

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19824

研究課題名(和文)サルコペニア合併虚血性心疾患に対する心臓-骨格筋連関の機序解明および治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of cross-talk mechanism between heart and skeletal-muscle in ischemic heart disease with sarcopenia

研究代表者

早坂 太希 (Hayasaka, Taiki)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10838543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの心筋虚血後に尾懸垂でサルコペニアを誘導したマウスは心収縮能の回復が阻害された。血清中のエクソソーム中マイクロRNA解析で、miR-16-5pが有意に上昇していた。ラット新生仔から単離した心筋細胞(NRVMs)に対して低酸素培養した上でmiR-16-5pを遺伝子導入したところ、直接的なターゲットであるSESN1の転写が阻害され、さらに下流のmTOR活性化を介してオートファジーが低下、アポトーシスを促進させた。miR-16-5pはサルコペニア誘導によって骨格筋および心筋から分泌され、SESN1-mTOR経路を介したアポトーシス促進が心機能回復不全を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋萎縮を有する心疾患患者の予後は悪いことが知られており、虚血性心疾患後の不活動に伴う筋萎縮に対してはリハビリテーションの重要性が臨床的に明らかとなっていた。しかしながら、骨格筋萎縮が心疾患に与える悪影響についての詳細なメカニズムの詳細は不明だった。今回我々はmiR-16-5pの分泌を介したSESN1-mTOR経路がサルコペニアを合併した虚血性心疾患のアポトーシス亢進を起こすという、心臓微小環境の新たなメカニズムを明らかとした。miR-16-5pはサルコペニア合併心疾患の予後予測マーカーのみならず、これを介した虚血性心疾患の増悪経路に対する新たな治療ターゲットの可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel sarcopenia induced cardiac repair disturbance mouse model induced by tail suspension (TS) after cardiac ischemia and reperfusion (I/R). Importantly, we identified a specific exosomal microRNA marker, miR 16 5p, in the circulating exosomes of I/R TS mice. Of note, sarcopenia after I/R disturbed cardiac repair and raised the level of circulating exosomal miR 16 5p secreting from both the atrophic limbs and heart of TS mice. Likewise, miR 16 5p mimic plasmid disturbed cardiac repair in I/R mice directly. Additionally, in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) cultured in vitro under hypoxic conditions in the presence of a miR 16 5p mimic, we observed increased apoptosis, and also clarified that autophagosomes were decreased via SESN1 transcript interference mediated mTOR activation. In conclusion, we show the pro apoptotic effect of sarcopenia derived miR 16 5p, which may be behind the exacerbation of myocardial infarction.

研究分野：心臓微小環境

キーワード：サルコペニア マイクロRNA 心疾患 心筋骨格筋連関

## 1. 研究開始当初の背景

加齢・廃用によるサルコペニアは、特に心疾患に合併するとその予後を不良とし、さらに高齢慢性心不全では高率にサルコペニアを合併すると報告されている。重度の心疾患患者、さらに高齢者においては原疾患の治療のみならず、骨格筋と心臓等、臓器連関をターゲットとした多面的なアプローチによる治療が重要である。近年、心疾患に対する臨床的アプローチとして従前の安静を前提とした治療から、有酸素運動と低強度レジスタンス運動を併用し心筋酸素消費を軽減させる心臓リハビリテーションの重要性が認識されている。一部では骨格筋で心保護作用のある FSTL-1 や FGF21 が生成され、これら因子が心機能に好影響を与える可能性も報告されているが、サルコペニア自体が直接心疾患に与える影響およびその機序についての詳細は未だ解明されていない。これには心筋と骨格筋の臓器連関を詳細に解析する適切な病態モデルの確立が必須であり、従来手法ではその解決は困難であった。

心疾患患者に対する心臓リハビリテーション手法の開発・普及は進んでいるが、重度な心疾患を抱える中でサルコペニア・フレイルを伴い運動強度を骨格筋萎縮の改善が得られる程上げることができない状況をしばしば経験する。このような患者において臓器障害(心機能)の増悪はいかに進むのか、またその介入方法についての研究が求められていた。

## 2. 研究の目的

サルコペニアは骨格筋萎縮によって引き起こされる病態であり、サルコペニアを合併した心疾患患者の予後が悪いことが報告されている。しかしながら、適切な疾患モデルの実験系がなく、その機序については十分に解明されてはいない。本研究の目的は、心筋虚血後マウスに下肢骨格筋萎縮を誘導することで、サルコペニア合併虚血性心疾患において心機能修復障害をきたす疾患モデルを確立し、その機序を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

**【方法 1】**マウスの左冠動脈を開胸直視下で 45 分間結紮した後開放し、虚血再灌流(I/R; Ischemic/Reperfusion)モデルを作成した。その翌日から 2 群に分け、一方には尾懸垂装置を用いて 7 日間の下肢免荷による骨格筋萎縮の誘導を行った。この群を I/R-TS(+)群(TS; Tail Suspension)とし、もう一方は対照群として通常のゲージで飼育した(I/R-TS(-)群)。I/R 手術前、術翌日、8 日、29 日に心エコーによる心機能解析および下腿の筋力計測をおこなった。また、骨格筋および心臓については組織学的検討を行った。

