

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18040

研究課題名(和文) 血中分泌型microRNAによる癌性カケキシアの発症と細胞間コミュニケーション

研究課題名(英文) Cell-to-cell communication through circulating microRNA in cancer cachexia

研究代表者

宮崎 充功 (MIYAZAKI, Mitsunori)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授

研究者番号：20632467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんをはじめとする慢性消耗性疾患では、骨格筋量の低下を主徴とした全身性代謝障害症候群として悪液質という病態がある。本研究では「腫瘍細胞から放出される血中分泌型microRNAが、骨格筋のタンパク質代謝異常を誘導する」との仮説を基に、がん性悪液質に伴う筋タンパク質代謝制御の分子機構の解析および血中分泌型microRNAのスクリーニングを行い、また悪液質の予防策としての運動療法介入効果について検討した。研究成果として、がんに伴う骨格筋タンパク質代謝の制御異常は全身性の低強度有酸素運動により是正されること、またがん性悪液質誘導性の血中分泌型miRNAおよび標的候補遺伝子群を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんをはじめとする慢性消耗性疾患において二次的に誘発される筋力および筋量の低下(悪液質)は、罹患者の生存率やその後のQOLの維持に直結する重要な課題である。悪液質の本態は過剰な炎症性サイトカイン分泌により誘導される全身性炎症であるとされているが、その病態を誘導する仕組みはほとんどわかっていない。本研究により、血中分泌型microRNAが全身性の骨格筋量減少という病態を誘導する可能性があること、また比較的低強度の運動療法介入によって悪液質の進行に伴う骨格筋量低下を抑制できる可能性を示した。これらの研究成果は、がん性悪液質に対する運動療法プログラムを構築する上で、臨床的にも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Cancer cachexia is characterized by systemic negative balance of protein and energy metabolism that result in involuntary progressive losses of skeletal muscle mass and metabolic dysfunction. Even though physical exercise has been suggested as an effective treatment for counteracting cachexia progression, the precise molecular regulation remains largely unknown. For identifying the mechanisms involved in the physical exercise-mediated maintenance of skeletal muscle mass and energy metabolism, the effects of voluntary exercise in cachexia mice were investigated. Particularly, we focused on the contribution of circulatory-microRNA delivered from tumors to the progression of cancer cachexia. According to our research, we have identified that therapeutic intervention with low-intensity aerobic exercise can release the cachexia-induced retardation of muscle protein metabolism and mitochondrial dysfunction which then contributes to the maintenance of skeletal muscle mass and function.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：悪液質 骨格筋 タンパク質代謝 がん 運動療法 筋萎縮 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌や COPD、AIDS といった慢性消耗性疾患において二次的に誘発される筋力および筋量の減少を総称して、カケキシア (悪液質) という概念が提唱されている。カケキシアは、不可逆性の骨格筋変性疾患 (筋ジストロフィーなど) や加齢性の筋量低下 (サルコペニア) とは異なり、基礎疾患に関連して生ずる全身性の複合的代謝異常を特徴とし、共通する病態として脂肪および骨格筋量の顕著な低下を呈する。骨格筋量の減少が誘導される要因としては、一次疾患に由来する炎症性サイトカイン産生の増加や原因病巣からの放出因子の影響が指摘されているが、現在までその詳細は明らかでない。

(2) 脂肪や骨格筋といった原発病巣以外の末梢組織が強く影響を受けることから、癌性カケキシアの発症・進行には、体液中に放出される全身性因子の関与が強く疑われている。現在まで、TNF α や IL6 などの炎症性サイトカインの関与が報告されているが、一方で抗サイトカイン抗体によるカケキシア治療効果は極めて限定的であるなど、カケキシアの発症・進行を制御する分子機構は依然不明な点が多い。そこで本研究では、細胞間コミュニケーションツールとしての機能を有する血中分泌型 microRNA (miRNA) に着目した。

