

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17496

研究課題名（和文）骨格筋特異的マイクロRNAによるCOVID-19関連骨格筋障害の抑制

研究課題名（英文）Rescue of COVID-19-related skeletal muscle damage by skeletal muscle-specific microRNA

研究代表者

森 拓也（Mori, Takuya）

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70897412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：COVID-19感染症においてHMGB1は炎症の重症化に重要な役割を果たす。一方、HMGB1はがん性悪液質においてもサルコペニアの発生に強く関連する。HMGB1は筋芽細胞のミトコンドリアエネルギー産生を障害することを明らかにした。その機序の上で重要なのがHMGB1により誘導されるmiR-494である。miR-494はPGC-1とc-mycの発現抑制を介してエネルギー産生を低下させ、筋成熟度を低下させた。これらのことから、COVID-19におけるサルコペニアの発生にはHMGB1-miR-494 axisが重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19感染症における骨格筋障害の抑制は患者の早期退院・早期社会復帰を促進する上で重要である。申請者はがん性サルコペニアにおいてHMGB1抑制の有効性を見出している。本研究ではこのHMGB1抑制効果を検討する。このとき、HMGB1は宿主自然免疫に重要な役割を有するため、HMGB1に関連するマイクロRNAを同定しこれを標的とすることで、宿主自然免疫を保持しつつHMGB1を抑制しようとするものである。本研究の成果はCOVID-19関連筋萎縮を抑制し患者予後を改善することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In COVID-19 infection, HMGB1 plays an important role in the severity of inflammation. HMGB1 is also strongly associated with the development of sarcopenia in cancer cachexia. HMGB1 has been shown to impair mitochondrial energy production in myoblasts. Of mechanistic importance is miR-494, which is induced by HMGB1. miR-494 reduced energy production and muscle maturation via suppression of PGC-1 and c-myc expression. Taken together, these findings indicate that the HMGB1-miR-494 axis plays an important role in the development of sarcopenia in COVID-19.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：COVID-19 サルコペニア HMGB1 マイクロRNA エネルギー代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### (1) 研究の背景

COVID-19 は SARS-CoV-2 ウイルスの感染による呼吸器障害を主症状に、種々の臓器障害を発症する疾患である。この申請書を作成している時点で、国内の感染者は 10 万人に近づき、死者数は 1600 人を超えている。COVID-19 における骨格筋障害は軽視されがちだが、入院患者の約 55% に骨格筋障害が認められており (Islam MF, Fatigue Biomed Health Behav. 2020)、社会復帰のために長期のリハビリテーションが必要になっている (Li J, Eur J Physical Rehab, 2020)。退院後も、骨格筋障害は COVID-19 後遺症として高頻度に見られ、慢性疲労症候群との類似が指摘されている (Islam MF, Fatigue Biomed Health Behav. 2020)。このように、COVID-19 における骨格筋障害は COVID-19 患者の社会復帰の障壁の一つとなっている。

HMGB1 は TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインネットワークを活性化し、がん性悪液質の原因となる (Ohmori H, Mori T, Pathobiology, 2019)。さらに、がん細胞から放出された HMGB1 は、骨格筋にも高レベルに発現している受容体である RAGE を介して骨格筋にオートファジーを誘導し筋萎縮をもたらす (Luo Y, Cancer Res, 2014)。癌から放出される HMGB1 を抑制することにより、がん性筋萎縮が改善されることを申請者は見出している (Kawahara I, Mori T, Pathobiology, 2018)。また、がん以外にも、炎症や脱神経に伴う骨格筋萎縮において HMGB1 が障害を増悪させることが報告されている (Yang X, Cell Commun Signal. 2018; Muth IE, Exp Neurol. 2015)。

COVID-19 入院患者においては HMGB1 血中濃度が上昇しており、予後不良と関連している (Chen L, Cell Mol Immunol. 2020)。HMGB1 は、SARS-CoV-2 ウイルス感染により産生・分泌が増加し、SARS-CoV-2 の細胞内侵入を促進し (Street ME, Horm Res Paediatr. 2020)、サイトカインストームを惹起する (van den Berg DF, Front Immunol. 2020)。直接肺障害をもたらすのみならず (Andersson U, Mol Med. 2020)、筋障害においても HMGB1 はオートファジーの促進、細胞内サイトカイン産生亢進などから、その病態に強い相関を示している (Mousa RF, Metab Brain Dis. 2020)。また、細胞外の HMGB1 は細胞外のウイルス核酸と結合し、RAGE を介して細胞質に入り炎症反応を惹起することが COVID-19 における骨格筋萎縮の一因として重視される (Andersson U, Mol Med. 2020)。このように、HMGB1 は COVID-19 の病態形成とその悪化に強く関与しており、HMGB1 の抑制はリバピリンなどの抗ウイルス薬と同等あるいはそれ以上の抗コロナウイルス効果を示すとされる (Cinatl J, Lancet. 2003)。このように、HMGB1 の抑制は COVID-19 患者の管理に重要であると考えられている (Çelebier M, Comb Chem High Throughput Screen. 2020)。一方、HMGB1 は宿主自然免疫の活性化に不可欠であり (Andersson U, Semin Immunol. 2018)、COVID-19 感染症では免疫抵抗性を保持するため HMGB1 抑制を骨格筋に限局して行う必要がある。