虚血心と萎縮骨格筋の関連について調べるため、循環血中のエクソソームに内包されるマイクロ RNA に着目し、I/R 手術後尾懸垂 7 日目の検体で網羅的解析を行った。抽出された複数のマイクロ RNA を両群全頭の定量的 PCR 法により再検証し、同定されたマイクロ RNA を本研究のターゲットとしてさらに**【方法 2】****【方法 3】**の実験を計画した。

**【方法 2】**ラット新生仔から心筋細胞を単離、初代培養を行った。このラット心筋細胞に対して、1%O<sub>2</sub> 低酸素培養条件下でアポトーシスを誘導、さらに miR-16-5p mimic を遺伝子導入し、その影響を検証した。アポトーシス陽性細胞は TUNEL 染色を行い、アポトーシス関連因子については定量的 PCR 法および Western Blot 法(WB)による解析を行った。miR-16-5p が制御するターゲット遺伝子としてオートファジー制御遺伝子 SESN1 に着目し、そのアポトーシスとの関与について調べるため、免疫染色によるオートファゴソームの検出および、マーカー蛋白の WB による解析を行った。

**【方法 3】**循環血液中の miR-16-5p を内包したエクソソームの分泌臓器を調べる為、TS 後のマウスから各器官の臓器を採取し、それぞれ定量的 PCR 法で解析した。最後に、循環血液中 miR-16-5p の虚血心への直接的影響を検証するために、I/R マウスに miR-16-5p を経静脈的に投与し、心機能への影響を評価した。

## 4. 研究成果

**【I/R マウスにおける骨格筋萎縮の誘導】**I/R-TS(+)群では I/R-TS(-)群と比べて、有意に術後 8 日目の腓腹筋重量の低下、下肢筋力の低下、筋線維面積の減少を認め、TS により骨格筋萎縮が誘導されることを確認した。

**【骨格筋萎縮を呈した I/R マウスの心機能解析】**I/R-TS(-)マウスでは、誘導された心筋虚血により一過性に低下した左室駆出率が虚血解除後 8 日目にかけて改善を認めたが、I/R-TS(+)マウスでは改善を認めなかった。術後 29 日目まで観察を行った I/R-TS(+)マウスにおいても左室駆出率の持続的な低下を認め、病理組織学的評価では線維化組織面積の増大が確認された。以上から I/R 後の骨格筋萎縮誘導によって心機能の回復不全が惹起・持続されることが示された。

**【候補マイクロ RNA の同定】**マウス血清中エクソソーム内のマイクロ RNA 網羅解析の結果、統計学的に有意な変化量の大きい miR-16-5p と miR-144-3p が抽出された。全頭マウスによる再検証の結果、miR-16-5p のみが I/R-TS(+)群で有意な発現上昇を認めた。

**【miR-16-5p による低酸素誘導アポトーシスの亢進】**miR-16-5p mimic を遺伝子導入後、低酸素

培養したラット心筋細胞では TUNEL 陽性率が非導入群に比べて有意に高く、p53 mRNA および Cleaved-caspase-3 蛋白の発現量が亢進していた。低酸素培養によりラット心筋細胞に誘導されたアポトーシスが miR-16-5p 遺伝子導入によって亢進していることが示された。

【**SESN1 の翻訳抑制とオートファジー抑制**】SESN1 遺伝子は miR-16-5p の直接的なターゲットであり、mTOR を介してオートファジーを調節することが知られている。ラット心筋細胞において SESN1 蛋白量は低酸素培養下で増加したが、miR-16-5p mimic 遺伝子導入により有意な低下を認めた。一方、mTOR のリン酸化は亢進し、オートファゴソーム陽性細胞は低酸素培養のみに比べて miR-16-5p 群で減少していた。ラット心筋細胞で miR-16-5p は SESN1 抑制的に働き、低酸素培養下で亢進するオートファジーを抑制していることが示された。

【**循環血中の miR-16-5p の役割**】TS(+)マウスの各器官における miR-16-5p 発現量を評価したところ、有意な上昇が観察されたのは萎縮骨格筋および心臓に限られていた。また、1/R マウスに miR-16-5p mimic を経静脈的に投与したところ、投与 1 週間後の左室駆出率の回復障害が観察された。循環血中 miR-16-5p は TS 後の骨格筋・心筋より分泌され、直接的に虚血心の機能回復を阻害することが示唆された。

