

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08546

研究課題名(和文) 骨格筋より分泌されるマイクロRNAによる新規心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of muscle-derived cardioprotective miRNA

研究代表者

葭山 稔 (Yoshiyama, Minoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：30240956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、骨格筋は様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器として機能することが明らかとなってきた。本研究では骨格筋肥大に伴い、エクソソームに内包され分泌されるマイクロRNA(miRNA)を同定し、その機能解析を試みた。

網羅的解析の結果、筋肥大マウスや筋肥大培養細胞においてmiR206とmiR1aの発現が有意に増加していることが明らかとなった。miR206を培養血管内皮細胞に取り込ませたところ、HIF-1やVEGF-Aなど遺伝子発現の増加とともに、血管新生が促進されることが確認できた。以上の結果から、骨格筋肥大に伴いエクソソームに内包され分泌されるmiR206は血管新生を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管疾患患者に対する運動療法の有用性は確立し、臨床の現場においても心臓リハビリテーションとして広く普及してきているが、その有用性の分子機序は不明な点が多く残されている。運動により骨格筋から臓器保護的なホルモンが分泌され遠隔臓器に作用するというコンセプトを我々はこれまで様々なデータとして報告してきた。本研究で同定された骨格筋由来のエクソソームに内包され分泌されるマイクロRNAの同定は、そのコンセプトをさらに推し進めるものと考えられる。骨格筋から分泌されるマイクロRNAの更なる機能解析が今後の治療応用につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle is recently recognized not only as a motor organ but also as an endocrine organ. In the present study, we attempted to identify muscle-derived exosomal miRNA that has cardiovascular protective properties. We comprehensively analyzed serum exosomal miRNA derived from skeletal muscle-specific Akt1 transgenic mice (muscular mice) and control mice by PCR Array. Among 641 miRNAs, 50 miRNAs were upregulated, and 56 miRNAs were downregulated in muscular mice. We found that miR206 and miR1a were upregulated in IGF1-stimulated hypertrophied myotubes. Exogenous supplementation of miR206 showed angiogenic properties in vitro endothelial cells. These results suggest that muscle-derived miR206 act as a pro-angiogenic factor in response to muscle hypertrophy.

研究分野：循環器内科

キーワード：骨格筋 マイクロRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

運動療法は心血管疾患患者に対する最も基本的かつ有効な介入手段であり、心臓リハビリテーションとして広く普及している。従来は歩行やランニングを中心とした有酸素運動が推奨されてきたが、近年はそれに加えて骨格筋量の維持を目的とした筋力トレーニングも重要な構成要素の一つとなっている。進行性の筋萎縮を呈する心血管疾患患者の筋肉量を維持することは、疾患の進行予防にも効果があることが報告されているが、その分子機序については不明な点が多い。

骨格筋は“マイオカイン”と称される様々な生理活性物質を分泌していることが知られている。近年、細胞から分泌されるエクソソーム、特にエクソソームに包まれ分泌される miRNA が臓器連関において重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。これまで「骨格筋からエクソソームに包まれて miRNA が分泌される」との報告は散見されるが、骨格筋肥大に伴いエクソソームの分泌が増減するのか？内包される miRNA のプロファイルは変化するのか？それらは遠隔臓器で作用を発揮するのか？という点は全く不明であった。

2. 研究の目的

- (1) 骨格筋肥大に伴い、エクソソームに内包され骨格筋細胞外に分泌される miRNA 「マイオ miRNA」を同定し、その標的細胞と標的臓器における機能を明らかにすること。
- (2) 「マイオ miRNA」を生体に導入し、心血管疾患の新規治療手段になりうるかについて検討すること。

3. 研究の方法

(1) 筋肥大モデルマウスの血清中エクソソームに内包される miRNA の発現解析

筋肥大モデルマウス及びコントロールマウスの血清からエクソソームを抽出し、エクソソーム中の miRNA を抽出した。抽出した miRNA の発現プロファイルを miRNA real time PCR array にて網羅的に比較検討し、筋肥大マウスの血清エクソソーム中で有意に発現が増加した miRNA をリストアップした。次に候補 miRNA の組織発現プロファイルを定量的リアルタイム PCR で検証し、骨格筋において発現量が多く、特異性が高いものを筋肥大に伴いエクソソームに内包され分泌されるマイオ miRNA 候補とした。

