2　運動応答性マイクロRNAによる老化の調節	秋本　崇之

【目的】すでに超高齢社会を迎えた我が国を含め、先進諸国において人口の高齢化が進んでおり、高齢者の健康問題のみならず介護・医療費の増加による経済的負担の増加、生産年齢人口の低下等が大きな社会課題となっており、これらに対応することが世界的にも喫緊の課題となっている。我々はこれまでに、身体運動によって発現の変化するマイクロRNA（miRNA）を複数同定し、これらのうちいくつかの遺伝子改変マウスを作製してきた。本研究では、我々の研究室で作製したあるマイクロ RNA の遺伝子改変マウス（以下 KO マウス）において偶然見出された「老化加速」表現型を解析し、そのメカニズムを検討するための予備的検討を行った。

【方法】マウスの一般的な表現型を明らかにするために、出生率、体重変化、平均寿命、摂餌量、運動量、心拍数、血圧を継続的に測定し、これらを KO マウスと対照群マウス（以下 WT マウス）間で比較した。さらにこれらのマウスの老化度を評価するために 16、32、52 週齢時に Frailty index の測定を行った。

【結果】KO マウスは WT と同様な出生率で生まれてきたが、12 週齢以降ですでに脱毛や体毛の白色化、Kyphosis（脊柱後弯）を認めた（図）。KO マウスの平均寿命は、雄性 31.16±3.55 週と雌性 34.89±5.37 週であり、WT の雄性（130.17±7.52 週）と雌性（124±8.87 週）に比べて極端に短かった。またこれらのマウスは筋力の低下と顕著な Frailty index の増加を示し、KO マウスでは著しく老化が加速されていることが分かった。さらに、KO マウスでは WT より体重が小さく、活動量の減少、そして心拍数及び血圧の低下が認められた。今後これらのマウスの老化加速の表現型を誘導する分子メカニズムについて検討する予定である。

miRNA 欠損マウスに認められる老化加速表現型



2. 運動応答性マイクロ RNA による老化の調節

秋本　崇之

早稲田大学 スポーツ科学学術院

Key words：ノンコーディング RNA，加齢，セネッセンス，早老症，Progeria

緒　言

すでに超高齢社会を迎えた我が国を含め、先進諸国において人口の高齢化が進んでおり、高齢者の健康問題のみならず介護・医療費の増加による経済的負担の増加、生産年齢人口の低下等が大きな社会課題となっており、これらに対応することが世界的にも喫緊の課題となっている。このような超高齢社会の到来の中で、従来の制度では対応しきれない問題が生じ、社会的な変革の必要性が叫ばれていると同時に、「老化」の生物学的本質やそのプロセスに関する科学的なエビデンス、またサクセスフル・エイジングを達成するための介入等がこれまで以上に注目されている。

ヒトをはじめ生物個体は必ず老化のプロセスをたどる。老化の原因を解明することは、老化関連疾病の対策発見が期待でき、高齢者の健康増進のみならず、介護や医療に費やされる社会保障費の削減のためも必要であると考えられる。現在までに、老化の原因に関する仮説（老化仮説）として、プログラム説、活性酸素説、テロメア説、遺伝子修復エラー説など様々な仮説が提案されているものの、高等生物の動物個体における老化を説明できる仮説は存在せず、老化の原因はいまだ解明されていない。

我々はこれまでに、身体運動によって発現の変化するマイクロ RNA（miRNA）を複数同定し、これらのうちいくつかの遺伝子改変マウスを作製してきた。本研究では、我々の研究室で作製したあるマイクロ RNA の遺伝子改変マウスにおいて偶然見出された「老化加速」表現型を解析することを目的とした。

方　法

明期（09:00～21:00）と暗期（21:00～09:00）が設定された飼育室にて自由摂食・自由摂水の条件でマウスを飼育し、以下の観察・測定を行った。

1. 出生率、体重変化、寿命、Frailty index

生まれてきたマウスのジェノタイプを確認し、KO マウスとその littermate の数を数えて出生率を計算した。また、2 週齢から 20 週齢までの期間に週 1 回体重測定行った。マウスが自然死した日を記録し、各マウスの寿命を計算した。また老化表現型を評価するために、16、32、52 週齢時に Frailty index［1］について評価した。

2. 筋力

マウスが掴めるグリッドが装着された筋力測定機（DST-50N、Imada Co., Ltd）を用いた。マウスの上肢をグリッドに掴ませ、マウスの手がグリッドから離れるまでに水平に引き伸ばした。この過程を 3 回 3 セット行い［2］、得られた筋力を体重で補正した。