2. 研究の目的

miRNA は 18-22 塩基の小分子 RNA の一種で、mRNA の 3'側非翻訳領域に相補的に結合し、mRNA の分解 / 翻訳阻害により標的遺伝子の発現を制御する。近年、miRNA がエクソソームと呼ばれる膜小胞に内包され、血液や尿など細胞外へと分泌されることが明らかとなった。さらに放出されたエクソソームは、体液を介して遠く離れた他組織に辿り着き、標的細胞に取り込まれることによって内包した miRNA やタンパク質を送り届けるという、細胞間の情報伝達機能を有している。この、エクソソームに内包される miRNA が分泌元となる細胞 (腫瘍細胞) の特異性を反映し、異なる他の組織 (末梢骨格筋) へと情報を送り込むという考え方は、全身性の症候群であるカケキシアの病態と一致する。そこで本研究では、上記の研究背景を踏まえ、「腫瘍細胞から放出されるエクソソームが骨格筋細胞に取り込まれ、miRNA による遺伝子発現制御を介して、骨格筋機能を制御する」との仮説を設定した。

3. 研究の方法

(1) 癌性カケキシア動物実験モデルの作成

CD2F1 系マウス (雄性、8 週齢) に対してマウス大腸癌由来細胞株 colon-26 (C26) の皮下移植を行い、実験的癌性カケキシア誘発モデルを作成する。C26 細胞は血清および抗生物質を含んだ増殖培地 (10%FBS in RPMI-1640) にて培養を行った後、1 個体あたり 1×10^6 個の C26 細胞をマウス腹腔部へと皮下移植する。この実験モデルの場合、C26 細胞移植後 3-4 週間で体重減少や筋量 / 筋力低下が観察されることから、移植後 28 日目に血清、骨格筋 (腓腹筋)、心筋、精巣上体白色脂肪など各組織のサンプリングを行う。

(2) 癌性カケキシア誘導性血中分泌型 microRNA の網羅的解析

採取した血清サンプルからエクソソーム分画を精製し、全 RNA を抽出する。エクソソームの単離・精製には、ホスファチジルセリンと Tim4 を用いたエクソソーム精製法 (Fujifilm Wako) を採用する。また抽出した全 RNA についてバイオアナライザーによる抽出効率の確認後、microRNA microarray 法を用いて網羅的解析を行う。本解析には、複数 (N=3 を予定) 個体から個別に採取したサンプルをプールして使用することで個体間の発現差を補正し、対照群とカケキシア群の 2 群間比較を行うことで、癌性カケキシア誘導性の血中分泌型 miRNA を同定する。

(3) 身体運動介入がカケキシア誘導性 miRNA 発現に与える影響

カケキシア誘導性 miRNA 発現に対する身体運動介入の効果を、マウスの血液サンプルを用いて検討する。カケキシアモデルマウスに対する身体運動介入には自発的ランニングホイールを用いた全身運動を採用し、C26 細胞移植後の飼育期間に自発走運動を促すことで、身体運動介入の効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 癌性カケキシア動物実験モデルの作成および身体運動介入による筋萎縮抑制効果

体重および組織重量と各測定指標 (握力、積算走行距離、食餌量) の変化を示した。腫瘍組織を含む全体重は実験期間を通じて各群ともに漸増傾向を示した (data not shown) が、腫瘍塊 (図 1A) を除去した状態では、特に C26-SED 群において有意な体重減少を示した (CON-SED 群、 27.35 ± 0.32 g; C26-SED 群、 24.45 ± 0.60 g; 図 1B)。また C26 細胞の移植に伴い、腓腹筋 (CON-SED 群、 131.29 ± 0.91 g; C26-SED 群、 113.83 ± 2.02 g; 図 1C)、心筋 (CON-SED 群、 139.77 ± 2.27 g; C26-SED 群、 123.28 ± 3.26 g; 図 1D) および精巣上体白色脂肪 (CON-SED 群、 544.78 ± 32.59 g; C26-SED 群、 227.07 ± 30.91 g; 図 1E) の各組織重量が有意に減少した。発揮筋力の指標として測定した握力は、C26 細胞移植後 3 週目までは各群間に変化は認められないが、4 週目において C26-SED 群のみ有意に低値を示した (CON-SED 群、 284.83 ± 4.40

