズムが徐々に明らかとなっている (Elbarbary et al. 2017)。これまでに、Dicer 非依存的なマイクロ RNA の生合成経路も報告されているものの、そのような経路でプロセッシングされるマイクロ RNA は特定かつ極僅かであるため、本研究の結果は、新たなマイクロ RNA 生合成経路、または成熟マイクロ RNA に高い安定性を付与するメカニズムの存在を示唆するデータである可能性が考えられる。

本研究では、iDicer KO マウスにおいて観察された運動誘発性血管新生の抑制が、血管内皮細胞のマイクロ RNA に起因すると推察し、実験を進めた。血管内皮細胞特異的 Dicer へ

テロ欠損マウスを用いた解析では、モデルの問題により顕著な表現型を得ることができなかったため、タモキシフェン誘導性の血管内皮細胞特異的 Dicer 欠損マウスを用いることで、実験モデルの問題は解決されることが予想され、今後の検討課題である。また、血管内皮細胞特異的 miR-23 クラスター欠損マウスにおいても、表現型を観察することはできなかった。これまでの複数の報告から、miR-23 クラスター内のマイクロ RNA は、一方のマイクロ RNA が血管新生を促進するのに対して、もう一方のマイクロ RNA が血管新生に抑制的に作用することで血管新生を fine-tuning している可能性が推察される。このことについて、今後 in vitro の実験系でクラスター単位での詳細な解析を行なう必要がある。また、本研究では、血管内皮細胞における miR-23 クラスターに着目し検討を進めたが、これまでに、miR-17-92 クラスターや miR-106b~25 クラスター等も血管新生を制御することから、miR-23 クラスター以外のマイクロ RNA が運動誘発性血管新生に関与する可能性も推察される。

最後に、本研究では血管内皮細胞のマイクロ RNA に着目し検討を行なったが、異なる細胞のマイクロ RNA の関与についても考慮する必要があると考える。近年、様々な組織に局在するマクロファージや (Fujiu et al. 2017, Hulsmans et al. 2017), 毛細血管の周囲を覆うペリサイトが、発生や疾患へ関与することが明らかにされ、注目を集めている (Chen et al. 2017, Kisler et al. 2017). マクロファージから分泌される secreted phosphoprotein 1 (SPP1) は、骨格

筋の機能的な毛細血管ネットワークの構築に必須であることや (Rowe et al. 2014), ペリサイトと血管内皮細胞の受容体を介した相互作用は, 発生時の網膜の血管新生を促進することや, 腫瘍中の血管新生を抑制することが明らかにされた (Teichert et al. 2017). 以上のことから, iDicer KO マウスの骨格筋における運動誘発性血管新生の抑制には, 血管内皮細胞のみでなく, マクロファージやペリサイトなどの細胞が関与する可能性も否定できず, 新たな運動誘発性血管新生のメカニズムとして, これらの細胞間コミュニケーションも興味深い研究領域であり, 今後の検討課題である.

## 第7章 結論

本研究は、筋線維の遅筋化やミトコンドリア新生、毛細血管新生などの持久性運動による骨格筋適応の分子メカニズムについて、マイクロ RNA による転写後調節の関与を明らかにすることを目的として検討を行なった。マイクロ RNA をグローバルに欠損させるため、成熟マイクロ RNA へのプロセッシングに必須の酵素である Dicer を欠損させたマウスを作製した。筋特異的な Dicer 欠損マウスは、寿命が生後数週間であるため、成体マウスでの解析が行えなかった。そこで、タモキシフェン誘導性 Cre マウスを用いて、タモキシフェン誘導性に成体マウスで Dicer を欠損するマウスを作出した。これらのマウスでは Dicer mRNA の発現は顕著に減少したが、予期せぬことに、筋に豊富に存在する成熟マイクロ RNA の発現は 20~50%の減少に留まったことから、骨格筋のマイクロ RNA は高い安定性を有する可能性が示唆された。また、生体マウスにおける Dicer の欠損は、持久性運動による筋線維の遅筋化およびミトコンドリア新生に影響を及ぼさなかった。しかしながら、マイクロ RNA が完全に欠損していない点を考慮すると、持久性運動による骨格筋適応におけるマイクロ RNA の役割を結論付けることはできず、個々のマイクロ RNA 欠損マウスなど、異なるモデルマウスでさらなる検討を行う必要があると考えられる。一方で、自発走運動に伴う毛細血管新生は Dicer の欠損により抑制された。この表現型の原因が毛細血管を構成する血管内皮細胞



にあると仮定し、血管内皮細胞特異的 *Dicer* 欠損マウス (*Tie2-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>*) を作出したが、このマウスは胎生致死であり、*VE-Cad-Cre; Dicer<sup>fl/fl</sup>* マウスについては *Dicer* の減少が認められなかった。並行して、運動誘発性血管新生抑制のメカニズムの責任となるマイクロ RNA を明らかにするため、*miR-23* クラスタに着目し、血管内皮細胞特異的な *miR-23* クラスタ一二重欠損マウスを作出した。これらのマウスに 2 週間の自発走運動を行わせたが、運動誘発性血管新生に顕著な表現型は観察されなかった。以上の結果から、運動誘発性血管新生において、血管内皮細胞の *miR-23* クラスタの役割は限定的であることが示唆された。これらの結果から、*Dicer* の欠損により得られた運動誘発性血管新生抑制のメカニズムには、異なる細胞のマイクロ RNA または血管内皮細胞における *miR-23* クラスタ以外のマイクロ RNA が関与する可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行し論文を作成するにあたり，親切丁寧なご指導を賜りました筑波大学体育系 前田清司教授，早稲田大学スポーツ科学学術院 秋本崇之教授に厚く御礼申し上げます。

研究の右も左もわからない私に実験手技を御指導頂きました，東京大学大学院医学系研究科・李ミンジョン氏に深く感謝申し上げます。また，本研究を遂行するにあたり，多大なご指導および励ましを頂きました早稲田大学筋生物学研究室内の佐古博皓氏，服部聡士氏，筑波大学前田研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

最後になりますが，いつも温かく見守ってくれた家族に心より深く感謝申し上げます。

## 参考文献

Akimoto, T., T. J. Ribar, R. S. Williams and Z. Yan (2004). "Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice." Am J Physiol Cell Physiol **287**(5): C1311-1319.

