

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10558

研究課題名(和文) 心筋梗塞後に活性化するカルパインの新しい役割

研究課題名(英文) A new role of calpain in myocardial infarction

研究代表者

新谷 香(石田香)(Shintani-Ishida, Kaori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50345047

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)：カルパインは、機能タンパク質や構造タンパク質を限定分解することで心筋梗塞を含む様々な病態に關与する。一方、miRNAはタンパク質の転写後発現調節に關与する。筋芽細胞は筋細胞に分化して筋肉の損傷部位を修復する。本研究では、カルパイン阻害や細胞の老化が筋芽細胞の筋特異的miRNAであるmiR-133aとmiR-1の発現量を低下させ、筋分化能を悪化させることを見出した。これらのmiRNAを過剰発現させると筋分化能は回復した。加齢マウスから単離した筋芽細胞においても、miR-133aとmiR-1発現量が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋特異的miRNAの発現を調節するというカルパインの新しい役割が見出された。さらに、筋特異的miRNAは加齢によっても発現が抑制され、筋芽細胞の筋分化能を低下させることが明らかになった。筋肉が損傷を受けると筋幹細胞が活性化し、筋芽細胞となって分化し、筋管細胞を形成し、損傷部位を再生する。本研究結果は、心筋梗塞後の心筋傷害だけでなく、高齢者に見られる骨格筋萎縮(加齢性筋肉減弱症)にも関係していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Calpain, a protease, breaks down functional and structural proteins and mediates diseases including myocardial infarction. miRNAs are involved in post-transcriptional regulation. This study found a new role of calpain: calpain regulates muscle-specific miRNA expression. In C2C12 mouse myoblasts, calpain inhibition or cell senescence downregulated miR-133a and miR-1 expression and suppressed myogenic differentiation. Overexpression of miR-133a and/or miR-1 ameliorated the differentiation. In addition, primary cultured myoblasts prepared from aged mice exhibited a decrease in miR-1 and miR-133a levels compared with younger mice.

研究分野：法医学

キーワード：miRNA 筋肉 分化 加齢

## 1. 研究開始当初の背景

カルパイン (calpain : CPN) は、細胞内  $Ca^{2+}$  要求性のシステインプロテアーゼで、様々な機能タンパク質や構造タンパク質を限定分解する。CPN の活性化は神経変性疾患、虚血性疾患、がんなどの多くの疾患の増悪に関与している。急性心筋梗塞の病態を再現する虚血再灌流モデルでは、心筋細胞の細胞質に局在する CPN が活性化する結果、細胞骨格タンパク質であるフォドリンが分解され心筋細胞死 (心筋梗塞) を引き起こす (Circ Res 1995;77:603-610) と考えられている。

心筋梗塞後の心臓は、心臓血管周囲の線維化を主とする心臓リモデリングと呼ばれる代償機構が働くが、これが進行すると心不全に陥り、突然死のリスクが高まる。リモデリングには、線維化を促進するサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 TGF- $\beta$  1 とその下流のシグナル経路 TGF- $\beta$  1/Smad が重要な役割を果たしている。心筋梗塞後、レニン・アンジオテンシン系の活性化により TGF- $\beta$  1 は前駆体として産生された後、タンパク質分解酵素のプロセッシングを受け活性化する。CPN は、肺高血圧症モデルマウスにおいて活性化しており、TGF- $\beta$  1 を限定分解により活性化させ、TGF- $\beta$  1/Smad 経路を介してコラーゲン合成や血管平滑筋細胞増殖を促進する結果、血管リモデリングを進展させる (J Clin Invest 2011;121:4548-4566)。著者は、前回の科研費研究で血管平滑筋に局在する CPN も心筋梗塞後に活性化することを見出し、TGF- $\beta$  1/Smad シグナルのスイッチとなる TGF- $\beta$  1 前駆体のプロセッシングに関与していると考えた。しかし、予想に反して、CPN は TGF- $\beta$  1 の活性化ではなく、前駆体の産生に関与していること、また TGF- $\beta$  1 の発現誘導は転写レベルではなく翻訳レベルであることを見出した。これらの結果から CPN の転写後発現調節機構への関与が示唆された。

microRNA (miR) は約 22 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、遺伝子の転写後発現調節に関与している。標的となる mRNA に結合し、不安定化と翻訳抑制によってタンパク質産生を抑制する。がんの抑制/促進因子の発現調節など、様々な生理現象、疾患の分子機構に関与していると言われ、近年急速に研究が進展している。そのような中、最近、慢性閉塞性肺疾患をモデルとした高  $CO_2$  曝露後の気道平滑筋細胞で、細胞内カルシウム上昇から活性化した CPN が、miR-133a の発現を低下させ、アクチン張力の調節を担うタンパク質 RhoA の発現抑制機能を低下させるという論文が報告された (Sci Transl Med 2018;10:1662)。これは miRNA を介したタンパク質発現調節という新しい CPN の役割を示した知見である。一方、miR-133a は TGF- $\beta$  1 の発現を抑制することが知られている。これらの知見から、心筋、平滑筋さらに骨格筋に局在する CPN は miR-133a などの筋特異的 miRNA の発現低下を引き起こし、タンパク質発現量を調節するのではないかと考えられた。

