

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	早 坂 太 希
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Sarcopenia-derived exosomal micro-RNA 16-5p disturbs cardio-repair via a pro-apoptotic mechanism in myocardial infarction in mice</b>  (サルコペニア誘導性エクソソーム マイクロRNA 16-5pはマウスの心筋梗塞における  アポトーシス促進を介して心修復を阻害する)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p>竹原有史、青沼達也、鹿野耕平、堀内至、中川直樹、  田中宏樹、川辺淳一、長谷部直幸と共著</p> <p style="text-align: center;">Scientific Reports (令和3年9月受理)</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>サルコペニアは骨格筋萎縮によって引き起こされる病態であり、サルコペニアを合併した心疾患患者の予後が悪いことが報告されている。しかしながら、適切な疾患モデルの実験系がなく、その機序については十分に解明されてはいない。本研究の目的は、心筋虚血後マウスに下肢骨格筋萎縮を誘導することで、サルコペニア合併虚血性心疾患において心機能修復障害をきたす疾患モデルを確立し、その機序を明らかにすることである。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

**【方法 1】** マウスの左冠動脈を開胸直視下で 45 分間結紮した後開放し、虚血再灌流(I/R; Ischemic/Reperfusion)モデルを作成した。その翌日から 2 群に分け、一方には尾懸垂装置を用いて 7 日間の下肢免荷による骨格筋萎縮の誘導を行った。この群を I/R-TS(+)群(TS; Tail Suspension)とし、もう一方は対照群として通常のゲージで飼育した(I/R-TS(-)群)。I/R 手術前、術翌日、8 日、29 日に心エコーによる心機能解析および下腿の筋力計測をおこなった。また、骨格筋および心臓については組織学的検討を行った。

虚血心と萎縮骨格筋の関連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マイクロ RNA に着目し、I/R 手術後尾懸垂 7 日目の検体で網羅的解析を行った。抽出された複数のマイクロ RNA を両群全頭の定量的 PCR 法により再検証し、同定されたマイクロ RNA を本研究のターゲットとしてさらに**【方法 2】****【方法 3】**の実験を計画した。

**【方法 2】** 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に対して、1%O<sub>2</sub> 低酸素培養条件下でアポトーシスを誘導、さらに miR-16-5p mimic を遺伝子導入し、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。miR-16-5p が制御するターゲット遺伝子としてオートファジー制御遺伝子 SESN1 に着目し、そのアポトーシスとの関与について調べるため、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 3】** 循環血液中の miR-16-5p 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 miR-16-5p 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 mir-16-5p を経静脈的に投与し、心機能への影響を評価した。

## 成 績

**【I/R マウスにおける骨格筋萎縮の誘導】** I/R-TS(+)群では 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、下肢筋力の低下、筋線維面積の減少を認め、TS により骨格筋萎縮が誘導されることを確認した。

**【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。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、病理組織学的評価では線維化組織面積の増大が確認された。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。

**【候補マイクロ RNA の同定】** マウス血清中エクソソーム内のマイクロ RNA 網羅解析の結果、統計学的に有意な変化量の大きい miR-16-5p と miR-144-3p が抽出された。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た。

【miR-16-5p による低酸素誘導アポトーシスの亢進】miR-16-5p mimic を遺伝子導入後、低酸素培養したラット心筋細胞では TUNEL 陽性率が非導入群に比べて有意に高く、p53 mRNA および Cleaved-caspase-3 蛋白の発現量が亢進していた。低酸素培養によりラット心筋細胞に誘導されたアポトーシスが miR-16-5p 遺伝子導入によって亢進していることが示された。

【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。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。一方、mTOR のリン酸化は亢進し、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 群で減少していた。ラット心筋細胞で miR-16-5p は SESN1 抑制的に働き、低酸素培養下で亢進する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(+)マウスの各器官における miR-16-5p 発現量を評価したところ、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。また、I/R マウスに miR-16-5p mimic 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。循環血中 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ことが示唆された。

## 考 案

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。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は疾病管理、治療介入の観点から重要である。