Aoi, W., Y. Naito, K. Mizushima, Y. Takanami, Y. Kawai, H. Ichikawa and T. Yoshikawa (2010). "The microRNA miR-696 regulates PGC-1 {alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(4): E799-806.

Arany, Z., S. Y. Foo, Y. Ma, J. L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S. M. Rangwala, K. H. Back, A. Rosenzweig and B. M. Spiegelman (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha." Nature **451**(7181): 1008-1012.

Aspalter, I. M., E. Gordon, A. Dubrac, A. Ragab, J. Narloch, P. Vizan, I. Geudens, R. T. Collins, C. A. Franco, C. L. Abrahams, G. Thurston, M. Fruttiger, I. Rosewell, A. Eichmann and H. Gerhardt (2015). "Alk1 and Alk5 inhibition by Nrpl controls vascular sprouting downstream of Notch." Nat Commun **6**: 7264.

Azacie, A., J. R. Fineman and Y. He (2006). "Sp3 inhibits Sp1-mediated activation of the cardiac troponin T promoter and is downregulated during pathological cardiac hypertrophy in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(2): H600-611.

Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly and J. O. Holloszy (2002).

"Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1."

FASEB J **16**(14): 1879-1886.

Baba, M., S. B. Hong, N. Sharma, M. B. Warren, M. L. Nickerson, A. Iwamatsu, D. Esposito, W. K. Gillette,

R. F. Hopkins, 3rd, J. L. Hartley, M. Furihata, S. Oishi, W. Zhen, T. R. Burke, Jr., W. M. Linehan, L. S.

Schmidt and B. Zbar (2006). "Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1,

and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15552-

15557.

Baek, D., J. Villen, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi and D. P. Bartel (2008). "The impact of microRNAs

on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.

Baker, M., S. D. Robinson, T. Lechertier, P. R. Barber, B. Tavora, G. D'Amico, D. T. Jones, B. Vojnovic

and K. Hodivala-Dilke (2011). "Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis." Nat Protoc **7**(1):

89-104.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease

in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.

Biyashev, D., D. Veliceasa, J. Topczewski, J. M. Topczewska, I. Mizgirev, E. Vinokour, A. L. Reddi, J. D.

Licht, S. Y. Revskoy and O. V. Volpert (2012). "miR-27b controls venous specification and tip cell fate."

Blood **119**(11): 2679-2687.

Boettger, T., S. Wust, H. Nolte and T. Braun (2014). "The miR-206/133b cluster is dispensable for development, survival and regeneration of skeletal muscle." Skelet Muscle **4**(1): 23.

Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." Science **324**(5935): 1710-1713.

Breen, E. C., E. C. Johnson, H. Wagner, H. M. Tseng, L. A. Sung and P. D. Wagner (1996). "Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise." J Appl Physiol (1985) **81**(1): 355-361.

Buller, A. J., J. C. Eccles and R. M. Eccles (1960). "Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb." J Physiol **150**: 399-416.

Calvo, J. A., T. G. Daniels, X. Wang, A. Paul, J. Lin, B. M. Spiegelman, S. C. Stevenson and S. M. Rangwala (2008). "Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake." J Appl Physiol (1985) **104**(5): 1304-1312.

Cao, Y. (2013). "Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity." Cell Metab **18**(4): 478-489.

Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis."

Nature **473**(7347): 298-307.

Carmeliet, P., N. Mackman, L. Moons, T. Luther, P. Gressens, I. Van Vlaenderen, H. Demunck, M. Kasper, G. Breier, P. Evrard, M. Muller, W. Risau, T. Edgington and D. Collen (1996). "Role of tissue factor in embryonic blood vessel development." Nature **383**(6595): 73-75.

Carroll, S. L., M. G. Klein and M. F. Schneider (1997). "Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres." J Physiol **501 ( Pt 3)**: 573-588.

Chamorro-Jorganes, A., M. Y. Lee, E. Araldi, S. Landskroner-Eiger, M. Fernandez-Fuertes, M. Sahraei, M. Quiles Del Rey, C. van Solingen, J. Yu, C. Fernandez-Hernando, W. C. Sessa and Y. Suarez (2016). "VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis." Circ Res **118**(1): 38-47.

Cheloufi, S., C. O. Dos Santos, M. M. Chong and G. J. Hannon (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." Nature **465**(7298): 584-589.

Chen, J., Y. Luo, H. Hui, T. Cai, H. Huang, F. Yang, J. Feng, J. Zhang and X. Yan (2017). "CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(36): E7622-E7631.

Chen, J. F., E. M. Mandel, J. M. Thomson, Q. Wu, T. E. Callis, S. M. Hammond, F. L. Conlon and D. Z. Wang (2006). "The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation." Nat Genet **38**(2): 228-233.