3. 摂餌量、活動量

体重変化が大きくない 18～22 週齢の期間にマウスを個別飼育して摂餌量と活動量の測定を行った。摂餌量は、飼育室の明期が始まった直後と暗期が始まった直後に餌の量を測定し、餌の減少量を計算して求めた。活動量は、体内埋め込み式運動量計測装置（nanotag ®、キッセイコムテック製）を用いて測定した。3 軸加速度センサにより、単位時間（5 分）当たりに閾値を超えた振動数を活動量としてカウントした。カウント数が 0 の時点を非活動時間として計算した。

4. 心拍数、 血圧

収縮期血圧、拡張期血圧及び心拍数の測定は、非観血式血圧計（BP-98A-L、ソフトロン社、東京）を用いて行った。1 週間の馴化後、1 個体につき 3 回以上測定を行い、その平均値を算出した。

結果及び考察

1. マウスの出生率と体重変化

現在までに生まれてきた 232 匹のマウスの中、遺伝子改変（KO）マウスは 100 匹（43%）であり、メンデルの法則に近い比率で生まれてきた（表 1）。成長に伴う体重変化を観察した結果、雄性、雌性マウスともに 2 週齢から 20 週齢まで KO マウスの体重が対照群（WT）マウスに比べて有意に小さかった（図 1）。これらのことから、この miRNA KO マウスでは発達・成長の遅滞が示唆された。

表1. マウスの出生率

マウス	KO	littermates
匹数（%）	100（43%）	132（57%）

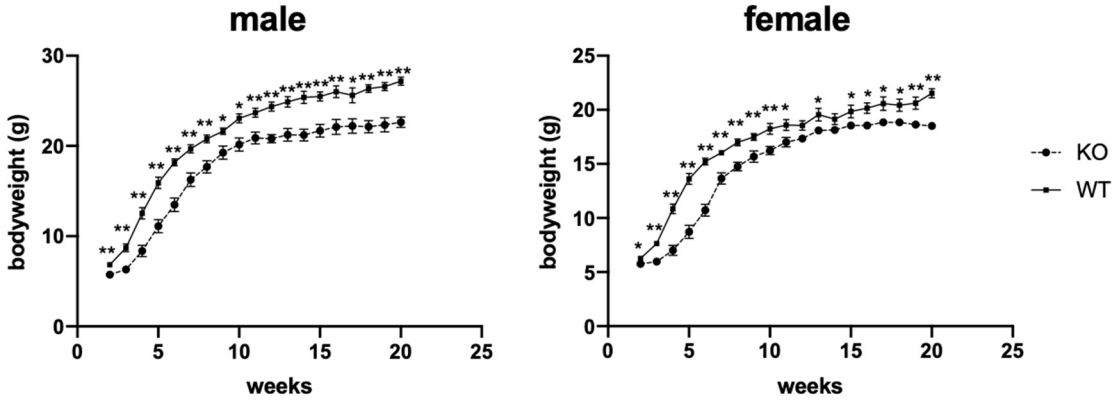


図1. miRNA KOマウスの体重変化

遺伝子改変マウス（KO）と野生型マウス（WT）の2週齢から20週齢までの体重変化を示す。雄性（male）マウス、雌性（female）マウス。タイムポイントごとに各群 n＝6～20のマウスを測定した。統計処理は2限配置分散分析を行い、Tukey法による多重比較を行った。データは平均値±SEMで示した。*P＜0.05、**P＜0.01 vs WT。

2. 寿命と Frailty index

KO マウスの平均寿命は、雄性 31.16±3.55 週と雌性 34.89±5.37 週であり、WT の雄性（130.17±7.52 週）と雌性（124±8.87 週）に比べて有意に短かった。生存期間の中央値（Median survival time）も KO マウス（雄性：33 週、雌性：47.5 週）が WT マウス（雄性：133 週、雌性：123 週）よりも有意に短かった（図 2）。また、KO マウスでは 12 週齢以降ですでに脱毛や体毛の白色化、Kyphosis（脊柱後弯）を認めた。さらに、KO マウスにおいて 16、32、52 週齢のマウスでの frailty index がそれぞれの WT マウスよりも有意に高いことが認められた（図 3）。これらのことから、この KO マウスでは老化現象が加速しており、結果的に寿命が短縮することが示唆された。

