

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17496

研究課題名 (和文) 骨格筋特異的マイクロRNAによるCOVID-19関連骨格筋障害の抑制

研究課題名 (英文) Rescue of COVID-19-related skeletal muscle damage by skeletal muscle-specific microRNA

研究代表者

森 拓也 (Mori, Takuya)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70897412

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要 (和文) : COVID-19感染症においてHMGB1は炎症の重症化に重要な役割を果たす。一方、HMGB1はがん性悪液質においてもサルコペニアの発生に強く関連する。HMGB1は筋芽細胞のミトコンドリアエネルギー産生を障害することを明らかにした。その機序の上で重要なのがHMGB1により誘導されるmiR-494である。miR-494はPGC-1 $\alpha$ とc-mycの発現抑制を介してエネルギー産生を低下させ、筋成熟度を低下させた。これらのことから、COVID-19におけるサルコペニアの発生にはHMGB1-miR-494 axisが重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19感染症における骨格筋障害の抑制は患者の早期退院・早期社会復帰を促進する上で重要である。申請者はがん性サルコペニアにおいてHMGB1抑制の有効性を見出している。本研究ではこのHMGB1抑制効果を検討する。このとき、HMGB1は宿主自然免疫に重要な役割を有するため、HMGB1に関連するマイクロRNAを同定しこれを標的とすることで、宿主自然免疫を保持しつつHMGB1を抑制しようとするものである。本研究の成果はCOVID-19関連筋萎縮を抑制し患者予後を改善することが期待される。

研究成果の概要 (英文) : In COVID-19 infection, HMGB1 plays an important role in the severity of inflammation. HMGB1 is also strongly associated with the development of sarcopenia in cancer cachexia. HMGB1 has been shown to impair mitochondrial energy production in myoblasts. Of mechanistic importance is miR-494, which is induced by HMGB1. miR-494 reduced energy production and muscle maturation via suppression of PGC-1 $\alpha$  and c-myc expression. Taken together, these findings indicate that the HMGB1-miR-494 axis plays an important role in the development of sarcopenia in COVID-19.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：COVID-19 サルコペニア HMGB1 マイクロRNA エネルギー代謝

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### (1) 研究の背景

COVID-19 は SARS-CoV-2 ウイルスの感染による呼吸器障害を主症状に、種々の臓器障害を発症する疾患である。この申請書を作成している時点で、国内の感染者は 10 万人に近づき、死者数は 1600 人を超えている。COVID-19 における骨格筋障害は軽視されがちだが、入院患者の約 55% に骨格筋障害が認められており (Islam MF, Fatigue Biomed Health Behav. 2020)、社会復帰のために長期のリハビリテーションが必要になっている (Li J, Eur J Physical Rehab, 2020)。退院後も、骨格筋障害は COVID-19 後遺症として高頻度に見られ、慢性疲労症候群との類似が指摘されている (Islam MF, Fatigue Biomed Health Behav. 2020)。このように、COVID-19 における骨格筋障害は COVID-19 患者の社会復帰の障壁の一つとなっている。

HMGB1 は TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインネットワークを活性化し、がん性悪液質の原因となる (Ohmori H, Mori T, Pathobiology, 2019)。さらに、がん細胞から放出された HMGB1 は、骨格筋にも高レベルに発現している受容体である RAGE を介して骨格筋にオートファジーを誘導し筋萎縮をもたらす (Luo Y, Cancer Res, 2014)。癌から放出される HMGB1 を抑制することにより、がん性筋萎縮が改善されることを申請者は見出している (Kawahara I, Mori T, Pathobiology, 2018)。また、がん以外にも、炎症や脱神経に伴う骨格筋萎縮において HMGB1 が障害を増悪させることが報告されている (Yang X, Cell Commun Signal. 2018; Muth IE, Exp Neurol. 2015)。