g force ; C26-SED 群、 214.59 ± 4.05 g force ; 図 1 F)。一方で、C26 細胞移植後に自発走運動介入を行った場合 (C26-RUN 群) 体重 (26.92 ± 0.46 g)、骨格筋重量 (129.46 ± 1.69 g) および握力 (276.06 ± 5.15 g force) は CON-SED 群と同レベルに維持され、心筋重量 (156.84 ± 3.52 g) は対照群よりも有意に高値を、脂肪重量 (198.94 ± 16.43 g) は有意に低値を示した。また自発走運動のみを単独で施した場合では (CON-RUN 群) 心筋重量 (161.40 ± 4.58 g) および脂肪重量 (324.19 ± 32.93 g) に運動介入効果 (自発走運動に伴う心筋重量の増加および脂肪重量の減少) が認められたものの、体重 (27.53 ± 0.46 g)、腓腹筋重量 (129.87 ± 2.25 g) および握力 (290.07 ± 6.02 g force) はいずれも変化がなかった。マウスの運動量は、1日あたりの平均走行距離 (CON-RUN 群、 12.99 ± 0.51 km ; C26-RUN 群、 12.88 ± 0.28 km) および4週間を通じた積算走行距離のいずれにおいても、C26 細胞移植による影響は認められなかった (図 1 G)。食餌量については、非運動群 (CON-SED 群および C26-SED 群) に比較して自発走運動群 (CON-RUN 群および C26-RUN 群) がいずれの測定ポイントにおいても有意な増加を示した (二元配置分散分析の主効果判定) もの、C26 細胞移植による影響は認められなかった (図 1 H)。以上の結果は、C26 細胞の移植により体重・骨格筋量・発揮筋力の低下といった悪液質の諸症候が誘導されること、また有酸素運動を模した身体運動介入により、癌性悪液質の諸症候の発症が抑制されることを示している。

