

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10737

研究課題名(和文) 虚血心におけるサルコペニア誘導性心機能変容と骨格筋再生を介した機能改善の機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms of sarcopenia-induced cardiac function alteration and functional improvement via skeletal muscle regeneration in the ischemic heart.

研究代表者

竹原 有史 (Takehara, Naofumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：90374793

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)：本研究では、I/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。一方、サルコペニアによる心機能回復障害に定量的運動療法が有効であること、虚血後のサルコペニア予防に幹細胞移植が有効で心機能回復障害も抑制できることを示した。心筋梗塞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現象は、疾病管理、治療介入の観点から極めて重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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循環血液中exosome内のmiR-16-5p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。そしてサルコペニアを合併した虚血性心疾患患者に対して、運動療法可能な患者においては定量的リハビリテーションを、運動療法困難な患者、特に高齢者に対しては骨格筋萎縮への予防的治療として細胞療法を、と異なる選択肢の中から最善の治療戦略を立てることで、患者予後を改善し、医療費削減の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is a pathophysiological malfunction induced by skeletal muscle atrophy. However, the underlying mechanism of disturbed cardiac repair accompanied with sarcopenia remains poorly understood. Here, we developed a novel sarcopenia-induced cardiac repair disturbance mouse model induced by tail suspension (TS) after cardiac ischemia and reperfusion (I/R). Then, we identified a specific exosomal-microRNA, miR-16-5p, in the circulating exosomes of I/R-TS mice. Likewise, miR-16-5p disturbed cardiac repair in I/R mice directly. Additionally, in cardiomyocytes (CMs) cultured under hypoxic conditions in the presence of a miR-16-5p, we clarified that autophagosomes were decreased in CMs via SESN1/mTOR inactivation. In conclusion, we show the pro-apoptotic effect of sarcopenia-derived miR-16-5p, which may be behind the exacerbation of myocardial infarction. Therefore, miR-16-5p can be a novel therapeutic target for cardiac repair disturbances in sarcopenia-cachexia.

研究分野：循環器内科

キーワード：サルコペニア 心臓悪液質 オートファジー miRNA 不全心筋回復障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

廃用性筋萎縮(サルコペニア)は急性期の心機能改善を阻害するとともに、罹病期間の長期化と相まって心臓悪液質を引き起こすことが知られており、その生命予後が極めて不良であることが臨床的にも明らかにされている。しかしサルコペニア自体が心機能に及ぼす直接的な影響は明らかにはされていない。今回我々は、新たに虚血心マウスに対する持続的尾懸垂により(二次的)サルコペニアを誘導することで、傷害心に与えるサルコペニアの影響を詳細に観察する系を確立した。この系により、障害心に与えるサルコペニアの影響・機序を解明し、またサルコペニアへの治療的介入による影響、効果もまた詳細に検討することが可能である。

さらに我々は独自の視点から毛細血管周囲に存在し血管・神経・骨格筋に分化する毛細血管由来幹細胞を発見した。本研究の最終目的はこの幹細胞を用い運動療法と共に骨格筋に治療介入することで、サルコペニアを克服し低侵襲で心機能ひいては心臓悪液質を改善させる「リハビリテーションと細胞移植」という新たなコンセプトに基づくハイブリッド治療を提唱することである。

2. 研究の目的

本研究の目的は次に挙げる2点である。

サルコペニアが障害心に及ぼす影響およびその機序を明らかにする。

サルコペニアに対する治療介入が障害心に与える影響およびその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

実験的虚血心マウスに与えるサルコペニア誘導の影響及びその機序

1) 実験モデルの確立・評価

C57BL/6 マウス(8-10 週齢)の左冠動脈を一時的に結紮し、虚血後(45 分間)に再還流することで形成される心筋梗塞モデル(ischemia/reperfusion; I/R model)を作成した後、翌日から1 週間の尾懸垂負荷(tail suspension; TS)により下肢骨格筋にサルコペニア誘導を行った。I/R 翌日、TS 後(8 日)、I/R 28 日後で各々心機能、梗塞サイズの評価、下肢骨格筋機能、筋萎縮を測定、TS の有無による生理学的影響を評価した。