ところで、心筋や骨格筋の CPN 発現量は加齢に伴い増加してくることが古くから知られている (Comp Biochem Physiol B 1993;104:63-67)。加齢は虚血性心疾患の予後不良因子であるが、CPN の加齢による変化との関係は明らかでない。

## 2. 研究の目的

これらの背景から本研究では、CPN が遺伝子の転写後発現調節を担う miRNA の発現量を低下させることでタンパク質発現量を調節し、筋肉細胞の障害に関与するという仮説を検証する。また、この機構が加齢による影響を受けるかどうか検討する。

## 3. 研究の方法

In vitro の実験では、マウス骨格筋由来 C2C12 筋芽細胞株を用い、継代を繰り返すことで細胞老化を誘導した。10% のウシ胎児血清を含む Dulbecco 's modified Eagle medium (DMEM) を増殖培地として 60%-70% コンフルエントになるまで培養した後、分化培地 (2% のウシ血清を含む DMEM) に交換し、筋管細胞への分化を誘導した。miRNA の過剰発現には、5  $\mu$ M miRNA mimic を Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) を用いて細胞に導入した。老化細胞の除去は、10  $\mu$ M BPTES [Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide] を含む増殖培地で細胞を 48 時間インキュベートした。筋管細胞への分化率 (fusion index) は、抗 myosin heavy chain (MHC) 抗体を用いて分化した筋細胞を免疫染色し、DAPI で染色された核の数に対する筋管細胞の割合を計測した。miRNA の定量は TaqMan<sup>TM</sup> MicroRNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、リアルタイム RT-PCR を行った。タンパク質の発現はウェスタンブロッティング法を用いて定量した。老化関連酸性  $\beta$ -galactosidase 活性の測定には SPiDER- Gal cellular senescence plate assay kit (Dojindo Laboratories) を用いた。老化細胞除去後の細胞数は CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Cell Viability Assay (Promega) を用いて評価した。

筋芽細胞の初代培養は、京都府立医科大学動物実験委員会の審査を受け承認された後 (承認番

#### 4. 研究成果

##### (1) カルパイン阻害剤の miRNA 発現量と筋分化に対する影響

まず、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞を用いて、カルパイン活性と筋細胞障害の関係について検討した。分化誘導中にカルパイン阻害剤を添加したときの筋分化への影響や miRNA 発現量の変化について検討した。骨格筋由来の C2C12 細胞株を分化培地に交換すると筋分化が誘導されるが、分化培地にカルパイン阻害剤 MDL-28170 を添加すると、分化誘導 7 日後の細胞数、fusion index は有意に低下した。また、筋特異的 miRNA である miR-133 や miR-1 の発現量は分化誘導により経時的に増加したが、カルパイン阻害剤により有意に抑制された。miR-133 と miR-1 の miRNA mimic を細胞にトランスフェクションしたところ、カルパイン阻害剤による筋分化抑制作用はキャンセルされた。また、内因性カルパイン阻害剤であるカルパスタチンの発現量を調べると、分化誘導により発現量が減少することが明らかになった。これらの結果から、カルパインは筋分化誘導中の miR-133a と miR-1 の発現上昇に関与していることが示唆された。

##### (2) 複製老化は C2C12 細胞の筋分化能と筋特異的 miRNA 発現量を低下させる

カルパイン活性は加齢とともに増加することが知られている。カルパイン阻害剤添加により、筋特異的 miRNA 発現量が変化し、筋分化能が低下したことから、加齢による筋分化能低下にも筋特異的 miRNA 量の変化が関与していると予想した。そこで、C2C12 細胞を 20 回まで継代培養を繰り返したところ、老化マーカーである p16INK4a と p21 の発現が誘導され、 $\beta$ -galactosidase 活性も増加し、複製老化の誘導が確認された。この加齢モデルについて分化能を評価したところ、fusion index は継代 10 回、20 回と繰り返すごとに低下した。また、筋形成マーカーである MyoD、myogenin、MHC の発現誘導が抑制された。継代の繰り返しは miR-1 および miR-133a の発現量を低下させ (図 1B)、さらに、筋分化に伴う発現誘導も抑制された (図 1A)。