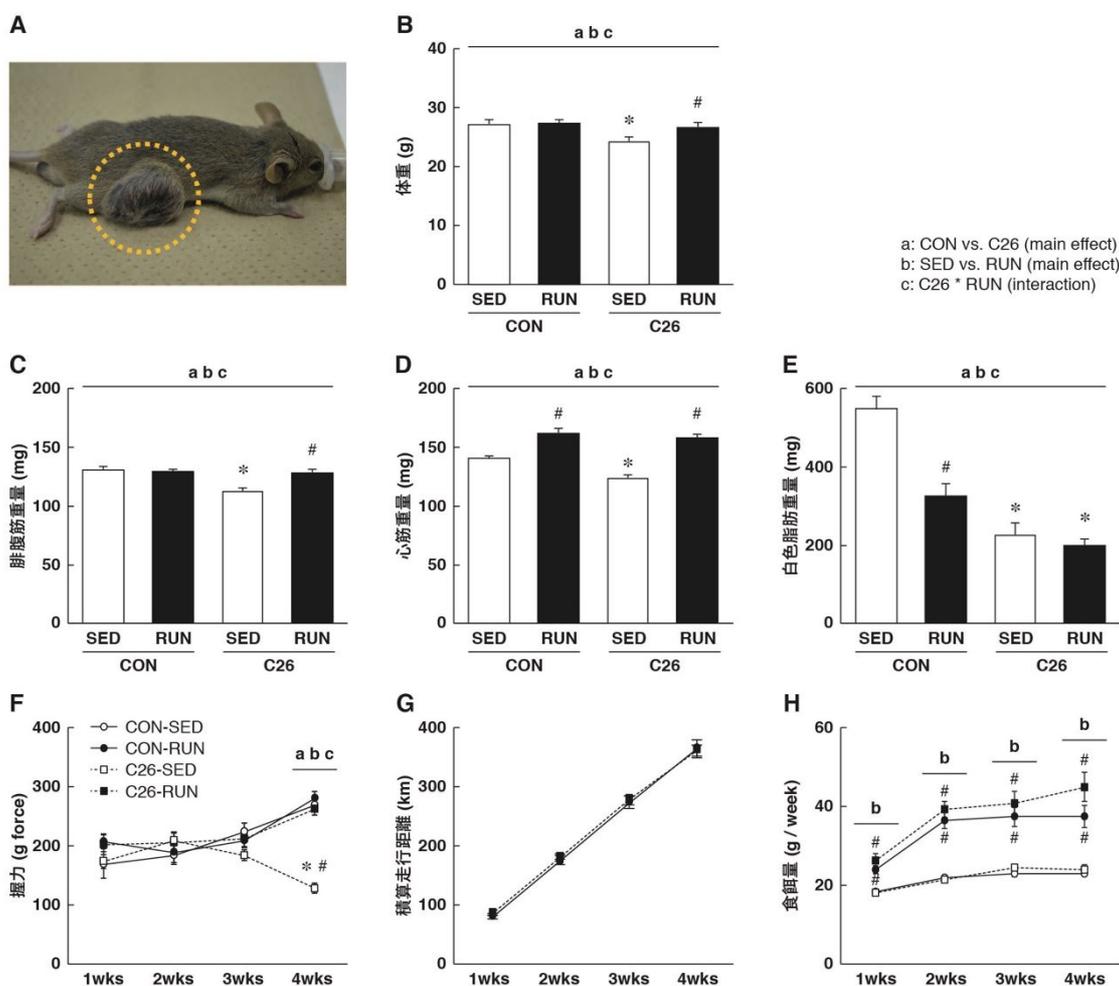


図1. 癌性悪液質に伴う体重および組織重量の減少と運動介入による抑制効果

A) 悪液質モデルマウスの典型例 (C-26細胞移植後28日目)。マウス腹壁部へと皮下移植したC26細胞が増殖し、ヒトの親指大の腫瘍塊が形成される。B) 体重、C) 腓腹筋重量、D) 心筋重量、E) 精巣上体白色脂肪重量、F) 握力、G) 積算走行距離、H) 食餌量。CON-SED: 対照群 (n=10)、CON-RUN: 走運動群 (n=9)、C26-SED: 癌性悪液質群 (n=9)、C26-RUN: 癌性悪液質発症モデルに走運動介入を行った群 (n=11)。食餌量データについては、追加実験のため他の測定項目とは異なる個体群が使用された (各群ともn=6)。測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。各群間の比較には二元配置分散分析を用い、交互作用および主効果検定の後にTukey-Kramerの多重比較検定を行い、有意水準は5%未満とした。有意差の表記: a, 単純主効果 (CON vs. C26); b, 単純主効果 (SED vs. RUN); c, 交互作用 (C26*RUN); *, 各実験群におけるCON 群とC26群間の有意差 (p < 0.05); #, 各実験群におけるSED 群とRUN群間の有意差 (p < 0.05)。

(2) 癌性カケキシアに伴う骨格筋タンパク質代謝制御機構の変化

図 2 には、骨格筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼである Atrogin1 および MuRF1 のタンパク質発現量の変化を示した。腓腹筋における Atrogin1 発現量は、C26 細胞の移植に伴い有意に増加した (C26-SED 群)。一方 C26 細胞移植後に身体運動介入を行った場合 (C26-RUN 群) Atrogin1 タンパク質発現量は CON-SED 群と同レベルに維持された。また身体運動介入のみを行った場合 (CON-RUN 群) Atrogin1 タンパク質発現に変化は認められなかった。MuRF1 のタンパク質発現量については、いずれの実験群においても有意な変化は認められなかった。以上の結果は、癌性悪液質の発症に伴い、Atrogin1 を中心とするユビキチン-プロテアソーム系を介した骨格筋タンパク質分解が亢進されること、また身体運動介入を行うことで、悪液質に伴い賦活されたユビキ