### (2) 研究の目的

COVID-19 感染症における骨格筋障害の抑制は患者の早期退院・早期社会復帰を促進する上で重要である。申請者はがん性サルコペニアにおいて HMGB1 抑制の有効性を見出している。本研究ではこの HMGB1 抑制効果を検討する。このとき、HMGB1 は宿主自然免疫に重要な役割を有するため、HMGB1 に関連するマイクロ RNA を同定しこれを標的とすることで、宿主自然免疫を保持しつつ HMGB1 を抑制しようとするものである。本研究の成果は COVID-19 関連筋萎縮を抑制し患者予後を改善することが期待される。

### (3) 研究方法

マウスがん性悪液質モデルを用いて HMGB1 のサルコペニアにおける作用をマウス筋芽細胞 C2C12 を用いて検討した。HMGB1 によるマイクロ RNA の変化を網羅的に解析し、HMGB1 の標的マイクロ RNA を抽出した。このマイクロ RNA の作用機序をミミックやインヒビターを用いて解析した。

### (4) 結果

われわれはマウスがん悪液質モデルを用いて、悪液質性骨格筋萎縮に関わる因子を検討した。悪液質モデルは、

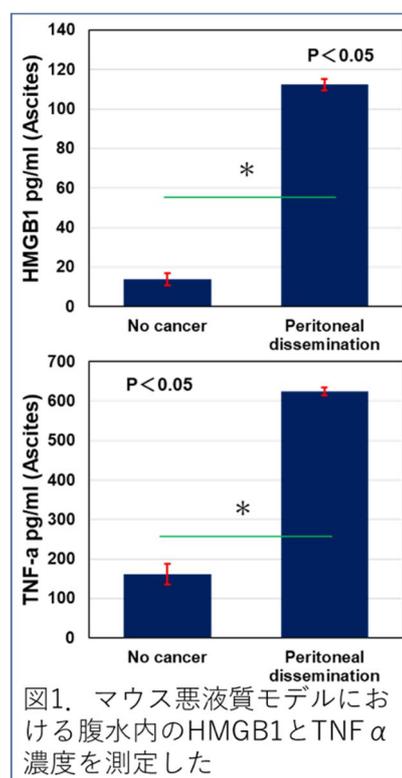


図1. マウス悪液質モデルにおける腹水内のHMGB1とTNF $\alpha$ 濃度を測定した

BALB/c マウスに対し、CT26 癌細胞 ( $1 \times 10^6 / 0.2 \text{ mL}$ ) を腹腔内接種にて作成し、平均 40% 程度の骨格筋萎縮が生じるモデルを確立している。悪液質の腹水では HMGB1 と TNF- $\alpha$  の増加を確認した (図 1)。HMGB1 は、骨格筋において mTOR 活性を抑制し、オートファジー関連タンパク質を増加させ、オートファジーを誘発した。次に、HMGB1 を含む腹水を事前に筋管細胞に分化させた C2C12 細胞の培地に 20% 添加し、48 時間培養後、骨格筋ミトコンドリア代謝を測定した。腹水処理された C2C12 細胞のミトコンドリアは基礎呼吸、ATP 産生、プロトンリーク、最大呼吸、および予備容量が大幅に低下した (図 2)。これらの結果より、HMGB1

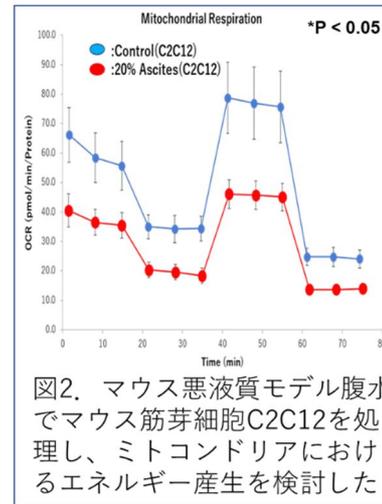


図2. マウス悪液質モデル腹水でマウス筋芽細胞C2C12を処理し、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生を検討した