2) サルコペニアによる心機能増悪機序解明

TS により誘導された骨格筋萎縮が虚血心(IR)に与える影響とその関連性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 micro RNA に着目した。関与する micro RNA を同定するため、I/R 手術後尾懸垂7 日目の検体で TS の有無により2 群間で有意差を持って変動する microRNA の網羅的解析を行った。同定された micro RNA を機序解明のターゲットとしてさらに【方法1】【方法2】の手法により、サルコペニアで誘導される microRNA が虚血心に与える影響とその機序について検証を行った。

【方法1: in vitro】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(neonatal rat cardiomyocyte: NRCM)に対して、1%O₂ 低酸素培養条件下でアポトーシスを誘導、さらに候補 micro RNA を mimic plasmid により遺伝子導入し、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。候補 micro RNA が制御するターゲット遺伝子を同定し、その遺伝子が与える誘導アポトーシスへの関与について解析を行った。特に、アポトーシス制御性オートファジーに着目し、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2; in vivo】循環血液中の候補 micro RNA 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、循環血液中候補 micro RNA の虚血心への直接的影響を検証するために、I/Rマウスに候補 micro RNA mimic plasmid を経静脈的に投与し、虚血心に与える影響を評価した。

サルコペニア誘導実験的虚血心マウスに対する運動療法+細胞移植治療の影響及びその機序で確立したI/R-TSマウスに対し、萎縮骨格筋に対する運動療法もしくは細胞療法の介入効果について以下の5群を設定し、各群における心機能変容について評価を行った。運動療法はTS後にトレッドミル(treadmill exercise test; TET)による定量的運動療法(3週間)を毎日実施した。細胞移植はTS前もしくは後に下肢骨格筋にマウス脂肪由来幹細胞(ADMSC)幹細胞(6×10⁵個/body)を移植した。

(a) IR-TS (-) (b) IR-TS (+) (c) IR-TS (+) TET (d) IR-TS (+) PBS (e) IR-TS (+) cell (ADMSC) 細胞療法群については細胞投与の有無における骨格筋筋力の変化率についても評価を行った。

統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表記し、統計学的検定はWilcoxon検定もしくは正規分布に従う場合はstudent t-testを用いて検定を行った。有意差はp値<0.05をもって採択しデータはJMP14.0 (JMP, Tokyo, SAS)を用いて解析した。

4. 研究成果

I/Rマウスにおける骨格筋萎縮の誘導

尾懸垂を行ったマウスを示す(図1a)。I/R後、7日間のTSを行ったI/R-TS(+)群では、TSを行わなかった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と、下肢筋力の低下(図1b,c)が観察された。組織学的には、TS(+)においては特にヒラメ筋筋束間質の線維化(図1d)及び、筋線維断面積の明らかな縮小を認めた(図1e,f)。よってI/R後のTSにより骨格筋萎縮が誘導されることが確認された。

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(図2a,b)。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(図2a,c)病理組織学的評価においても線維化組織面積の増大が確認された(図2d,e)。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。

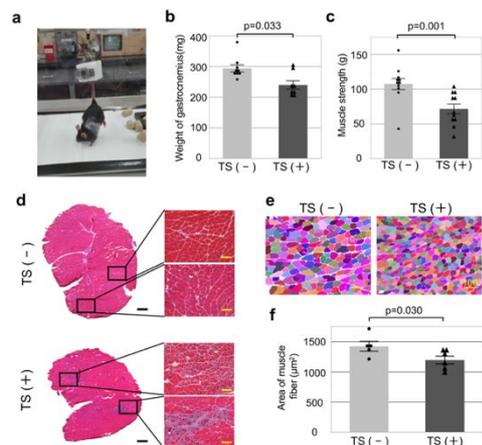


図1 I/Rマウスにおける骨格筋萎縮の誘導

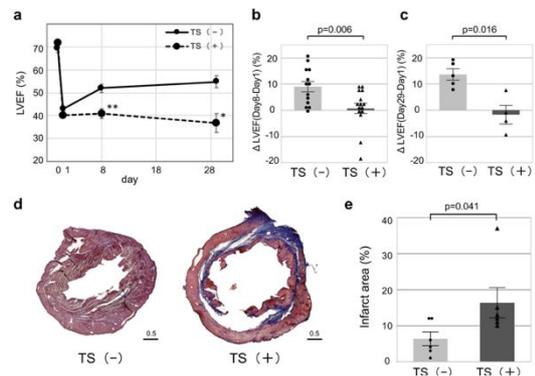


図2 I/R-TSマウスの心機能回復障害

I/R-TS(+)及び I/R-TS(-)マウスの2群間において、循環血液中の血清内エクソソームに含有されたマイクロRNAについて網羅解析を行った(図3a)。結果、統計学的に有意な変化量を有する2つのマイクロRNA、miR-16-5pとmiR-144-3pが抽出された(図3b)。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られた(図3c)。以上より、miR-16-5pを候補マイクロRNAとして以降の検討を進めた。