Chen, J. F., E. P. Murchison, R. Tang, T. E. Callis, M. Tatsuguchi, Z. Deng, M. Rojas, S. M. Hammond, M. D. Schneider, C. H. Selzman, G. Meissner, C. Patterson, G. J. Hannon and D. Z. Wang (2008). "Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2111-2116.

Chen, S., Y. Xue, X. Wu, C. Le, A. Bhutkar, E. L. Bell, F. Zhang, R. Langer and P. A. Sharp (2014). "Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis." Genes Dev **28**(10): 1054-1067.

Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-744.

Chin, E. R., E. N. Olson, J. A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J. M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type." Genes Dev **12**(16): 2499-2509.

Chinsomboon, J., J. Ruas, R. K. Gupta, R. Thom, J. Shoag, G. C. Rowe, N. Sawada, S. Raghuram and Z. Arany (2009). "The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21401-21406.

Chong, M. M., G. Zhang, S. Cheloufi, T. A. Neubert, G. J. Hannon and D. R. Littman (2010). "Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery." Genes Dev **24**(17): 1951-1960.

Cifuentes, D., H. Xue, D. W. Taylor, H. Patnode, Y. Mishima, S. Cheloufi, E. Ma, S. Mane, G. J. Hannon,

N. D. Lawson, S. A. Wolfe and A. J. Giraldez (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." Science **328**(5986): 1694-1698.

Claxton, S., V. Kostourou, S. Jadeja, P. Chambon, K. Hodivala-Dilke and M. Fruttiger (2008). "Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium." Genesis **46**(2): 74-80.

Cobb, B. S., T. B. Nesterova, E. Thompson, A. Hertweck, E. O'Connor, J. Godwin, C. B. Wilson, N. Brockdorff, A. G. Fisher, S. T. Smale and M. Merkenschlager (2005). "T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer." J Exp Med **201**(9): 1367-1373.

Cros, D., P. Harnden, J. F. Pellissier and G. Serratrice (1989). "Muscle hypertrophy in Duchenne muscular dystrophy. A pathological and morphometric study." J Neurol **236**(1): 43-47.

Cruys, B., B. W. Wong, A. Kuchnio, D. Verdegem, A. R. Cantelmo, L. C. Conradi, S. Vandekeere, A. Bouche, I. Cornelissen, S. Vinckier, R. M. Merks, E. Dejana, H. Gerhardt, M. Dewerchin, K. Bentley and P. Carmeliet (2016). "Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis." Nat Commun **7**: 12240.

Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." Cell **51**(6): 987-1000.

Delavar, H., L. Nogueira, P. D. Wagner, M. C. Hogan, D. Metzger and E. C. Breen (2014). "Skeletal myofiber VEGF is essential for the exercise training response in adult mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **306**(8): R586-595.

Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary



microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.

Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell and A. Thomas-Tikhonenko (2006). "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster." Nat Genet **38**(9): 1060-1065.

Dioufa, N., A. V. Schally, I. Chatzistamou, E. Moustou, N. L. Block, G. K. Owens, A. G. Papavassiliou and H. Kiaris (2010). "Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18611-18615.

el Azzouzi, H., S. Leptidis, E. Dirks, J. Hoeks, B. van Bree, K. Brand, E. A. McClellan, E. Poels, J. C. Sluimer, M. M. van den Hoogenhof, A. S. Armand, X. Yin, S. Langley, M. Bourajjaj, S. Olieslagers, J. Krishnan, M. Vooijs, H. Kurihara, A. Stubbs, Y. M. Pinto, W. Krek, M. Mayr, P. A. da Costa Martins, P. Schrauwen and L. J. De Windt (2013). "The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a approximately 214 targets myocardial PPARdelta and impairs mitochondrial fatty acid oxidation." Cell Metab **18**(3): 341-354.

Elbarbary, R. A., K. Miyoshi, J. R. Myers, P. Du, J. M. Ashton, B. Tian and L. E. Maquat (2017). "Tudor-SN-mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G1/S phase transition." Science **356**(6340): 859-862.

Fang, L., Z. Deng, T. Shatseva, J. Yang, C. Peng, W. W. Du, A. J. Yee, L. C. Ang, C. He, S. W. Shan and B. Yang (2011). "MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8." Oncogene **30**(7): 806-821.

Farh, K. K., A. Grimson, C. Jan, B. P. Lewis, W. K. Johnston, L. P. Lim, C. B. Burge and D. P. Bartel (2005).

"The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution." Science **310**(5755): 1817-1821.

Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-442.

Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.

Fitzsimons, D. P., G. M. Diffie, R. E. Herrick and K. M. Baldwin (1990). "Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles." J Appl Physiol (1985) **68**(5): 1950-1955.

Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos and G. L. Semenza (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol **16**(9): 4604-4613.

Fraisl, P., M. Mazzone, T. Schmidt and P. Carmeliet (2009). "Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism." Dev Cell **16**(2): 167-179.

Fujiu, K., M. Shibata, Y. Nakayama, F. Ogata, S. Matsumoto, K. Noshita, S. Iwami, S. Nakae, I. Komuro, R. Nagai and I. Manabe (2017). "A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation." Nat Med **23**(5): 611-622.

Gailly, P., B. Boland, B. Himpens, R. Casteels and J. M. Gillis (1993). "Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice." Cell Calcium **14**(6): 473-483.

Gan, Z., J. Rumsey, B. C. Hazen, L. Lai, T. C. Leone, R. B. Vega, H. Xie, K. E. Conley, J. Auwerx, S. R. Smith, E. N. Olson, A. Kralli and D. P. Kelly (2013). "Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism." J Clin Invest **123**(6): 2564-2575.