(2) マイオ miRNA の標的細胞での機能解析

マイオ miRNA 候補を取り込ませたエクソソームを標的細胞に添加し、マイオ miRNA 候補の機能を解析した。標的細胞として血管内皮細胞を用いた。

(3) マイオ miRNA の in vivo での血管新生能の評価

マイオ miRNA の血管新生能を in vivo で検証した。IGF-1 を添加した培養骨格筋細胞の培養液中から抽出したエクソソームを下肢虚血マウスモデルに筋肉内注射し、血流改善の程度を検討した。

4. 研究成果

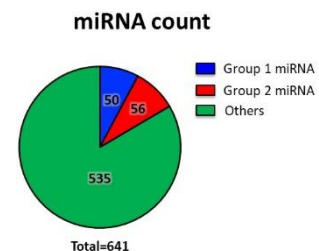
(1) 筋肥大モデルマウスの血清中エクソソームに内包される miRNA の発現解析

筋肥大モデルマウスとして我々が以前作成し報告している骨格筋特異的-誘導型 Akt1 トランスジェニックマウス (Akt1 TG マウス) を使用した。過去の報告と同様に、このマウスはドキシサイクリンの飲水投与にて、2週間後には有意な筋肥大を惹起することができた。その時点でマウスの血清を採取し、血清中のエクソソームを抽出した。Nano tracking assay にてコントロールマウスと骨格筋肥大モデルマウス (Akt1 TG マウス) の血中エクソソームの絶対量を比較検討したところ、30- 150nm、150nm 以上、いずれのサイズの粒子においても、Akt1 TG マウスはコントロールマウスと比較して増加傾向であったが、統計学的有意差は得られなかった。ウエスタンブロット法でエクソソームマーカーである CD9、CD63 の発現も有意差を認めなかったことから、骨格筋における Akt1 の過剰発現はエクソソームの発現と 分泌自体には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

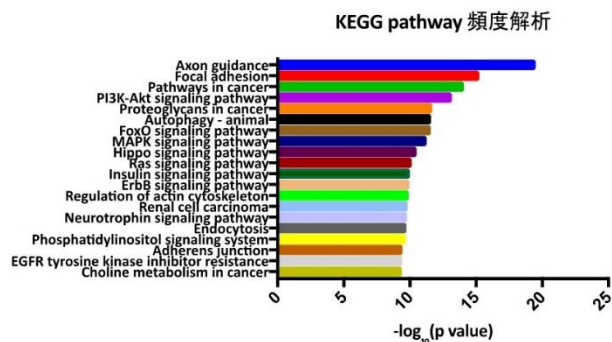
Akt1 TG マウス及びコントロールマウスの血清サンプル中のエクソソームから抽出した exosomal miRNA の発現を real time PCR array 解析で解析し、641 種類の miRNA が同定された。そのうち、コントロールマウスと比較し、Akt1 TG マウスで2倍以上発現が増加していた miRNA を group 1 として、50 種類の miRNA が検出され、0.5 倍以下に発現が減少していた miRNA を group 2 として、56 種類の miRNA が検出された。

Group	抽出条件	miRNA count
Group 1	Ratio ≥ 1	50
Group 2	Ratio ≤ -1	56

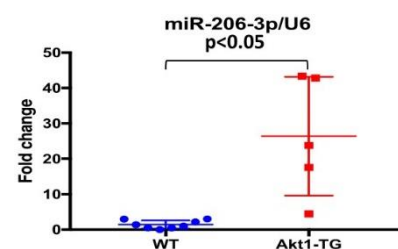
Ratio = log₂ Fold change (Akt1 TG mice / WT mice)



得られた miRNA に対して、Target Scan、miRDB 二つのデータベースを参照し、標的遺伝子予測を実施し、gene-info、gene2refseq 二つのデータベースでマウス遺伝子情報を取得した。その結果 group 1 の 50 種類の miRNA から 6930 種類の標的遺伝子を、group 2 の 56 種類の miRNA から 8171 種類の標的遺伝子を検出した。その中で、group 1 と group 2 の miRNA がともにターゲット にしている標的遺伝子を 4665 種類検出した。KEGG pathway 頻度解析では 171 種類の pathway が有意に出現しており、Gene Ontology 頻度解析では、biological process では 5494 種類の GO term が、cellular component では 629 種類の GO term が、molecular function では 889 種類の GO term が有意に出現していた。