本研究では、1/R による心筋虚血を背景に、誘導された骨格筋萎縮が心筋の回復不全を起こす疾患モデルの作成に成功した。さらにその機序として萎縮骨格筋および虚血心で産生される miR-16-5p がエクソソームに内包されて障害心筋に到達、SESN1 の翻訳抑制によるオートファジーの抑制を介してアポトーシスを促進することを示した。重症心筋梗塞では長期臥床による、廃用性および心臓悪液質に伴う二次性のサルコペニアを併発することがしばしばあり、骨格筋萎縮に伴うサルコペニアが本機序を介して心機能の回復不全を引き起こす可能性を念頭におくことは疾病管理、治療介入の観点から重要である。

マイクロ RNA は遺伝子の発現調整を担う短い非翻訳性 RNA であり、組織修復でも重要な役割を果たすことが知られている。心疾患に関連するマイクロ RNA はこれまでも多く報告されているが、心不全や心臓悪液質における直接的な役割については未だ十分に解明されていない。

Hughes らは miR-31 が加齢マウスにおいて廃用による萎縮骨格筋内で増加し、さらにそれによって骨格筋障害を引き起こすことを報告している<sup>1</sup>。我々は、萎縮骨格筋及び心臓で増加した miR-16-5p がエクソソームに内包して分泌され、循環血液を介して心臓に到達することで直接的に心修復に悪影響を及ぼすことを示した。その機序として、ストレス誘導性アポトーシスが miR-16-5p 発現増強を介して亢進される仮説をたて検証を行った。miR-16-5p は直接的に SESN1 をターゲットとして翻訳を抑制し、筋芽細胞の増殖・分化に影響を与えることが Cai らによって報告されており<sup>2</sup>、Li らは SESN1/2 のダブルノックアウトマウスにおいてオートファジー不全によりドキシソルピシン心筋障害が重症化することを示している<sup>3</sup>。今回、ラット心筋細胞への miR-16-5p mimic の遺伝子導入では、低酸素培養下でアポトーシス細胞の増加を示したが、通常の酸素条件下ではこの現象は確認することができなかった。これは低酸素下で与えられる酸化ストレスによって誘導されたアポトーシスが、miR-16-5p による SESN1 発現抑制を介した細胞保護的オートファジーの抑制の結果、さらに促進したことを示している。従って本研究において、サルコペニアによる心修復不全の病態が、miR-16-5p 発現増強による心筋アポトーシス促進効果に基づくことが示されたと考える。

【**結論**】心筋虚血後にサルコペニアを併発させると、循環血中エクソソームに内包した miR-16-5p の発現増強を介し、障害心筋の回復が阻害されることが示された。心筋細胞で miR-16-5p が SESN1 の翻訳を抑制することで、細胞保護的なオートファジーを抑制し、アポトーシスが促進することがその機序の一つである。この miR-16-5p を介した一連の心臓への悪影響は、廃用症候群を併発するような重症心不全患者における今後の治療ターゲットとなる可能性がある。

#### <引用文献>

- 1) Hughes, D. C. et al. Alterations in the muscle force transfer apparatus in aged rats during unloading and reloading: impact of microRNA-31. *J. Physiol.* 596, 2883-2900; 10.1113/JP275833(2018)
- 2) Cai, B. et al. MiR-16-5p targets SESN1 to regulate the p53 signaling pathway, affecting myoblast proliferation and apoptosis, and is involved in myoblast differentiation. *Cell Death Dis.* 9, 367; 10.1038/s41419-018-0403-6(2018)
- 3) Li, R. et al. Cardioprotective roles of sestrin 1 and sestrin 2 against doxorubicin cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 317, H39-H48; 10.1152/ajpheart.00008.2019(2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayasaka Taiki, Takehara Naofumi, Aonuma Tatsuya, Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Nakagawa Naoki, Tanaka Hiroki, Kawabe Jun-ichi, Hasebe Naoyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Sarcopenia-derived exosomal micro-RNA 16-5p disturbs cardio-repair via a pro-apoptotic mechanism in myocardial infarction in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98761-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taiki Hayasaka
2. 発表標題 Sarcopenia-derived exosomal micro-RNA 16-5p exerts the cardio-repair disturbance via pro-apoptotic mechanism in myocardial infarction of mice.
3. 学会等名 ESC congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Taiki Hayasaka
2. 発表標題 The pro-apoptotic action of exosomal micro-RNA 16-5p disturbs the cardio-repair process after myocardial ischemia-reperfusion in sarcopenia mice.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Taiki Hayasaka
2. 発表標題 Tail-suspension induced sarcopenia is associated with a cardio-repair malfunction after myocardial infarction in mice
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Taiki Hayasaka
2. 発表標題 Sarcopenia-derived exosomal micro-RNA 16-5p exerts the cardio-repair disturbance via pro-apoptotic mechanism in myocardial infarction of mice.
3. 学会等名 ESC Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	竹原 有史  (Takehara Naofumi)		
研究協力者	川辺 淳一  (Kawabe Jun-ichi)		
研究協力者	長谷部 直幸  (Hasebe Naoyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------