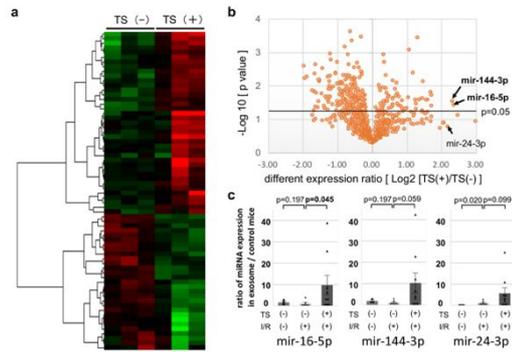


図3 候補 microRNA の同定

miR-16-5pによる低酸素誘導アポトーシスの亢進

候補マイクロRNAであるmiR-16-5pをmimicするplasmidを作成し、NRCMに遺伝子導入後、低酸素培養を行ってアポトーシスを誘導した。結果、miR-16-5pを遺伝子導入したNRCMではTUNEL陽性細胞の出現率が非導入群に比べて有意に高値であった(図4a,b)。さらに、この系においてmiR-16-5p導入NRCMのp53、caspase-3 mRNA発現(図4c,d)、および古典的経路のBax2(図4e,f)及びCleaved-caspase-3(図4g,h)の蛋白発現量が非導入群に比べて有意に亢進していた。以上より、低酸素培養によりラット心筋細胞に誘導されるアポトーシスは、miR-16-5p遺伝子導入によって亢進された。

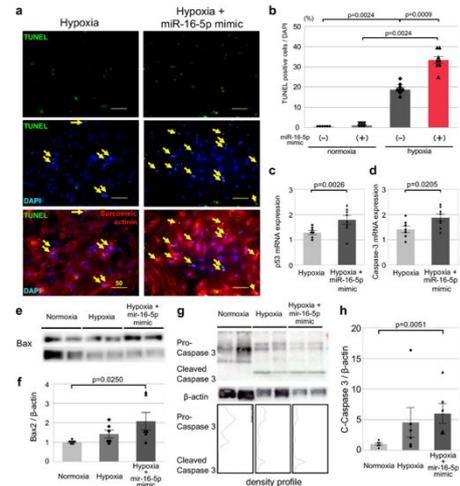


図4 miR-16-5pによる誘導アポトーシスの亢進

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。Luciferase reporter-based targeting assayを行い、miR-16-5pによるSESN1遺伝子の発現調節を確認したところ、control遺伝子に比べbinding siteにmiR-16-5p配列を組み込んだ遺伝子を導入した細胞ではSESN1遺伝子発現が有意に抑制されることが確認された(図5a,b)。

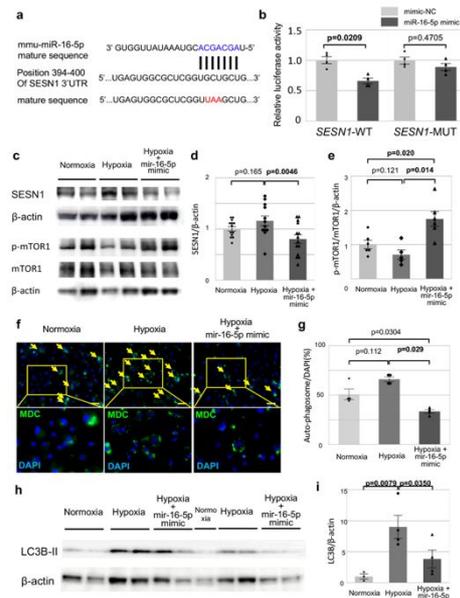


図5 SESN1の翻訳抑制とオートファジー抑制

一方、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(図5c,d)。同時にその系において、mTORのリン酸化は亢進し(図5e)、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群で明らかに減少(図5f,g)、基質であるLC3B-IIの低下も確認された(図5h,i)。すなわち、in vitroにおいてmiR-16-5pはSESN1抑制的に働き、低酸素培養下で亢進するNRCMの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(+)マウスの循環血液中 miR-16-5p の分泌臓器を同定するために、各器官における miR-16-5p 発現量を評価した。結果、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(図 6a)。最後に、循環血液中で発現亢進した miR-16-5p の虚血心に与える直接的影響を証明するために、TS 誘導を行わない I/R マウスに miR-16-5p mimic plasmid 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(図 6b,c)。以上により、循環血液中 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可能性が示唆された(図 6d)。

