

<研究課題>

骨格筋から分泌されるマイクロRNAの網羅的解析による、サルコペニアの新規治療標的の同定

代表研究者 大阪市立大学大学院医学研究科 循環器内科学 准教授 泉家康宏
 共同研究者 熊本大学大学院生命科学研究部 循環器内科学 大学院生 石田俊史
 熊本大学大学院生命科学研究部 循環器内科学 助教 有馬勇一郎

【まとめ】

心血管疾患患者では進行性の骨格筋萎縮いわゆるサルコペニアが高頻度に発生し、死亡の独立した危険因子となることが報告されている。筋力トレーニングは、心不全の進行予防に効果があるとされているが、その機序は不明である。近年エクソソームに内包され分泌されるマイクロRNAが臓器間クロストークにおいて重要な役割を担っている事が報告されており、本研究では骨格筋肥大に伴い分泌されるmiRNAの網羅的解析を行った。

1. 研究の目的

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候補miRNAを同定し、その標的細胞と標的臓器における機能を基礎実験で明らかにすること。

高齢化社会へと突き進む我が国において、心不全患者は爆発的に増加することが予想され、昨今その現象は「心不全パンデミック」と称されている。薬物療法・非薬物療法の進歩に伴い、心不全患者の予後は改善してきたが、5年生存率はがんと同等と報告されており、より有効な治療法が求められている。運動療法は心不全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。その理由として、高齢化社会を迎え、骨格筋量と機能の低下いわゆるサルコペニアが大きな問題となってきていることが挙げられる。進行性の筋萎縮を呈する心不全患者の筋肉量を維持することは、心不全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明らかになってきた。申請者はこれまで任意の時期に骨格筋肥大が誘導可能な骨格筋特

異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスモデルを作製し、骨格筋の発育・肥大が他の臓器に与える影響について研究を行い、骨格筋から心血管保護因子が分泌され¹、心筋梗塞後のリモデリング²や腎臓の線維化・炎症を抑制すること³を報告してきた。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になってきた^{4,5}。しかしながら、骨格筋が分泌型miRNAの供給源であるという報告はほとんどなく、骨格筋細胞からエクソソームは分泌されるのか?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る。そこで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候補miRNAを同定し、標的臓器での機能解析を行うことを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 骨格筋からエクソソームに包まれ分泌される候補miRNAを同定する

骨格筋肥大モデルとして、われわれが作成し報告してきた骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウス (Akt1 TG マウス)¹ を使用した。Akt1 TG マウスは遺伝子発現制御のために Tet-On システムを利用している。つまりテトラサイクリン (あるいはそのアナログであるドキシサイクリン) が飲水投与されている状況でのみ、骨格筋特異的に Akt1 遺伝子が過剰発現する。Akt1 は様々な細胞応答を仲介する細胞内シグナルであるが、骨格筋においては細胞肥大・筋肥大の中心的役割を演じている。骨格筋での Akt シグナルの活性化は主にタイプ II 線維 (速筋・白筋) の肥大を惹起するが、タイプ I 線維 (遅筋・赤筋) の数や肥大にはあまり寄与しない。その結果 Akt1 TG マウスは筋肉量と筋力は増加するが、持久力は増加しない表現型を示し、レジスタンストレーニングを再現できるマウスモデルと考

えられる。

われわれはこれまでの Akt1 TG マウスを用いた研究において、高脂肪食によるメタボリックシンドローム、心筋梗塞後の心臓リモデリング、尿管結紮モデル後の腎障害は Akt1 遺伝子の過剰発現後 2 週間の時点から有意な改善が認められることを報告している。したがって本研究においても、Akt1 による骨格筋肥大を誘導してから 2 週間後の骨格筋と血清サンプルを解析する方針とした。

本研究においても、Akt1 TG マウスにドキシサイクリンを 2 週間飲水投与し、これまでのわれわれの報告と同程度の骨格筋肥大を惹起することができた。一方コントロールマウスはドキシサイクリンを飲水投与しても骨格筋サイズは変化しなかった。Akt1 遺伝子の過剰発現は定量的 PCR 法とウエスタンブロット法にて確認した。

Akt1 の過剰発現により発現が増加した miRNA が骨格筋局所のみならず、遠隔臓器で作用を発揮するためには血中での発現量も増加している必要がある。血中の miRNA はエクソソームに内包されて血中へ分泌されるため、われわれは Akt1 TG マウスとコントロールマウスの血中からエクソソームを抽出し、その中の miRNA 発現を比較検討した。我々はマウスの血清サンプル中から超遠心法を用いてエクソソームを単離し、miRNA を抽出する系を確立した(図 1)。