チン-プロテアソーム系が抑制される可能性を示唆している。

一方で、タンパク質合成系を制御する mTOR タンパク質および AMPK (AMP-activated kinase) タンパク質のリン酸化量および総発現量の変化については、腓腹筋における mTOR タンパク質のリン酸化量が癌性悪液質の発症に伴い有意に減少したものの、身体運動介入の影響は対照群および悪液質群の両者ともに認められなかった。また細胞内のエネルギーセンサーとして作用し、mTOR 活性を負に制御する機能を持つ AMPK については、リン酸化量および総発現量のいずれも有意な変化は認められなかった。これらの結果は、悪液質に伴う骨格筋萎縮時には、mTOR 系の機能抑制により骨格筋タンパク質合成能が低下する可能性があること、身体運動介入を行っても骨格筋における mTOR 系の機能抑制が改善されるわけではないことを示唆している。

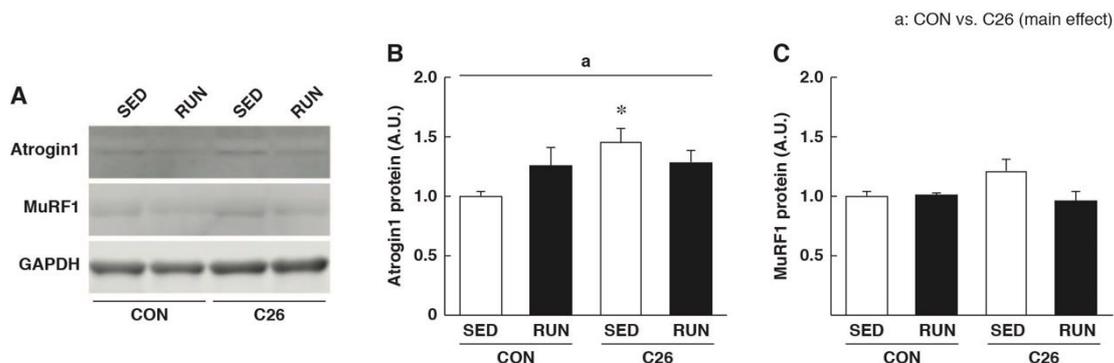


図2. 癌性悪液質および運動介入に伴うユビキチン-プロテアソーム系制御因子の発現量変化
A) ウェスタンブロットによるタンパク質発現量解析の典型例、B) Atrogin1タンパク質発現レベルの変化、C) MuRF1タンパク質発現レベルの変化。
CON-SED: 対照群(n=8)、CON-RUN: 走運動群(n=8)、C26-SED: 癌性悪液質群(n=8)、C26-RUN: 癌性悪液質発症モデルに走運動介入を行った群(n=8)。
測定値は平均値 ± 標準誤差で表記した。各群間の比較には二元配置分散分析を用い、交互作用および主効果検定の後にTukey-Kramerの多重比較検定を行い、有意水準は5%未満とした。有意差の表記:a, 単純主効果(CON vs. C26); *, 各実験群におけるCON 群とC26群間の有意差(p < 0.05)。