COVID-19 入院患者においては HMGB1 血中濃度が上昇しており、予後不良と相関している (Chen L, Cell Mol Immunol. 2020)。HMGB1 は、SARS-CoV-2 ウイルス感染により産生・分泌が増加し、SARS-CoV-2 の細胞内侵入を促進し (Street ME, Horm Res Paediatr. 2020)、サイトカインストームを惹起する (van den Berg DF, Front Immunol. 2020)。直接肺障害をもたらすのみならず (Andersson U, Mol Med. 2020)、筋障害においても HMGB1 はオートファジーの促進、細胞内サイトカイン産生亢進などから、その病態に強い相関を示している (Mousa RF, Metab Brain Dis. 2020)。また、細胞外の HMGB1 は細胞外のウイルス核酸と結合し、RAGE を介して細胞質に入り炎症反応を惹起することが COVID-19 における骨格筋萎縮の一因として重視される (Andersson U, Mol Med. 2020)。このように、HMGB1 は COVID-19 の病態形成とその悪化に強く関与しており、HMGB1 の抑制はリハビリなどの抗ウイルス薬と同等あるいはそれ以上の抗コロナウイルス効果を示すとされる (Cinatl J, Lancet. 2003)。このように、HMGB1 の抑制は COVID-19 患者の管理に重要であると考えられている (Çelebier M, Comb Chem High Throughput Screen. 2020)。一方、HMGB1 は宿主自然免疫の活性化に不可欠であり (Andersson U, Semin Immunol. 2018)、COVID-19 感染症では免疫抵抗性を保持するため HMGB1 抑制を骨格筋に限局して行う必要がある。

### (2) 研究の目的

COVID-19 感染症における骨格筋障害の抑制は患者の早期退院・早期社会復帰を促進する上で重要である。申請者はがん性サルコペニアにおいて HMGB1 抑制の有効性を見出している。本研究ではこの HMGB1 抑制効果を検討する。このとき、HMGB1 は宿主自然免疫に重要な役割を有するため、HMGB1 に関連するマイクロ RNA を同定しこれを標的とすることで、宿主自然免疫を保持しつつ HMGB1 を抑制しようとするものである。本研究の成果は COVID-19 関連筋萎縮を抑制し患者予後を改善することが期待される。

### (3) 研究方法

マウスがん性悪液質モデルを用いて HMGB1 のサルコペニアにおける作用をマウス筋芽細胞 C2C12 を用いて検討した。HMGB1 によるマイクロ RNA の変化を網羅的に解析し、HMGB1 の標的マイクロ RNA を抽出した。このマイクロ RNA の作用機序をミミックやインヒビターを用いて解析した。