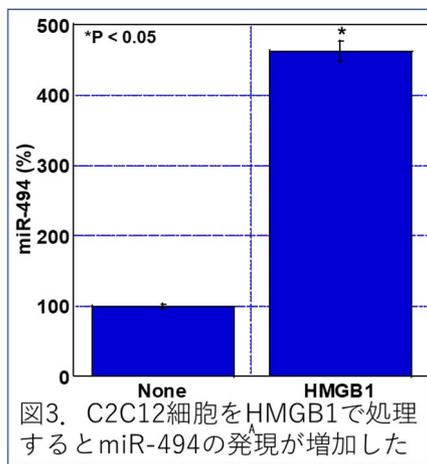


図3. C2C12細胞をHMGB1で処理するとmiR-494の発現が増加した

症においても HMGB1 がサルコペニアの原因因子として重要視される。

COVID-19 感染症においても HMGB1 がサルコペニアの原因因子として重視されことから、マウス筋芽細胞 C2C12 を HMGB1 で処理した時に、変化するマイクロ RNA を

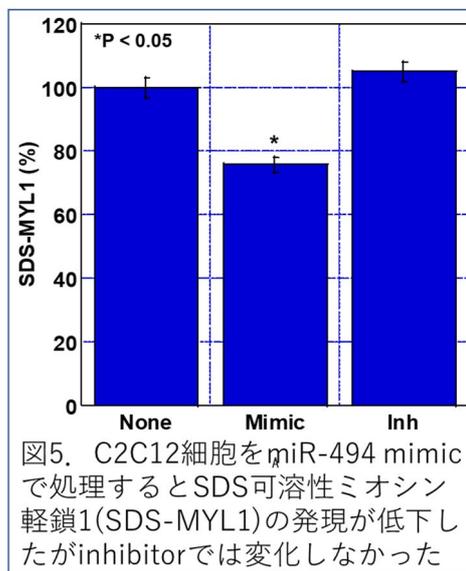


図5. C2C12細胞をmiR-494 mimicで処理するとSDS可溶性ミオシン軽鎖1(SDS-MYL1)の発現が低下したがinhibitorでは変化しなかった

今回この検討から明らかになったことから、COVID-19 感染

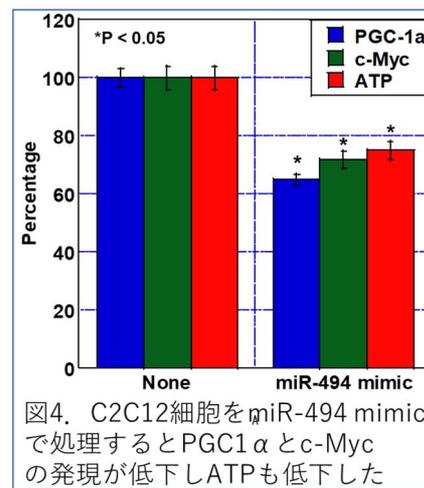


図4. C2C12細胞をmiR-494 mimicで処理するとPGC1 $\alpha$ とc-Mycの発現が低下しATPも低下した

網羅的に検討した。その中で、もっとも発現が亢進したのが miR-494 であった。HMGB1 処理により、miR-494 は 4.6 倍に発現が増加した (図 3)。miR-494 ミミックにて C2C12 細胞を処理すると、PGC-1 $\alpha$  と c-myc の発現が抑制され、ATP 産生が低下した (図 4)。さらに、筋成熟度を示す SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 のタンパクレベルが低下した。逆に、miR-494 インヒビターで HMGB1 と同時処理した C2C12 細胞では、ATP 産生の低下や SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 のタンパクレベルの低下は認められなかった (図 5)。これらのことから、HMGB1 により誘導される miR-494 を抑制することにより、

COVID-19 感染症におけるサルコペニアを抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakashima Chie, Fujiwara-Tani Rina, Mori Shiori, Kishi Shingo, Ohmori Hitoshi, Fujii Kiyomu, Mori Takuya, Miyagawa Yoshihiro, Yamamoto Kazuhiko, Kirita Tadaaki, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 23
2. 論文標題 An Axis between the Long Non-Coding RNA HOXA11-AS and NQOs Enhances Metastatic Ability in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10704 ~ 10704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810704	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 該当する

1. 著者名 Owari Takuya, Tanaka Nobumichi, Nakai Yasushi, Miyake Makito, Anai Satoshi, Kishi Shingo, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Hojo Yudai, Mori Takuya, Kuwada Masaomi, Fujii Tomomi, Hasegawa Masatoshi, Fujimoto Kiyohide, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 127
2. 論文標題 5-Aminolevulinic acid overcomes hypoxia-induced radiation resistance by enhancing mitochondrial reactive oxygen species production in prostate cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 350 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-01789-4	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 -