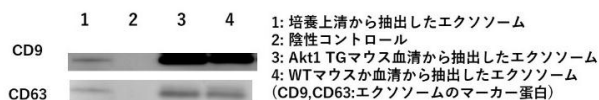


図1.超遠心分離法によるエクソソーム抽出

抽出した miRNA の発現を miRNA real time PCR array にて網羅的に比較検討し、骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスの血清サンプル中のエクソソームから抽出された exosomal miRNA の PCR array 解析を行った。

2-2 候補 miRNA の標的細胞での機能解析をする

骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスの血清から抽出した exosomal miRNA の real time PCR array から得られた結果を元に、変動した miRNA の標的 mRNA の機能解析を KEGG pathway 頻度解析及び、Gene Ontology 頻度解析を元に行い、候補 miRNA の選定を行った。

2-3 ヒト血液サンプル中の候補 miRNA の発現を測定し、運動療法のバイオマーカーとな

りうるかを検討する

熊本大学循環器内科の心血管疾患入院患者のうち、サルコペニア群、非サルコペニア群に分け、血液サンプルの血清中のエクソソーム分画から基礎実験で同定された候補 miRNA のヒトでのホモログの発現量を測定する。BMI・除脂肪体重や下腿 CT にて計測した骨格筋量と候補 miRNA の発現量との相関を検討する。また リハビリテーション前後のサンプルで心肺機能検査パラメーターとの相関を検討し、候補 miRNA が臨床的バイオマーカーとなりうるかを検討する。

3. 研究の成果

3-1 骨格筋からエクソソームに含まれ分泌される候補 miRNA を同定する

Akt1 TG マウスの血清サンプル中のエクソソームから抽出された exosomal miRNA の PCR array 解析を行った(図 2)。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。

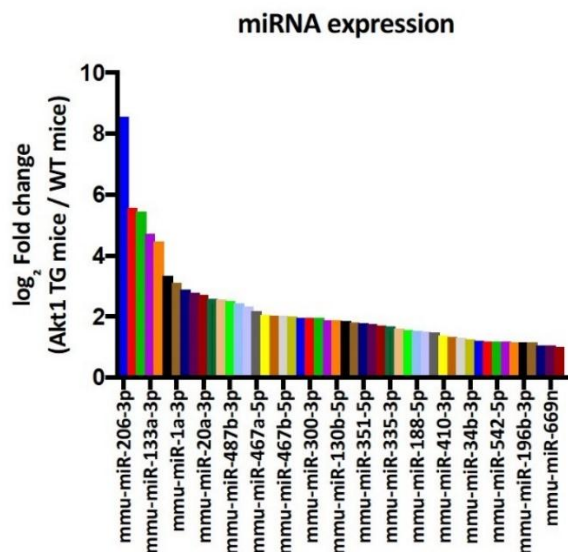


図2.骨格筋特異的Akt1過剰発現マウスの exosomal miRNA の real time PCR array

エクソソーム自体の蛋白量はコントロールマウスと比較し、骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスでは増加傾向を示したが、有意差は認めなかった(図 3)。

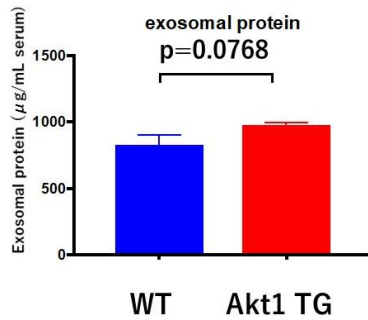


図3.骨格筋特異的Akt1過剰発現マウスのエクソソーム蛋白の比較

Akt1 TG マウスの血清から抽出した exosomal miRNA の real time PCR array から得られた結果を元に、今回の real time PCR array で、641 種類の miRNA が抽出された。そのうち、コントロールマウスと比較し、骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスで 2 倍以上発現が増加していた miRNA を group 1 とし、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、56 種類の miRNA が検出された。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。

また標的遺伝子群がどのような pathway に多く含まれるかを知るために、KEGG pathway に出現する頻度の解析を行い、そして標的遺伝子群の生物学的特徴を知る為に、Gene Ontology term の出現頻度による解析を行った(図 4)。

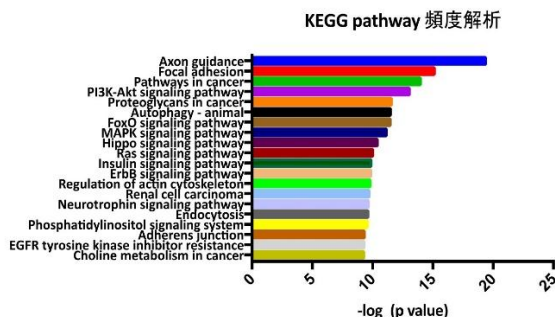


図4.骨格筋特異的Akt1過剰発現マウスの標的mRNAのKEGG pathway頻度解析

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。KEGG pathway 頻度解析と Gene Ontology 頻度解析で得られた結果を元に現在候補 miRNA の絞り込みを行っている。