### (4) 結果

われわれはマウスがん悪液質モデルを用いて、悪液質性骨格筋萎縮に関わる因子を検討した。悪液質モデルは、

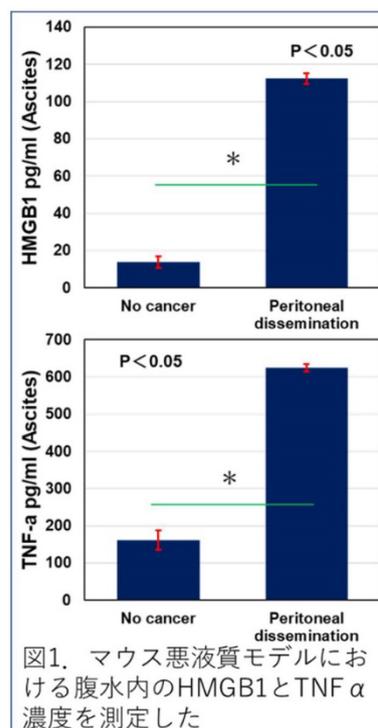


図1. マウス悪液質モデルにおける腹水内のHMGB1とTNF $\alpha$ 濃度を測定した

BALB/c マウスに対し、CT26 癌細胞 ( $1 \times 10^6 / 0.2 \text{ mL}$ ) を腹腔内接種にて作成し、平均 40% 程度の骨格筋萎縮が生じるモデルを確立している。悪液質の腹水では HMGB1 と TNF- $\alpha$  の増加を確認した (図 1)。HMGB1 は、骨格筋において mTOR 活性を抑制し、オートファジー関連タンパク質を増加させ、オートファジーを誘発した。次に、HMGB1 を含む腹水を事前に筋管細胞に分化させた C2C12 細胞の培地に 20% 添加し、48 時間培養後、骨格筋ミトコンドリア代謝を測定した。腹水処理された C2C12 細胞のミトコンドリアは基礎呼吸、ATP 産生、プロトンリーク、最大呼吸、および予備容量が大幅に低下した (図 2)。これらの結果より、HMGB1

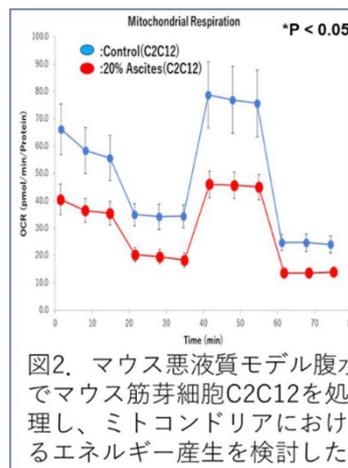


図2. マウス悪液質モデル腹水でマウス筋芽細胞C2C12を処理し、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生を検討した

に関連するミトコンドリア機能障害は悪液質骨格筋萎縮の1つの要因に関与している可能性が示唆された。HMGB1 は重症感染症における増悪因子として知られており、TNF $\alpha$ 、IL-

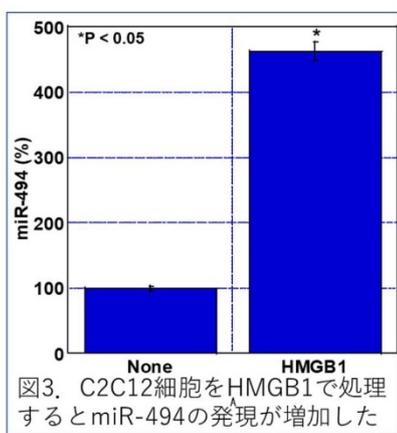


図3. C2C12細胞をHMGB1で処理するとmiR-494の発現が増加した

$\beta$ 、IFN $\gamma$  などとともに相互分泌誘導作用を有し、サイトカイン・ストームの発生の引き金を引くことから、COVID-19 感染症における役割についても注目が集まっている (Al-Kuraishy HM, Inflammopharmacology. 2022, Andersson U, Mol Med. 2020)。HMGB1 がサルコペニアを惹起することが今回の検討から明らかになったことから、COVID-19 感染

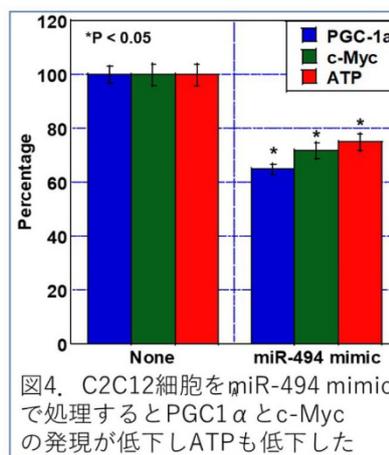


図4. C2C12細胞をmiR-494 mimicで処理するとPGC1 $\alpha$ とc-Mycの発現が低下しATPも低下した

症においても HMGB1 がサルコペニアの原因因子として重要視される。

COVID-19 感染症においても HMGB1 がサルコペニアの原因因子として重視されことから、マウス筋芽細胞 C2C12 を HMGB1 で処理した時に、変化するマイクロ RNA を