マイクロ RNA は遺伝子の発現調整を担う短い非翻訳性 RNA であり、組織修復でも重要な役割を果たすことが知られている。心疾患に関連するマイクロ RNA はこれまでも多く報告されているが、心不全や心臓悪液質における直接的な役割については未だ十分に解明されていない。

Hughes らは miR-31 が加齢マウスにおいて廃用による萎縮骨格筋内で増加し、さらにそれによって骨格筋障害を引き起こすことを報告している<sup>1</sup>。我々は、萎縮骨格筋及び心臓で増加した miR-16-5p がエクソソームに内包して分泌され、循環血液を介して心臓に到達することで直接的に心修復に悪影響を及ぼすことを示した。その機序として、ストレス誘導性アポトーシスが miR-16-5p 発現増強を介して亢進される仮説をたて検証を行った。miR-16-5p は直接的に SESN1 をターゲットとして翻訳を抑制し、筋芽細胞の増殖・分化に

影響を与えることが Cai らによって報告されており<sup>2</sup>、Li らは SESN1/2 のダブルノックアウトマウスにおいてオートファジー不全によりドキシソルビシン心筋障害が重症化することを示している<sup>3</sup>。今回、ラット心筋細胞への miR-16-5p mimic の遺伝子導入では、低酸素培養下でアポトーシス細胞の増加を示したが、通常の酸素条件下ではこの現象は確認することができなかった。これは低酸素下で与えられる酸化ストレスによって誘導されたアポトーシスが、miR-16-5p による SESN1 発現抑制を介した細胞保護的オートファジーの抑制の結果、さらに促進したことを示している。従って本研究において、サルコペニアによる心修復不全の病態が、miR-16-5p 発現増強による心筋アポトーシス促進効果に基づくことが示されたと考える。

## 結 論

心筋虚血後にサルコペニアを併発させると、循環血中エクソソームに内包したmiR-16-5pの発現増強を介し、障害心筋の回復が阻害されることが示された。心筋細胞でmiR-16-5pがSESN1の翻訳を抑制することで、細胞保護的なオートファジーを抑制し、アポトーシスが促進することがその機序の一つである。このmiR-16-5pを介した一連の心臓への悪影響は、廃用症候群を併発するような重症心不全患者における今後の治療ターゲットとなる可能性がある。

## 引用文献

- 1) Hughes, D. C. et al. Alterations in the muscle force transfer apparatus in aged rats during unloading and reloading: impact of microRNA-31. J.Physiol.596, 2883-2900; 101113/JP275833(2018)
- 2) Cai, B. et al. MiR-16-5p targets SESN1 to regulate the p53 signaling pathway, affecting myoblast proliferation and apoptosis, and is involved in myoblast differentiation. Cell Death Dis. 9, 367; 10.1038/s41419-018-0403-6(2018)
- 3) Li, R. et al. Cardioprotective roles of sestrin 1 and sestrin 2 again doxorubicin cardiotoxicity. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 317, H39-H48; 10.1152/ajpheart. 00008.2019(2019)

## 参考文献

- 1) **Hayasaka T**, Kawamura Y, Kobayashi Y, Kitani Y, Hontani M, Sugiyama E, Sumitomo K, Tanabe Y, Akasaka K, Takeuchi T, Sato N, Hirasawa K, Hasebe N. Back somersault-induced atrioventricular nodal reentrant tachycardia - A case of a 15-year-old promising gymnast. J Cardiol Cases. 2020 Dec 26;24(1):14-19.
- 2) Takeguchi-Kikuchi S, **Hayasaka T**, Katayama T, Kano K, Takahashi K, Saito T, Sawada J, Minoshima A, Sakamoto N, Akasaka K, Miyokawa N, Nishino I, Ishibashi-Ueda H, Hasebe N. Anti-signal Recognition Particle Antibody-positive Necrotizing Myopathy with Secondary Cardiomyopathy: The First Myocardial Biopsy- and Multimodal Imaging-proven Case. Intern Med. 2019 Nov 1;58(21):3189-3194.
- 3) Horiuchi K, Kano K, Minoshima A, **Hayasaka T**, Yamauchi A, Tatsukawa T, Matsuo R, Yoshida Y, Tomita Y, Kabara M, Nakagawa N, Takehara N, Hasebe N, Kawabe JI. Pericyte-specific deletion of ninjurin-1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2021 Jun 1;320(6):H2438-H2447.
- 4) Kano K, Horiuchi K, Yoshida Y, **Hayasaka T**, Kabara M, Tomita Y, Tatsukawa T, Matsuo R, Sawada J, Nakagawa N, Takehara N, Hasebe N, Kawabe JI. EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model. Stem Cell Res. 2020 Jul 21;47:101914.
- 5) Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Matsuo R, **Hayasaka T**, Yoshida Y, Kabara M, Yasuda S, Nakajima K, Nakagawa N, Takehara N, Okizaki A, Hasebe N, Kawabe JI. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Nov 12;519(3):462-468.