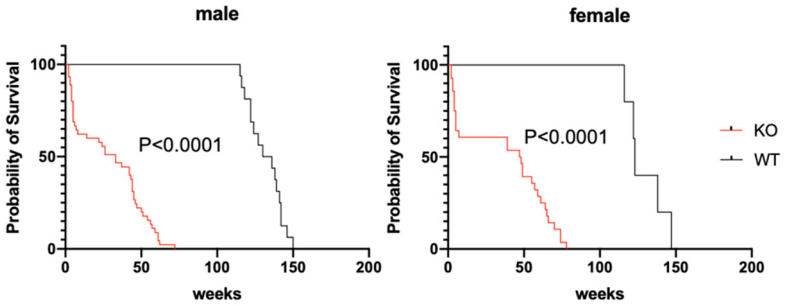


図2. miRNA KOマウスの生存率

雄性（male）と雌性（female）マウスのKaplan-Meier曲線。Male KO（n＝45）、male WT（n＝16）、female KO（n＝28）、female WT（n＝5）。統計処理はLog-rank（Mantel-Cox）テストを行った。

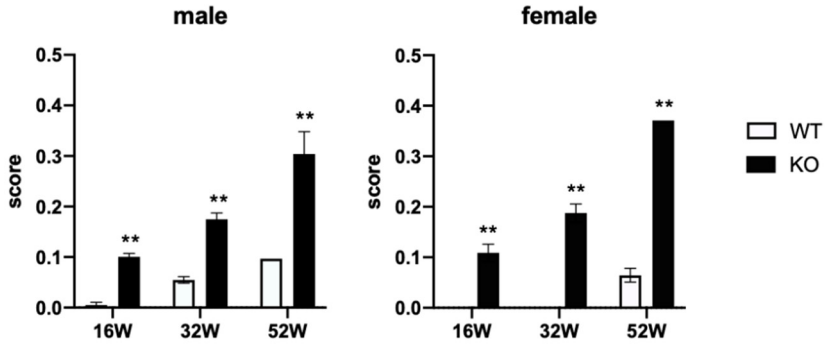


図3. miRNA KOマウスにおけるFrailty indexの変化

雄性（male）と雌性（female）の16週齢（16W）、32週齢（32W）、52週齢（52W）のマウスのFrailty indexを示した。 統計処理は、週齢ごとに両群間のt検定を行った。データは平均値±SEMで示した。**P＜0.01 vs WT。

3. 筋力

16 週齢の KO マウスは WT マウスに比べ体重あたりの筋力（N/g）が低下する傾向を示したが、雄性マウスでは有意水準に達せず、雌性マウスでのみ有意であった（図 4）。これには KO マウスの体重が WT マウスに比べ低いことも影響していると考えられる。

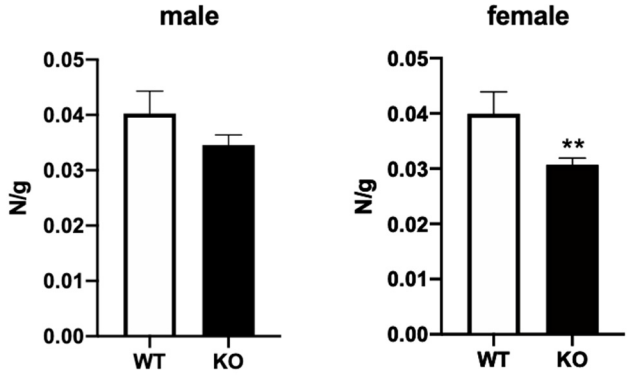


図4. miRNA KOマウスにおける筋力の変化

16週齢の雄性（male）と雌性（female）マウスの筋力を示した。統計処理は、t検定を行った。データは平均値±SEMで示した。N＝6～15。*P＜0.01 vs WT。

4. 摂餌量と活動量

現在まで得られたデータでは、体重あたりの総摂餌量に KO マウスと WT マウスに有意な差は認められなかった（図 5）。活動量については、明期（09:00～21:00）では差がなかったが、マウスの活動期である暗期（21:00～09:00）では KO マウスで WT マウスより減少する傾向が見られた（図 6）。

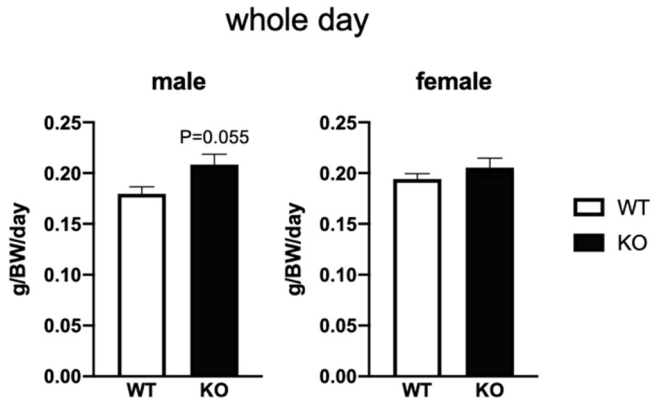


図5. miRNA KOマウスにおける摂餌量の変化
雄性（male）と雌性（female）マウスの、一日中の総摂餌量を示した。統計処理は、両群間のt検定を行った。データは平均値±SEMで示した。N＝2～6。