Gantier, M. P., C. E. McCoy, I. Rusinova, D. Saulep, D. Wang, D. Xu, A. T. Irving, M. A. Behlke, P. J. Hertzog, F. Mackay and B. R. Williams (2011). "Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation." Nucleic Acids Res **39**(13): 5692-5703.

Gao, F., S. Artham, H. Sabbineni, A. Al-Azayzih, X. D. Peng, N. Hay, R. H. Adams, T. V. Byzova and P. R. Somanath (2016). "Akt1 promotes stimuli-induced endothelial-barrier protection through FoxO-mediated tight-junction protein turnover." Cell Mol Life Sci **73**(20): 3917-3933.

Gatfield, D., G. Le Martelot, C. E. Vejnar, D. Gerlach, O. Schaad, F. Fleury-Olela, A. L. Ruskeepaa, M. Oresic, C. C. Esau, E. M. Zdobnov and U. Schibler (2009). "Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression." Genes Dev **23**(11): 1313-1326.

Gauvrit, S., J. Philippe, M. Lesage, M. Tjwa, I. Godin and S. Germain (2014). "The role of RNA interference in the developmental separation of blood and lymphatic vasculature." Vasc Cell **6**(1): 9.

Geng, T., P. Li, M. Okutsu, X. Yin, J. Kwek, M. Zhang and Z. Yan (2010). "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**(3): C572-579.

Giannotta, M., M. Trani and E. Dejana (2013). "VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity." Dev Cell **26**(5): 441-454.

Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann and K. Rajewsky (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-106.

Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-840.

Gute, D., C. Fraga, M. H. Laughlin and J. F. Amann (1996). "Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats." J Appl Physiol (1985) **81**(2): 619-626.

Hagberg, C. E., A. Falkevall, X. Wang, E. Larsson, J. Huusko, I. Nilsson, L. A. van Meeteren, E. Samen, L. Lu, M. Vanwildemeersch, J. Klar, G. Genove, K. Pietras, S. Stone-Elander, L. Claesson-Welsh, S. Yla-Herttuala, P. Lindahl and U. Eriksson (2010). "Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake." Nature **464**(7290): 917-921.

Hagiwara, N., B. Ma and A. Ly (2005). "Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the Sox6 mutant, p100H." Dev Dyn **234**(2): 301-311.

Hagiwara, N., M. Yeh and A. Liu (2007). "Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice." Dev Dyn **236**(8): 2062-2076.

Hamada, K., T. Sasaki, P. A. Koni, M. Natsui, H. Kishimoto, J. Sasaki, N. Yajima, Y. Horie, G. Hasegawa, M. Naito, J. Miyazaki, T. Suda, H. Itoh, K. Nakao, T. W. Mak, T. Nakano and A. Suzuki (2005). "The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis." Genes Dev **19**(17): 2054-2065.

Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.

Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-1150.

Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang and V. N. Kim (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.

Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 251-262.

Hasumi, H., M. Baba, Y. Hasumi, M. Furuya and M. Yao (2016). "Birt-Hogg-Dube syndrome: Clinical and molecular aspects of recently identified kidney cancer syndrome." Int J Urol **23**(3): 204-210.

Hawley, J. A., M. Hargreaves, M. J. Joyner and J. R. Zierath (2014). "Integrative biology of exercise." Cell **159**(4): 738-749.

Hayashi, S. and A. P. McMahon (2002). "Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-

inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse." Dev Biol **244**(2): 305-318.

Hazarika, S., C. R. Farber, A. O. Dokun, A. N. Pitsillides, T. Wang, R. J. Lye and B. H. Annex (2013). "MicroRNA-93 controls perfusion recovery after hindlimb ischemia by modulating expression of multiple genes in the cell cycle pathway." Circulation **127**(17): 1818-1828.

He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature **435**(7043): 828-833.

Heidersbach, A., C. Saxby, K. Carver-Moore, Y. Huang, Y. S. Ang, P. J. de Jong, K. N. Ivey and D. Srivastava (2013). "microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart." Elife **2**: e01323.

Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt and C. Betsholtz (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.

Hennig, R. and T. Lomo (1985). "Firing patterns of motor units in normal rats." Nature **314**(6007): 164-166.

Herbert, S. P. and D. Y. Stainier (2011). "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel

morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 551-564.

Hoh, J. F. (1975). "Selective and non-selective reinnervation of fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle." J Physiol **251**(3): 791-801.

Hoppeler, H., P. Luthi, H. Claassen, E. R. Weibel and H. Howald (1973). "The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers." Pflugers Arch **344**(3): 217-232.

Huang, J. and C. D. Kontos (2002). "PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects." J Biol Chem **277**(13): 10760-10766.

Hulsmans, M., S. Clauss, L. Xiao, A. D. Aguirre, K. R. King, A. Hanley, W. J. Hucker, E. M. Wulfers, G. Seemann, G. Courties, Y. Iwamoto, Y. Sun, A. J. Savol, H. B. Sager, K. J. Lavine, G. A. Fishbein, D. E. Capen, N. Da Silva, L. Miquerol, H. Wakimoto, C. E. Seidman, J. G. Seidman, R. I. Sadreyev, K. Naxerova, R. N. Mitchell, D. Brown, P. Libby, R. Weissleder, F. K. Swirski, P. Kohl, C. Vinegoni, D. J. Milan, P. T. Ellinor and M. Nahrendorf (2017). "Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart." Cell **169**(3): 510-522 e520.

Icli, B., A. K. Wara, J. Moslehi, X. Sun, E. Plovie, M. Cahill, J. F. Marchini, A. Schissler, R. F. Padera, J. Shi, H. W. Cheng, S. Raghuram, Z. Arany, R. Liao, K. Croce, C. MacRae and M. W. Feinberg (2013). "MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling." Circ Res **113**(11): 1231-1241.