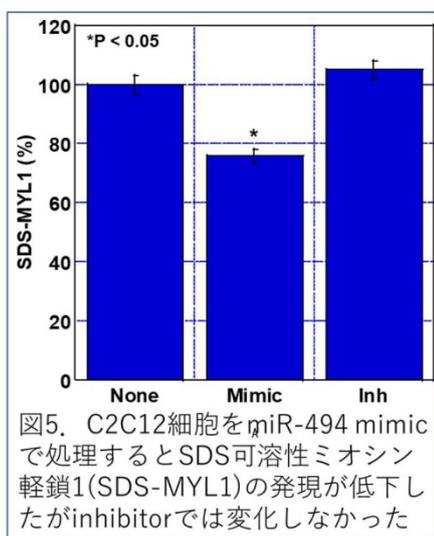


図5. C2C12細胞をmiR-494 mimicで処理するとSDS可溶性ミオシン軽鎖1(SDS-MYL1)の発現が低下したがinhibitorでは変化しなかった

網羅的に検討した。その中で、もっとも発現が亢進したのが miR-494 であった。HMGB1 処理により、miR-494 は 4.6 倍に発現が増加した (図 3)。miR-494 ミミックにて C2C12 細胞を処理すると、PGC-1 $\alpha$  と c-myc の発現が抑制され、ATP 産生が低下した (図 4)。さらに、筋成熟度を示す SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 のタンパクレベルが低下した。逆に、miR-494 インヒビターで HMGB1 と同時処理した C2C12 細胞では、ATP 産生の低下や SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 のタンパクレベルの低下は認められなかった (図 5)。これらのことから、HMGB1 により誘導される miR-494 を抑制することにより、

COVID-19 感染症におけるサルコペニアを抑制する可能性が示唆された。

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2021

課題番号：21K20808

研究課題名（和文）ミトコンドリア障害に起因する抗がん剤抵抗性の獲得機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of acquisition of anticancer drug resistance caused by mitochondrial disorders

研究代表者

森 汐莉 (Mori, Shiori)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00907032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗がん剤抵抗性はがん治療における重要な障壁のひとつで、ミトコンドリアの抗がん剤抵抗性への関与が注目される。本研究では、ミトコンドリアDNAに障害を有する癌細胞を樹立し、その性質を解析したところ、部分的な障害を有する部分 $\rho$ 0細胞では増殖能、酸素消費量および幹細胞性低下やROS産生や抗がん剤耐性の増大とともに炎症促進作用が亢進しており悪液質を惹起した。がん細胞は持続的な抗がん剤処理に伴って部分 $\rho$ 0形質を獲得したことから、抗がん剤耐性獲得の新たな機序として注目される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法によって誘導されるミトコンドリア障害が抗がん剤抵抗性を誘導することが明らかになった。抗がん剤によるミトコンドリアDNAの障害が抗がん剤耐性をもたらすことは、ほとんどの抗がん剤において一般的に生じ得る抗がん剤耐性獲得機序であり、がん治療において重要な知見と見なされる。今後この新たな耐性抑制の標的を抽出し治療戦略に結びつけることが出来れば、がん化学療法における大きな進展となり、癌患者の予後改善をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：Anticancer drug resistance is one of the key barriers in cancer therapy. Recently involvement of mitochondria in anticancer drug resistance has been focused. In this study, we established cancer cells with mitochondrial DNA damage to analyze their characteristics. We found that cancer cells partially damaged in mitochondrial DNA (partial  $\rho$ 0 cells) showed increased pro-inflammatory effects and induced cachexia, along with decreased proliferative capacity, oxygen consumption and stemness, and increased ROS production. They also showed anticancer drug resistance. Since cancer cells acquired partial  $\rho$ 0 phenotype upon continuous treatment with anticancer drugs, this is a new mechanism for the acquisition of anticancer drug resistance.