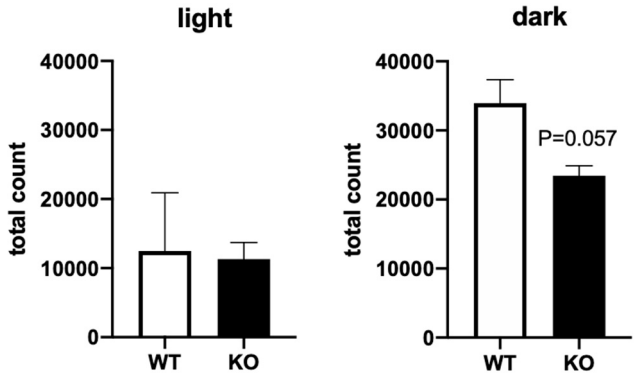


図6. miRNA KOマウスにおける活動量の変化
雄性WT（n＝2）とKO（n＝2）マウスの明期（light）と暗期（dark）の活動量を示した。統計処理は、t検定を行った。データは平均値±SEMで示した。

5. 心拍数と血圧

雄性 KO マウスは WT に比べて低い心拍数を示し、雌性 KO マウスの心拍数も WT より低い傾向を示した（図 7）。また、KO マウスは WT に比べて有意に低い収縮期（SBP）、拡張期（DBP）、平均血圧（MBP）を示した（図 8）。

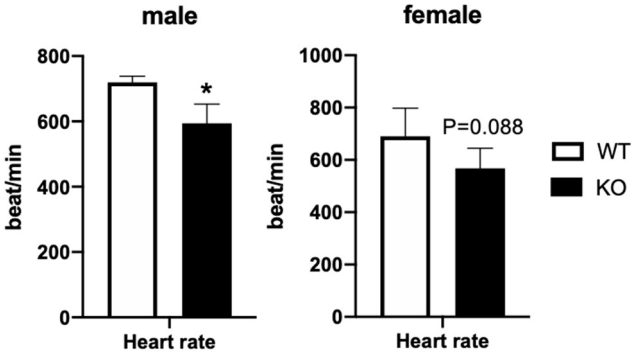


図 7. miRNA KO マウスにおける心拍数の変化

雄性（male）と雌性（female）マウスの心拍数を示した。統計処理は、t検定を行った。データは平均値±SEMで示した。N＝3～6。*P＜0.05 vs WT。

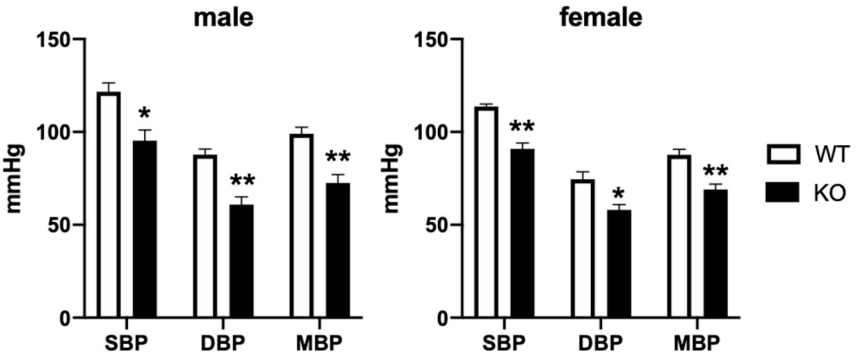


図 8. miRNA KO マウスにおける血圧の変化

雄性（male）と雌性（female）マウスの収縮期（SBP）、拡張期（DBP）、平均血圧（MBP）を示した。統計処理は、t検定を行った。データは平均値±SEMで示した。N＝3～6。*P＜0.05、**P＜0.01 vs WT。

謝　辞

本研究は上原記念生命科学財団の研究助成によって行われた。ここに記して感謝の意を表す。

文　献

1） Whitehead JC, Hildebrand BA, Sun M, Rockwood MR, Rose RA, Rockwood K, Howlett SE. A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014 Jun;69(6):621-32. doi: 10.1093/gerona/glt136. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24051346; PMCID: PMC4022099.

2） Oikawa S, Lee M, Motohashi N, Maeda S, Akimoto T. An inducible knockout of Dicer in adult mice does not affect endurance exercise-induced muscle adaptation. Am J Physiol Cell Physiol. 2019 Feb 1;316(2):C285-C292. doi: 10.1152/ajpcell.00278.2018. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30540495.