Iesato, Y., Y. Toriyama, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, T. Yoshizawa, T. Koyama, R. Uetake, L. Yang, A. Yamauchi, M. Tanaka, K. Igarashi, T. Murata and T. Shindo (2013). "Adrenomedullin-RAMP2 system is crucially involved in retinal angiogenesis." Am J Pathol **182**(6): 2380-2390.

Ji, X., J. Kong, R. P. Carstens and S. A. Liebhaber (2007). "The 3' untranslated region complex involved in stabilization of human alpha-globin mRNA assembles in the nucleus and serves an independent role as a splice enhancer." Mol Cell Biol **27**(9): 3290-3302.

Jongpiputvanich, S., T. Sueblinvong and T. Norapucsunton (2005). "Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases." J Clin Neurosci **12**(4): 426-428.

Kim, H. K., Y. S. Lee, U. Sivaprasad, A. Malhotra and A. Dutta (2006). "Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation." J Cell Biol **174**(5): 677-687.

Kim, Y. K., B. Kim and V. N. Kim (2016). "Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(13): E1881-1889.

Kisanuki, Y. Y., R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson and M. Yanagisawa (2001). "Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo." Dev Biol **230**(2): 230-242.

Kisler, K., A. R. Nelson, S. V. Rege, A. Ramanathan, Y. Wang, A. Ahuja, D. Lazic, P. S. Tsai, Z. Zhao, Y. Zhou, D. A. Boas, S. Sakadzic and B. V. Zlokovic (2017). "Pericyte degeneration leads to neurovascular



uncoupling and limits oxygen supply to brain." Nat Neurosci **20**(3): 406-416.

Kogata, N., Y. Arai, J. T. Pearson, K. Hashimoto, K. Hidaka, T. Koyama, S. Somekawa, Y. Nakaoka, M. Ogawa, R. H. Adams, M. Okada and N. Mochizuki (2006). "Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization." Circ Res **98**(7): 897-904.

Koni, P. A., S. K. Joshi, U. A. Temann, D. Olson, L. Burkly and R. A. Flavell (2001). "Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow." J Exp Med **193**(6): 741-754.

Kubis, H. P., E. A. Haller, P. Wetzel and G. Gros (1997). "Adult fast myosin pattern and Ca<sup>2+</sup>-induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4205-4210.

Kuehbachner, A., C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." Circ Res **101**(1): 59-68.

Lee, M. Y., A. K. Luciano, E. Ackah, J. Rodriguez-Vita, T. A. Bancroft, A. Eichmann, M. Simons, T. R. Kyriakides, M. Morales-Ruiz and W. C. Sessa (2014). "Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(35): 12865-12870.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim

(2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.

Leick, L., Y. Hellsten, J. Fentz, S. S. Lyngby, J. F. Wojtaszewski, J. Hidalgo and H. Pilegaard (2009). "PGC-1alpha mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E92-103.

Leslie, J. D., L. Ariza-McNaughton, A. L. Bermange, R. McAdow, S. L. Johnson and J. Lewis (2007). "Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis." Development **134**(5): 839-844.

Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.

Li, J., Y. Zhao, Y. Lu, W. Ritchie, G. Grau, M. A. Vadas and J. R. Gamble (2016). "The Poly-cistronic miR-23-27-24 Complexes Target Endothelial Cell Junctions: Differential Functional and Molecular Effects of miR-23a and miR-23b." Mol Ther Nucleic Acids **5**(8): e354.

Lin, J., H. Wu, P. T. Tarr, C. Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby and B. M. Spiegelman (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." Nature **418**(6899): 797-801.

Liu, J., X. Liang, D. Zhou, L. Lai, L. Xiao, L. Liu, T. Fu, Y. Kong, Q. Zhou, R. B. Vega, M. S. Zhu, D. P. Kelly, X. Gao and Z. Gan (2016). "Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrip1/AMPK circuit." EMBO Mol Med **8**(10): 1212-1228.

Liu, N., S. Bezprozvannaya, J. M. Shelton, M. I. Frisard, M. W. Hulver, R. P. McMillan, Y. Wu, K. A. Voelker, R. W. Grange, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2011). "Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy." J Clin Invest **121**(8): 3258-3268.

Liu, N., A. H. Williams, Y. Kim, J. McAnally, S. Bezprozvannaya, L. B. Sutherland, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2007). "An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20844-20849.

Lobov, I. B., R. A. Renard, N. Papadopoulos, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (2007). "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3219-3224.

MacRae, I. J., K. Zhou and J. A. Doudna (2007). "Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer." Nat Struct Mol Biol **14**(10): 934-940.

Margolis, L. M., H. L. McClung, N. E. Murphy, C. T. Carrigan and S. M. Pasiakos (2017). "Skeletal Muscle myomiR Are Differentially Expressed by Endurance Exercise Mode and Combined Essential Amino Acid and Carbohydrate Supplementation." Front Physiol **8**: 182.

Mason, S. D., H. Rundqvist, I. Papandreou, R. Duh, W. J. McNulty, R. A. Howlett, I. M. Olfert, C. J. Sundberg, N. C. Denko, L. Poellinger and R. S. Johnson (2007). "HIF-1alpha in endurance training: suppression of oxidative metabolism." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(5): R2059-2069.

McKinsey, T. A., C. L. Zhang, J. Lu and E. N. Olson (2000). "Signal-dependent nuclear export of a histone

deacetylase regulates muscle differentiation." Nature **408**(6808): 106-111.

McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson (2000). "Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14400-14405.