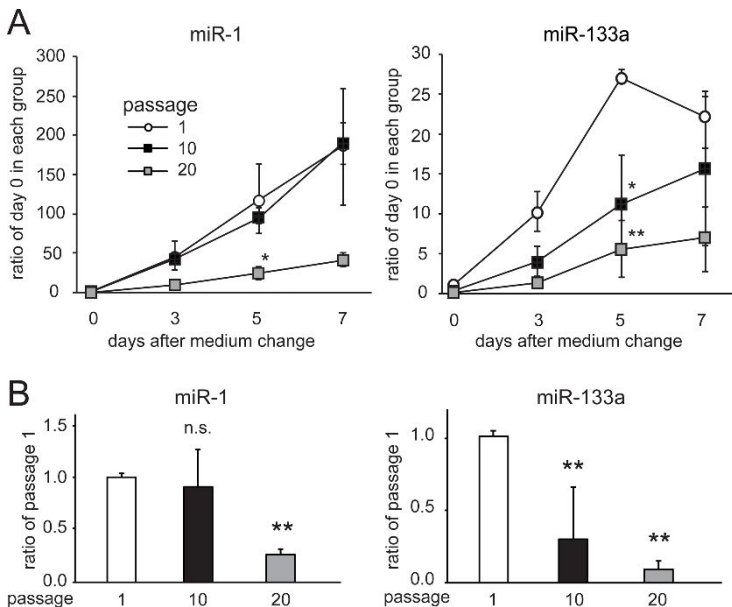


図 1 複製老化の miR-1 と miR-133a 発現量に対する影響

(A) 分化培地に交換後の miR-1 と miR-133a の発現量の変化。継代 1 回、10 回、20 回目の細胞を筋分化させた。means  $\pm$  SE (n = 6 dishes). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (各タイムポイントで継代 1 回目と比較し、Tukey-Kramer test で評価)。 (B) 各継代回数 of 細胞の分化開始直前 (パネル A の 0 日に相当) の miR-1 と miR-133a の相対量 means  $\pm$  SE (n = 6 dishes). \*\*P < 0.01 vs. passage 1 (Dunnett's test). [PLoS ONE 2023;18(1):e0280527 より引用]

##### (3) 筋特異的 miRNA の過剰発現は複製老化による分化能低下を改善する

miR-1 と miR-133a の発現量増加が老化細胞の筋管細胞形成不全を改善するのか検討するために、miR-1、miR-133a の合成 miRNA mimic を導入し fusion index を測定した。その結果、miR-1 あるいは miR-133a の過剰発現は継代 10 回目の老化細胞の fusion index を増加させた。miR-1 と miR-133a を共に過剰発現させると分化能はさらに改善した。

##### (4) 老化細胞の除去により筋特異的 miRNA 誘導阻害が解除され、分化能が向上する

miR-1 と miR-133a の発現誘導が細胞老化によって抑制されていることを確認するために、老化細胞をグルタミナーゼ阻害剤 BPTES [bis-2-(5-phenyl-acetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide] で除去したときの分化能と miR-1 および miR-133a の発現量の変化を検討した。継代 20 回目の老化細胞を BPTES で処理後に生存した細胞の p21 発現量は 60% に減少し、fusion index は 3 倍、MHC 発現量は 30 倍に増加した。miR-133a 量は有意に増加し、miR-1 量もわずかではあったが増加した。このことから、細胞老化による筋特異的 miRNA の発現量の低下が加齢による筋分化能低下に関与していることが示唆された。

( 5 ) 老齡マウスにおける miR-1 と miR-133a の発現量

3 ヶ月齡の若齡マウスと 20 ヶ月齡の老齡マウスから筋芽細胞を単離し、miR-1 と miR-133a の発現量を比較すると、老齡マウスの両 miRNA 量は若齡マウスの約 1/10 に低下していた。

( 6 ) 今後の展望

筋芽細胞の筋特異的 miRNA である miR-133a と miR-1 はカルパイン活性や加齡の影響を受けて発現量が変化し、筋分化能を制御することが明らかになった。筋肉は損傷を受けると筋芽細胞が筋分化して損傷部位を再生する。本研究で得られた知見は心筋梗塞後の心筋傷害のみならず、高齡者に見られる骨格筋萎縮（加齡性筋肉減弱症）などの病態にも関係していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Idota Nozomi, Shintani-Ishida Kaori, Ichioka Hiroaki, Kondou Hiroki, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Rapid infusion of excessive phenytoin: A newborn autopsy case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101935 ~ 101935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2021.101935	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 Nakamura Mami, Idota Nozomi, Shintani-Ishida Kaori, Hitosugi Masahito, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Simple, Frequent Indicator for Personal Identification? Postmortem and Antemortem Abdominal Computed Tomography Findings of a Charred Body	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Forensic Medicine & Pathology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAF.0000000000000522	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 Nakamura Mami, Shintani-Ishida Kaori.	4. 巻 46(9)
2. 論文標題 A new role of peripheral serotonin on drug-induced hyperthermia at a high ambient temperature.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 38 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shintani-Ishida Kaori, Tsurumi Riko, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Decrease in the expression of muscle-specific miRNAs, miR-133a and miR-1, in myoblasts with replicative senescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0280527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0280527	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴海莉子、坂東李紗、近藤弘基、新谷 香、池谷 博
2. 発表標題 骨格筋再生過程における筋特異的miRNAのCalpainによる発現調節
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新谷 香、坂東李紗、近藤弘基、河本真孝、松成亮太、池谷博
2. 発表標題 筋芽細胞の筋特異的miRNAは加齢に伴って減少する
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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