1. 著者名 Maesaka Fumisato, Kuwada Masaomi, Horii Shohei, Kishi Shingo, Fujiwara-Tani Rina, Mori Shiori, Fujii Kiyomu, Mori Takuya, Ohmori Hitoshi, Owari Takuya, Miyake Makito, Nakai Yasushi, Tanaka Nobumichi, Bhawal Ujjal Kumar, Luo Yi, Kondoh Masuo, Fujimoto Kiyohide, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 23
2. 論文標題 Hypomethylation of CLDN4 Gene Promoter Is Associated with Malignant Phenotype in Urinary Bladder Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6516 ~ 6516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23126516	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 -

1. 著者名 Takuya Mori, Akira Kido, Isao Kawahara, Shota Nuaga, Yoshihiro Miyagawa, Kei Goto, Shiori Mori, Shingo Kishi, Kiyomu Fujii, Rina Fujiwara-Tani, Hiroki Kuniyasu	4. 巻 5
2. 論文標題 Nutritional intervention for cancer sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Musculoskeletal Medicine	6. 最初と最後の頁 001 ~ 004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17352/amm.000024	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 -

1. 著者名 Kishi Shingo, Nishiguchi Yukiko, Honoki Kanya, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Kawahara Isao, Goto Kei, Nakashima Chie, Kido Akira, Tanaka Yasuhito, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of Glycated High Mobility Group Box-1 in Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5185 ~ 5185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105185	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 該当する

1. 著者名 Mori Takuya, Goto Kei, Kawahara Isao, Nukaga Shota, Wakatsuki Yuma, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Ohmori Hitoshi, Kido Akira, Honoki Kanya, Tanaka Yasuhito, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of Vitamin B2 and Vitamin E on Cancer-Related Sarcopenia in a Mouse Cachexia Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed	6. 最初と最後の頁 50 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomed1010004	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 -

1. 著者名 Fujiwara-Tani Rina, Okamoto Ayaka, Katsuragawa Hiroyuki, Ohmori Hitoshi, Fujii Kiyomu, Mori Shiori, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Nakashima Chie, Kawahara Isao, Hojo Yudai, Nishiguchi Yukiko, Mori Takuya, Mizumoto Takeshi, Nagai Kenta, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 BRAF Mutation Is Associated with Hyperplastic Polyp-Associated Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12724 ~ 12724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312724	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mori T, Ohmori H, Kawahara I, Nukaga S, Mori S, Kishi S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kuniyasu H
2. 発表標題 Differential effect of various concentrations of lauric acid on cancer cachexia skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 81th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2022.9.29-10.1
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森拓也、大森斉、川原勲、額賀翔太、後藤桂、森汐莉、岸真五、谷里奈、羅奕、國安弘基
2. 発表標題 HMGB1はオートファジーとミトコンドリア障害を介してがん性骨格筋萎縮をもたらす
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会、神戸市、2022.4.14-16
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原 勲、森 拓也、額賀翔太、宮川良博、後藤 桂、若槻優真、大森 斉、藤井 澄、森 汐莉、谷 里奈、岸 真五、國安弘基
2. 発表標題 がん性サルコペニアに対するビタミンB2とビタミンEの効果
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 拓也、藤井 澄、川原 勲、額賀翔太、宮川良博、後藤 桂、森 汐莉、岸 真五、谷 里奈、大森 斉、國安弘基
2. 発表標題 がん悪液質において抗酸化作用を持つアミノ酸の経口摂取は骨格筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 額賀翔太、森 拓也、川原 勲、宮川良博、後藤 桂、谷 里奈、岸 真五、森 汐莉、藤井 澄、大森 斉、國安弘基
2. 発表標題 中鎖脂肪酸とグルコースの併用によるがん悪液質由来心筋障害の抑制
3. 学会等名 第6回日本がんサポーターティブケア学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mori T, Ohmori H, Kawahara I, Nukaga S, Goto K, Mori S, Kishi S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kuniyasu H
2. 発表標題 Mitochondrial impairment is involved in cancer skeletal muscle atrophy.
3. 学会等名 80th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nukaga S, Mori T, Kawahara I, Miyagawa Y, Goto K, Fujiwara-Tani R, Kishi S, Mori S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H
2. 発表標題 Effect of nutritional intervention with medium-chain fatty acids and glucose on cancer-derived myocardial atrophy.
3. 学会等名 80th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学分子病理学 <a href="http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/">http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/</a>
--

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

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
---------	---------