Mehlem, A., I. Palombo, X. Wang, C. E. Hagberg, U. Eriksson and A. Falkevall (2016). "PGC-1alpha Coordinates Mitochondrial Respiratory Capacity and Muscular Fatty Acid Uptake via Regulation of VEGF-B." Diabetes **65**(4): 861-873.

Mendell, J. T. (2008). "miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease." Cell **133**(2): 217-222.

Mishra, P. and D. C. Chan (2014). "Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(10): 634-646.

Mohamed, J. S., A. Hajira, P. S. Pardo and A. M. Boriak (2014). "MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1alpha network in skeletal muscle." Diabetes **63**(5): 1546-1559.

Naumann, M., K. Reiners, R. Gold, R. Schindler, W. Paulus, T. Klopstock and H. Reichmann (1995). "Mitochondrial dysfunction in adult-onset myopathies with structural abnormalities." Acta Neuropathol **89**(2): 152-157.

Naya, F. J., B. Mercer, J. Shelton, J. A. Richardson, R. S. Williams and E. N. Olson (2000). "Stimulation

of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo." J Biol Chem **275**(7): 4545-4548.

Nie, Y., Y. Sato, C. Wang, F. Yue, S. Kuang and T. P. Gavin (2016). "Impaired exercise tolerance, mitochondrial biogenesis, and muscle fiber maintenance in miR-133a-deficient mice." FASEB J **30**(11): 3745-3758.

Nurmi, H., P. Saharinen, G. Zarkada, W. Zheng, M. R. Robciuc and K. Alitalo (2015). "VEGF-C is required for intestinal lymphatic vessel maintenance and lipid absorption." EMBO Mol Med **7**(11): 1418-1425.

O'Rourke, J. R., S. A. Georges, H. R. Seay, S. J. Tapscott, M. T. McManus, D. J. Goldhamer, M. S. Swanson and B. D. Harfe (2007). "Essential role for Dicer during skeletal muscle development." Dev Biol **311**(2): 359-368.

Ojuka, E. O., T. E. Jones, D. H. Han, M. Chen and J. O. Holloszy (2003). "Raising Ca<sup>2+</sup> in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle." FASEB J **17**(6): 675-681.

Olejniczak, S. H., G. La Rocca, J. J. Gruber and C. B. Thompson (2013). "Long-lived microRNA-Argonaute complexes in quiescent cells can be activated to regulate mitogenic responses." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(1): 157-162.

Olfert, I. M., R. A. Howlett, P. D. Wagner and E. C. Breen (2010). "Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **299**(4): R1059-1067.

Oliverio, M., E. Schmidt, J. Mauer, C. Baitzel, N. Hansmeier, S. Khani, S. Konieczka, M. Pradas-Juni, S.

Brodesser, T. M. Van, D. Bartsch, H. S. Bronneke, M. Heine, H. Hilpert, E. Tarcitano, G. A. Garinis, P. Frommolt, J. Heeren, M. A. Mori, J. C. Bruning and J. W. Kornfeld (2016). "Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and function." Nat Cell Biol **18**(3): 328-336.

Olson, E. N. and R. S. Williams (2000). "Calcineurin signaling and muscle remodeling." Cell **101**(7): 689-692.

Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida and M. Seto (2004). "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma." Cancer Res **64**(9): 3087-3095.

Otsuka, M., M. Zheng, M. Hayashi, J. D. Lee, O. Yoshino, S. Lin and J. Han (2008). "Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice." J Clin Invest **118**(5): 1944-1954.

Parsons, S. A., B. J. Wilkins, O. F. Bueno and J. D. Molkentin (2003). "Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice." Mol Cell Biol **23**(12): 4331-4343.

Pilegaard, H., B. Saltin and P. D. Neufer (2003). "Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle." J Physiol **546**(Pt 3): 851-858.

Pitulescu, M. E., I. Schmidt, R. Benedito and R. H. Adams (2010). "Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice." Nat Protoc **5**(9): 1518-1534.

Potthoff, M. J., H. Wu, M. A. Arnold, J. M. Shelton, J. Backs, J. McAnally, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2007). "Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the

formation of slow-twitch myofibers." J Clin Invest **117**(9): 2459-2467.

Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.

Rajewsky, N. and N. D. Socci (2004). "Computational identification of microRNA targets." Dev Biol **267**(2): 529-535.

Rao, A., C. Luo and P. G. Hogan (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-747.

Rao, P. K., R. M. Kumar, M. Farkhondeh, S. Baskerville and H. F. Lodish (2006). "Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8721-8726.

Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz and G. Ruvkun (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-906.

Reyes, N. L., G. B. Banks, M. Tsang, D. Margineantu, H. Gu, D. Djukovic, J. Chan, M. Torres, H. D. Liggitt, S. D. Hirenallur, D. M. Hockenbery, D. Raftery and B. M. Iritani (2015). "Fnip1 regulates skeletal muscle fiber type specification, fatigue resistance, and susceptibility to muscular dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(2): 424-429.

Richardson, R. S., E. A. Noyszewski, K. F. Kendrick, J. S. Leigh and P. D. Wagner (1995). "Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise. Evidence of limited O<sub>2</sub> transport." J Clin Invest **96**(4): 1916-1926.

Roca, C. and R. H. Adams (2007). "Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling." Genes Dev **21**(20): 2511-2524.

Rockl, K. S., M. F. Hirshman, J. Brandauer, N. Fujii, L. A. Witters and L. J. Goodyear (2007). "Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift." Diabetes **56**(8): 2062-2069.