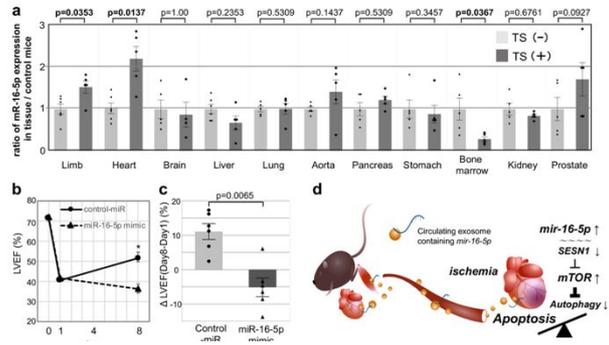
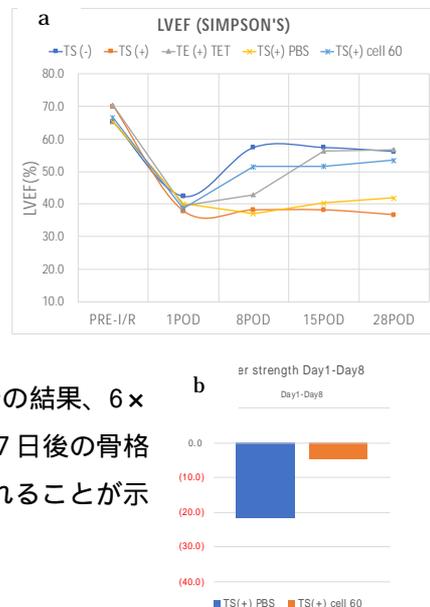


図 6 循環血中の miR-16-5p の役割

IR-TS マウスに与える運動療法、細胞移植療法の効果

I/R-TS マウスの萎縮骨格筋に対し、定量的トレッドミルによる運動療法を 3 週間実施したところ、運動療法開始 1 週間で心機能の回復が認められ、その効果は運動療法継続により持続することが示された(図 7a)。ついで I/R 後の萎縮骨格筋に対する細胞療法を、同種マウス ADMSC を用いて検証した。当初、I/R 導入後に細胞移植を行ったが、心機能回復障害についてはその効果を示すことができなかった。そこで、サルコペニアによる心機能回復障害に対する予防効果を検証するために、I/R 後、TS を実施する前に ADMSC を 10^5 、 6×10^5 、 10^6 個/body で移植し、その影響を評価した。その結果、 6×10^5 ・body 群において、placebo である PBS 投与群に比し TS 7 日後の骨格筋力低下が抑制されると共に、心機能の回復障害も抑制されることが示された(図 7a,b)。

図 7 IR-TS マウスに与える運動療法、細胞移植療法の効果



【考察】

本研究では、I/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。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。さらに、定量的運動療法は心機能の回復障害を正に制御し、間葉系幹細胞である ADMSC においてもその治療効果を確認することができた。重症心筋梗塞では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が重要である。また運動療法可能な患者においては定量的リハビリテーションを、運動療法困難な患者、特に高齢者に対しては骨格筋萎縮への予防的治療として細胞療法、と異なる選択肢の中から最善の治療戦略を立てることが期待される。

参考文献

1. Hughes, D. C. *et al. J. Physiol.* **596**,
2. Cai, B. *et al. Cell Death Dis.* **9**, 367; 10.1038/s41419-018-0403-6 (2018).
3. Li, R. *et al. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H39-H48;

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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T Hayasaka, N Takehara, N Hasebe
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 欧州心臓病学会(オランダ) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 T Hayasaka, N Takehara, N Hasebe
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(横浜)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 早坂太希、竹原有史他
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 2018年～2019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 分担者	川辺 淳一 (Jun-ichi Kawabe) (10400087)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究 分担者	田中 宏樹 (Tanaka Hiroki) (70596155)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	

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