また real time PCR array の結果の validation を ddPCR で行っており、いくつかの miRNA は real time PCR array の結果と同様の結果を示していた(図 5)。

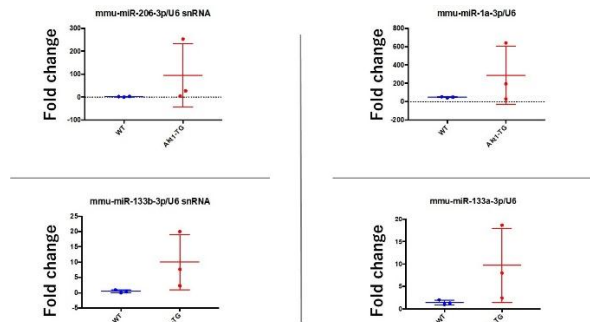


図5.Real time PCR arrayで得られた結果に対するddPCRでのvalidation

4. 今後の課題

Akt1 TG マウスの血清から抽出した exosomal miRNA の real time PCR array から得られた結果の validation を、本研究室で新たに系を立ち上げた ddPCR で行っており、早期に validation を完了する必要がある。in vitro でも同様に骨格筋肥大を誘導した培養骨格筋細胞(C2C12 myotube)でも候補 miRNA の発現を確認する予定である。またストックしてある各組織サンプルで ddPCR で補 miRNA の発現解析を行い、候補 miRNA の主な供給源である分泌臓器を同定する。

また臨床データとして、熊本大学循環器内科の心血管疾患入院患者をサルコペニア群、非サルコペニア群に分け、患者背景をマッチングし、候補 miRNA の発現を比較することを短期的な目標として予定している。

今後の長期的な目標としては、候補 miRNA の心血管治療の可能性を in vivo で検証する。心不全モデルマウスや下肢虚血モデルマウスを作成し、候補 miRNA をエクソソームに取り込ませ投与することで心不全抑制や下肢虚血抑制に寄与するか否かを検討する。また候補 miRNA の miRNA mimic や miRNA inhibitor や knock out マウスを作成し、標的細胞や臓器での機能解析を行う。

臨床応用としては、心血管患者、サルコペニア患者で筋力トレーニング前後での、候補 miRNA を測定し、筋力トレーニングの臨床的バイオマーカーとなりうるかを検証する。

骨格筋由来分泌因子は様々な疾患の臨床バイオマーカーとなることが報告されてき

ている。われわれもこれまで新規骨格筋由来分泌因子候補であるGrowth differentiation factor-15 (GDF-15)^{6, 7}やThrombospondin-2 (TSP-2)⁸が心不全患者の疾患重症度や予後を予測する新規バイオマーカーとなりうることを報告してきた。本研究で探索した血中の分泌型miRNAも将来的に臨床的バイオマーカーとなることが期待される。本研究によって得られた成果は骨格筋量の維持がなぜ心血管内分泌代謝制御に重要であるのかを解き明かす鍵になるのみならず、新たな治療薬標的の開発へとつながるトランスレクションリサーチとなりうると思われる。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた研究成果については、学術論文として公表することを予定している。

6. 謝辞

上記研究を推進するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 三井住友海上福祉財団に深く感謝いたします。

参考文献

1. Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK and Walsh K. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab.* 2008;7:159-72.
2. Araki S, Izumiya Y, Hanatani S, Rokutanda T, Usuku H, Akasaki Y, Takeo T, Nakagata N, Walsh K and Ogawa H. Akt1-mediated skeletal muscle growth attenuates cardiac dysfunction and remodeling after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail.* 2012;5:116-25.
3. Hanatani S, Izumiya Y, Araki S, Rokutanda T, Kimura Y, Walsh K and Ogawa H. Akt1-mediated fast/glycolytic skeletal muscle growth attenuates renal damage in experimental kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:2800-11.
4. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA and Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2012;14:249-56.
5. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, Just A, Remke J, Zimmer K, Zeug A, Ponimaskin E, Schmiedl A, Yin X, Mayr M, Halder R, Fischer A, Engelhardt S, Wei Y, Schober A, Fiedler J and Thum T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2014;124:2136-46.
6. Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S, Kojima S, Yamamuro M, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Sugiyama S and Ogawa H. Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts. *Heart Vessels.* 2014;29:231-7.
7. Izumiya Y, Hanatani S, Kimura Y, Takashio S, Yamamoto E, Kusaka H, Tokitsu T, Rokutanda T, Araki S, Tsujita K, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S and Ogawa H. Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Can J Cardiol.* 2014;30:338-44.
8. Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S, Kimura Y, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S and Ogawa H. Circulating thrombospondin-2 reflects disease severity and predicts outcome of heart failure with reduced ejection fraction. *Circ J.* 2014;78:903-10.