Rowe, G. C., S. Raghuram, C. Jang, J. A. Nagy, I. S. Patten, A. Goyal, M. C. Chan, L. X. Liu, A. Jiang, K. C. Spokes, D. Beeler, H. Dvorak, W. C. Aird and Z. Arany (2014). "PGC-1alpha induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle." Circ Res **115**(5): 504-517.

Russell, A. P., J. Feilchenfeldt, S. Schreiber, M. Praz, A. Crettenand, C. Gobelet, C. A. Meier, D. R. Bell, A. Kralli, J. P. Giacobino and O. Deriaz (2003). "Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle." Diabetes **52**(12): 2874-2881.

Russell, A. P., S. Lamon, H. Boon, S. Wada, I. Guller, E. L. Brown, A. V. Chibalin, J. R. Zierath, R. J. Snow, N. Stepto, G. D. Wadley and T. Akimoto (2013). "Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training." J Physiol **591**(18): 4637-4653.

Russell, A. P., S. Wada, L. Vergani, M. B. Hock, S. Lamon, B. Leger, T. Ushida, R. Cartoni, G. D. Wadley, P. Hespel, A. Kralli, G. Soraru, C. Angelini and T. Akimoto (2013). "Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Dis **49**: 107-117.



Safdar, A., A. Abadi, M. Akhtar, B. P. Hettinga and M. A. Tarnopolsky (2009). "miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice." PLoS One **4**(5): e5610.

Sakamoto, K., A. McCarthy, D. Smith, K. A. Green, D. Grahame Hardie, A. Ashworth and D. R. Alessi (2005). "Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction." EMBO J **24**(10): 1810-1820.

Sassoon, D., G. Lyons, W. E. Wright, V. Lin, A. Lassar, H. Weintraub and M. Buckingham (1989). "Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis." Nature **341**(6240): 303-307.

Sawada, N., A. Jiang, F. Takizawa, A. Safdar, A. Manika, Y. Tesmenitsky, K. T. Kang, J. Bischoff, H. Kalwa, J. L. Sartoretto, Y. Kamei, L. E. Benjamin, H. Watada, Y. Ogawa, Y. Higashikuni, C. W. Kessinger, F. A. Jaffer, T. Michel, M. Sata, K. Croce, R. Tanaka and Z. Arany (2014). "Endothelial PGC-1alpha mediates vascular dysfunction in diabetes." Cell Metab **19**(2): 246-258.

Sayed, D. and M. Abdellatif (2011). "MicroRNAs in development and disease." Physiol Rev **91**(3): 827-887.

Schaefer, A., D. O'Carroll, C. L. Tan, D. Hillman, M. Sugimori, R. Llinas and P. Greengard (2007). "Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs." J Exp Med **204**(7): 1553-1558.

Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). "Fiber types in mammalian skeletal muscles." Physiol Rev **91**(4): 1447-1531.

Semo, J., R. Sharir, A. Afek, C. Avivi, I. Barshack, S. Maysel-Auslender, Y. Krelin, D. Kain, M. Entin-Meer, G. Keren and J. George (2014). "The 106b approximately 25 microRNA cluster is essential for neovascularization after hindlimb ischaemia in mice." Eur Heart J **35**(45): 3212-3223.

Serra, H., I. Chivite, A. Angulo-Urarte, A. Soler, J. D. Sutherland, A. Arruabarrena-Aristorena, A. Ragab, R. Lim, M. Malumbres, M. Fruttiger, M. Potente, M. Serrano, A. Fabra, F. Vinals, O. Casanovas, P. P. Pandolfi, A. Bigas, A. Carracedo, H. Gerhardt and M. Graupera (2015). "PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis." Nat Commun **6**: 7935.

Simons, R. W. (1988). "Naturally occurring antisense RNA control--a brief review." Gene **72**(1-2): 35-44.

Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. S. Pober and W. C. Sessa (2007). "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells." Circ Res **100**(8): 1164-1173.

Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. Yu, S. A. Gerber, K. D. Harrison, J. S. Pober, M. L. Iruela-Arispe, M. Merkenschlager and W. C. Sessa (2008). "Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14082-14087.

Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Breant, A. Duarte and A. Eichmann (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3225-3230.

Sun, Y., D. Cui, Z. Zhang, Q. Zhang, L. Ji and S. Ding (2016). "Voluntary wheel exercise alters the levels of miR-494 and miR-696 in the skeletal muscle of C57BL/6 mice." Comp Biochem Physiol B Biochem

Mol Biol **202**: 16-22.

Sweetman, D., K. Goljanek, T. Rathjen, S. Oustanina, T. Braun, T. Dalmay and A. Munsterberg (2008). "Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133." Dev Biol **321**(2): 491-499.

Teichert, M., L. Milde, A. Holm, L. Stanicek, N. Gengenbacher, S. Savant, T. Ruckdeschel, Z. Hasanov, K. Srivastava, J. Hu, S. Hertel, A. Bartol, K. Schlereth and H. G. Augustin (2017). "Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation." Nat Commun **8**: 16106.

Thomou, T., M. A. Mori, J. M. Dreyfuss, M. Konishi, M. Sakaguchi, C. Wolfrum, T. N. Rao, J. N. Winnay, R. Garcia-Martin, S. K. Grinspoon, P. Gorden and C. R. Kahn (2017). "Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues." Nature **542**(7642): 450-455.

Tonnesen, M. G., X. Feng and R. A. Clark (2000). "Angiogenesis in wound healing." J Investig Dermatol Symp Proc **5**(1): 40-46.

Trask, R. V. and J. J. Billadello (1990). "Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs." Biochim Biophys Acta **1049**(2): 182-188.