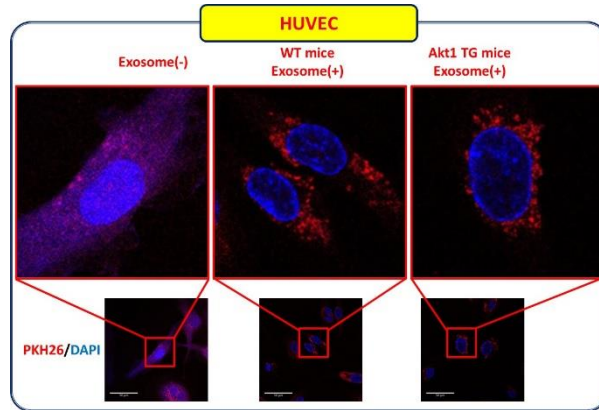
骨格筋で発現が高いと報告されている miR206、miR133a、miR1a などの発現は Akt1 TG マウス血清中のエクソソームにおいて有意に高値であった。これらの発現を Droplet Digital PCR (ddPCR) で定量評価した。Akt1 TG マウスの血中ではこれらの miRNA の上昇が確認できたが、骨格筋での発現はコントロールマウスと有意差を認めなかった。その原因として、骨格筋サンプルには骨格筋細胞以外にも血管構成細胞や線維芽細胞などが含まれることが考えられたため、培養骨格筋細胞を用いて骨格筋由来 miRNA 候補の発現を検討した。Akt シグナルを活性化する作用のあるインスリン様成長因子 (IGF-1) を培養骨格筋細胞に添加し、培養液中からエクソソームを抽出し、その中に含まれる miRNA の発現量を ddPCR で検討したところ、miR-206-3p の有意な上昇が確認できた。



(2) マイオ miRNA の標的細胞での機能解析

次にマウス血中のエクソソームが他の細胞に取り込まれるか否かを検証した。PKH26 でラベルしたマウス血中のエクソソームを血管内皮細胞 (HUVEC) に添加し取り込みを蛍光顕微鏡で観察したところ、核周囲に取り込まれたエクソソームを確認することができた。

我々は以前に Akt1 TG マウスでは下肢虚血後の血流回復が促進することを報告しているため、骨格筋由来 miRNA 候補の血管新生能を HUVEC を用いて評価した。HUVEC に miR206 を導入し HUVEC spheroid の血管新生を評価したところ、コントロールと比較して有意に血管新生が促進することが確認できた。また、miR206 を導入した HUVEC では HIF-1 α や VEGF-A などの遺伝子発現の増加が認められた。



(3) マイオ miRNA の in vivo での血管新生能の評価

骨格筋由来 miRNA の生体における血管新生能を評価するため、IGF-1 を添加した培養骨格筋細胞の培養液中から抽出したエクソソームを下肢虚血マウスモデルに筋肉内注射し、血流改善の程度をレーザードップラーを用いて評価した。エクソソーム導入群で血流回復が促進される傾向にあったが、統計学的に有意差を認めなかった。

以上の成果から、骨格筋肥大に伴いエクソソームに内包され血中に放出される miR206 は、内皮細胞に作用し血管新生を促進する可能性が示唆された。これらマイオ miRNA の生体での機能解析を進めることで、レジスタンストレーニングの有用性の機序の一部がさらに明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉家康宏
2. 発表標題 Skeletal Muscle is a Target Organ to Combat with Diabetes-related Cardiovascular Disorders through Secretion of Muscle-derived Factors and miRNAs
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 会長特別企画（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉家康宏
2. 発表標題 骨格筋から見た新規心不全治療標的の探索
3. 学会等名 第7回日本心不全学会学術賞 受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 泉家康宏
2. 発表標題 心不全の治療標的としての 骨格筋を考える
3. 学会等名 69回 日本心臓病学会学術集会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 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
研究分担者	泉家 康宏 (Izumiya Yasuhiro) (10515414)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	

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