令和3年11月17日

大学院博士課程委員会委員長 殿

審査委員長 大田 哲生



学位論文審査結果の報告について

早坂 太希 氏提出の学位論文審査及び学力の確認を終了しましたので、  
下記により提出します。

記

1. 学位論文の要旨（3,000字以内）
2. 学位論文の審査結果の要旨（600～800字以内） 1部
3. 学力確認の結果

審査委員長 大田 哲生

適・否



審査委員 武輪 能明

適・否






審査委員 紙谷 寛之

適・否



## 学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	早坂 太希
		審査委員長	大田 哲生 
		審査委員	武輪 能明 
		審査委員	紙谷 寛之 
学 位 論 文 題 目			
<p>Sarcopenia-derived exosomal micro-RNA 16-5p disturbs cardio-repair via a pro-apoptotic mechanism in myocardial infarction in mice.</p> <p>(サルコペニア誘導性エクソソーム マイクロ RNA 16-5p はマウスの心筋梗塞におけるアポトーシス促進を介して心修復を阻害する)</p> <p>掲載雑誌 : Sci Rep. 2021 Sep 27;11(1):19163.</p>			
<p>(本論文が評価される点及び審査結果を600字から800字以内で簡潔に記載すること。)</p> <p>本研究は、サルコペニアと心不全を合併した病態が予後不良であることの理由を、新たに開発した疾患モデルによる動物実験で解明するために行われた。マウスの左冠動脈を45分間結紮後に開放し、虚血再灌流モデルを作成。翌日から尾懸垂装置を用い、7日間の後肢免荷による運動制限で骨格筋萎縮を誘導したサルコペニア合併群と免荷せず移動可能なコントロール群で比較したところ、結紮解放29日後ではサルコペニア合併群の左室駆出率は有意に低下し、組織学的検査による梗塞サイズも有意に大きかった。</p> <p>そこで、細胞間の情報伝達に参与する、循環血液中のエクソソーム内のマイクロRNAに着目し網羅的に解析したところ、合併群においてmiR-16-5pの有意な発現亢進を認め、定量PCR解析ではmiR-16-5pは心筋および後肢筋由来であることが判明した。</p> <p>また、虚血を模した低酸素培養下ラット新生仔心筋細胞によるin vitroモデルでは、miR-16-5pの遺伝子導入で、オートファジーを促進するsestrin1の転写が抑制され、その結果オートファジーが抑制されることが判明した。さらに、循環血液中のmiR-16-5p発現亢進が虚血心に及ぼす影響を検証するため、虚血性心疾患を模倣した虚血再灌流マウスにmiR-16-5pを尾静注したところ、運動可能な状態でも、サルコペニア合併群と同様に低下した左室駆出率の改善は認めず、心機能の回復不全を引き起こすことが示された。</p> <p>以上より、サルコペニアと心筋虚血併存の病態では、萎縮骨格筋および虚血心で産生されたmiR-16-5pがエクソソームに内包されて障害心筋に到達、オートファジーの抑制を介してアポトーシスが促進することで心筋の回復不全をおこすことが示唆された。このことは、今後、運動耐用能の低下したサルコペニア患者における心機能改善に向けての新たな方策を見出す糸口になると考えられ、有意義な研究と考える。</p> <p>また申請者は審査員の諮問に対して的確な回答を示し、関連分野における知識も十分に備えており、学位を付与するに値すると判断した。</p>			