Urbich, C., D. Kaluza, T. Fromel, A. Knau, K. Bennewitz, R. A. Boon, A. Bonauer, C. Doebele, J. N. Boeckel, E. Hergenreider, A. M. Zeiher, J. Kroll, I. Fleming and S. Dimmeler (2012). "MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A." Blood **119**(6): 1607-1616.

van Rooij, E., D. Quiat, B. A. Johnson, L. B. Sutherland, X. Qi, J. A. Richardson, R. J. Kelm, Jr. and E. N. Olson (2009). "A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance." Dev Cell **17**(5): 662-673.

van Rooij, E., L. B. Sutherland, X. Qi, J. A. Richardson, J. Hill and E. N. Olson (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." Science **316**(5824): 575-579.

Ventura, A., A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp and T. Jacks (2008). "Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters." Cell **132**(5): 875-886.

Wada, S., Y. Kato, M. Okutsu, S. Miyaki, K. Suzuki, Z. Yan, S. Schiaffino, H. Asahara, T. Ushida and T. Akimoto (2011). "Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy." J Biol Chem **286**(44): 38456-38465.

Wada, S., Y. Kato, S. Sawada, K. Aizawa, J. H. Park, A. P. Russell, T. Ushida and T. Akimoto (2015). "MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle." Pflugers Arch **467**(2): 389-398.

Wang, J. F., J. Forst, S. Schroder and J. M. Schroder (1999). "Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **9**(3): 150-158.

Wang, L., X. Chen, Y. Zheng, F. Li, Z. Lu, C. Chen, J. Liu, Y. Wang, Y. Peng, Z. Shen, J. Gao, M. Zhu and H. Chen (2012). "MiR-23a inhibits myogenic differentiation through down regulation of fast myosin heavy chain isoforms." Exp Cell Res **318**(18): 2324-2334.

Wang, S., A. B. Aurora, B. A. Johnson, X. Qi, J. McAnally, J. A. Hill, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2008). "The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis." Dev Cell **15**(2): 261-271.

Wang, Y., R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch and R. Blelloch (2007). "DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal." Nat Genet **39**(3): 380-385.

Waters, R. E., S. Rotevatn, P. Li, B. H. Annex and Z. Yan (2004). "Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(5): C1342-1348.

Westerblad, H. and D. G. Allen (1991). "Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers." J Gen Physiol **98**(3): 615-635.

Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.

Wu, H., S. B. Kanatous, F. A. Thurmond, T. Gallardo, E. Isotani, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2002). "Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK." Science **296**(5566): 349-352.

Wu, H., B. Rothermel, S. Kanatous, P. Rosenberg, F. J. Naya, J. M. Shelton, K. A. Hutcheson, J. M. DiMaio, E. N. Olson, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2001). "Activation of MEF2 by muscle activity is

mediated through a calcineurin-dependent pathway." EMBO J **20**(22): 6414-6423.

Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.

Xu, Y., Y. Wang, S. Yan, Y. Zhou, Q. Yang, Y. Pan, X. Zeng, X. An, Z. Liu, L. Wang, J. Xu, Y. Cao, D. J. Fulton, N. L. Weintraub, Z. Bagi, M. N. Hoda, X. Wang, Q. Li, M. Hong, X. Jiang, D. Boison, C. Weber, C. Wu and Y. Huo (2017). "Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in endothelial cells to promote angiogenesis." EMBO Mol Med **9**(9): 1263-1278.

Xu, Y., C. Zhao, X. Sun, Z. Liu and J. Zhang (2015). "MicroRNA-761 regulates mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle in response to exercise." Biochem Biophys Res Commun **467**(1): 103-108.

Yang, J. S., T. Maurin, N. Robine, K. D. Rasmussen, K. L. Jeffrey, R. Chandwani, E. P. Papapetrou, M. Sadelain, D. O'Carroll and E. C. Lai (2010). "Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15163-15168.

Yang, W. J., D. D. Yang, S. Na, G. E. Sandusky, Q. Zhang and G. Zhao (2005). "Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development." J Biol Chem **280**(10): 9330-9335.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.

Zhang, X., X. Zuo, B. Yang, Z. Li, Y. Xue, Y. Zhou, J. Huang, X. Zhao, J. Zhou, Y. Yan, H. Zhang, P. Guo,

H. Sun, L. Guo, Y. Zhang and X. D. Fu (2014). "MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation." Cell **158**(3): 607-619.

Zhao, Y., J. F. Ransom, A. Li, V. Vedantham, M. von Drehle, A. N. Muth, T. Tsuchihashi, M. T. McManus, R. J. Schwartz and D. Srivastava (2007). "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2." Cell **129**(2): 303-317.

Zhao, Y., E. Samal and D. Srivastava (2005). "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis." Nature **436**(7048): 214-220.

Zhou, L., K. H. Seo, H. Z. He, R. Pacholczyk, D. M. Meng, C. G. Li, J. Xu, J. X. She, Z. Dong and Q. S. Mi (2009). "Tie2cre-induced inactivation of the miRNA-processing enzyme Dicer disrupts invariant NKT cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10266-10271.

Zhou, Q., C. Anderson, H. Zhang, X. Li, F. Inglis, A. Jayagopal and S. Wang (2014). "Repression of choroidal neovascularization through actin cytoskeleton pathways by microRNA-24." Mol Ther **22**(2): 378-389.

Zhou, Q., R. Gallagher, R. Ufret-Vincenty, X. Li, E. N. Olson and S. Wang (2011). "Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(20): 8287-8292.

Zong, H., J. M. Ren, L. H. Young, M. Pypaert, J. Mu, M. J. Birnbaum and G. I. Shulman (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy

deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15983-15987.