(3) カケキシア誘導性血中分泌型 microRNA の網羅的解析および標的遺伝子のスクリーニング

腫瘍細胞から放出される血中分泌型 microRNA に着目し、癌性悪液質モデルマウスの血中分泌型 microRNA の網羅的スクリーニングおよび機能解析を行った。また癌性悪液質の予防策として身体運動介入を行い、その介入効果および血中分泌型 microRNA 発現への影響を検討した。血清中のエクソソーム内包型 microRNA の網羅的解析を行ったところ、35 種類の microRNA が悪液質に伴う発現変動 (2 倍以上の上昇: 13 種類、1/2 以下への発現低下: 22 種類) を示し、そのうち 19 種類が運動介入による発現変動の是正を示した。また同定された microRNA (計 10 種類: 悪液質に伴い UP、運動介入によって DOWN) の標的遺伝子 (合計 14861 個) のうち、骨格筋において予測と類似した発現変動パターン (悪液質に伴い DOWN、運動介入によって UP) を示す 53 種類の遺伝子が同定され、Gene Ontology 解析の結果、その多くは細胞外マトリクスに関連した遺伝子群であった。先行研究において、細胞外マトリクス関連遺伝子の発現調節が、骨格筋の量的変化や機械的脆弱性の制御に関与することが示されていることから、癌性悪液質に伴う骨格筋量の減少や発揮筋力の低下、運動療法介入による予防効果において、悪液質誘導性の血中分泌型 microRNA を介した骨格筋遺伝子発現調節機構が関与する可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 角田 大典、瀬戸 素代花、木曾 稜太、宮崎 充功	4. 巻 46
2. 論文標題 癌性悪液質に伴う骨格筋タンパク質代謝制御機構の変化と運動介入効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 理学療法学	6. 最初と最後の頁 73～82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.15063/rigaku.11497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriya Nobuki、Miyazaki Mitsunori	4. 巻 314
2. 論文標題 Akt1 deficiency diminishes skeletal muscle hypertrophy by reducing satellite cell proliferation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R741～R751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1152/ajpregu.00336.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Mitsunori、Shimozuru Michito、Tsubota Toshio	4. 巻 14
2. 論文標題 Skeletal muscles of hibernating black bears show minimal atrophy and phenotype shifting despite prolonged physical inactivity and starvation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215489	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 Tatebayashi Daisuke、Himori Koichi、Yamada Ryotaro、Ashida Yuki、Miyazaki Mitsunori、Yamada Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 High-intensity eccentric training ameliorates muscle wasting in colon 26 tumor-bearing mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0199050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199050	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13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miyazaki Mitsunori
2. 発表標題 Biological strategy for the maintenance of skeletal muscle mass. “Symposium: Exercise and health benefits”.
3. 学会等名 International Conference on Adaptations and Nutrition in Sports (ICANS2018). (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Miyazaki M, Kakuta D, Yoshida S, Kitaoka Y.
2. 発表標題 Voluntary wheel running prevents skeletal muscle atrophy and mitochondrial dysfunction in cancer cachexia mice.
3. 学会等名 ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise 2018. San Diego, CA, USA. 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物における不活動性骨格筋萎縮に対する耐性獲得機構 -冬眠動物はなぜ寝たきりにならないのか？
3. 学会等名 第4回 リハビリテーション科学学会. 札幌市. 2018. (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 Hibernating bear serum leads to increased protein content in human skeletal muscle cells.
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 血中分泌型microRNAを介した癌性悪液質の発症
3. 学会等名 第2回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 宮崎充功、森谷伸樹
2. 発表標題 骨格筋肥大適応におけるAkt1 依存性 / 非依存性の制御機構
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 骨格筋量を保持するための分子基盤探索
3. 学会等名 第97回北海道医学大会（日本生理学会北海道地方会）（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物における骨格筋萎縮耐性獲得の分子基盤探索
3. 学会等名 第1回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 癌性悪液質の発症と運動療法介入効果
3. 学会等名 第6回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 宮崎充功、下鶴倫人、坪田敏男
2. 発表標題 冬眠中のツキノワグマはどのように骨格筋機能を維持しているのか?
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 宮崎充功、吉田晋
2. 発表標題 血中分泌型microRNAを介した癌性悪液質の発症と運動療法介入効果
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 宮崎充功、下鶴倫人、坪田敏男
2. 発表標題 冬眠中クマ血清によるヒト骨格筋培養細胞のタンパク質代謝制御の変化
3. 学会等名 第3回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 Akt1遺伝子欠損マウスの骨格筋は小さいがphenotypeは変化しない
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第24回 日本基礎理学療法学会学術集会 学術大会長賞

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