研究分野：実験病理

キーワード：抗がん剤耐性 ミトコンドリア  $\rho$ 0形質 幹細胞性 ROS 悪液質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤抵抗性はがん治療における重要な障壁のひとつで、この機序を解明し抵抗性獲得を予防あるいは解除することは、がん治療に大きな改善をもたらすと期待される。Zhuらは、抗がん剤抵抗性の獲得機序について、抗がん剤の細胞内蓄積阻害、DNA修復機序の亢進、アポトーシスの阻害、上皮間葉移行、シャペロン、オートファジー、DNAメチル化、マイクロRNA発現などストレス反応性の変化を挙げているが (Zhu, Drug Des Devel Ther. 2016)、最近、ミトコンドリアにおける脂質代謝 (Kopecka J, Drug Resist Updat. 2020)やミトコンドリア-幹細胞性関連 (Skoda J, Pharmacol Res. 2019)が抗がん剤抵抗性に関連することが知られ、ミトコンドリアの抗がん剤抵抗性への関与に注目が集まっている (Shen L, Exp Cell Res. 2021)。

近年、種々の抗がん剤によりミトコンドリアDNAに障害がもたらされることが報告されている。これには、シスプラチン (Kleih M, Cell Death Dis. 2019)、ドキソルビシン (Yin J, Toxicol In Vitro. 2018)、5-FU (Bergandi L, Front Pharmacol. 2018)などの抗がん剤が含まれている。さらに、化学療法後のミトコンドリアDNA 8OHdGの低レベル?とコピー数減少などのミトコンドリアDNA障害は種々の癌の進展に相関している (Lin CH, Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2008; Maybury BD, Anticancer Res. 2013)。一方でミトコンドリアDNAを標的とする抗がん剤は癌細胞を効果的に障害する (Peng YB, Chem Med Chem. 2017)。このような、抗がん剤によるミトコンドリアDNA障害と惹起する形質の齟齬に対して、申請者はミトコンドリアDNA障害の程度の差異が関与すると考えた。

### 2. 研究の目的

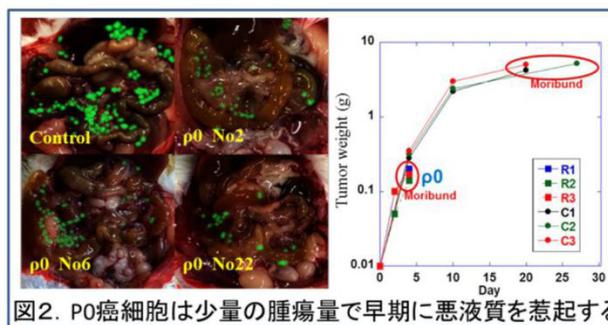
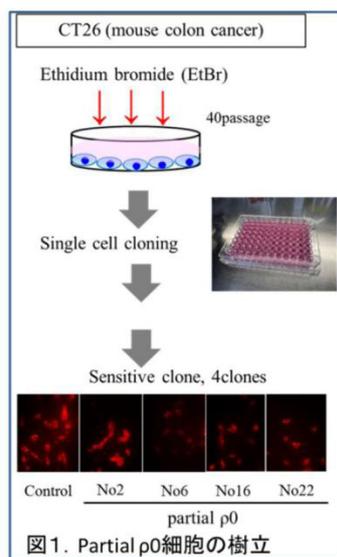
化学療法によって誘導されるミトコンドリア障害が抗がん剤抵抗性を誘導する機序を解明することにより、新たな耐性抑制の標的を抽出し治療戦略に結びつけることが本研究の目的である。抗がん剤によるミトコンドリアDNAの障害が抗がん剤耐性をもたらすことは、ほとんどの抗がん剤において一般的に生じ得る抗がん剤耐性獲得機序であり、高い新規性と独自性を示している。この機序を解明し抗がん剤耐性獲得を阻害することが出来れば、がん化学療法における大きな進展となり、癌患者の予後改善をもたらすと期待される。

### 3. 研究の方法

$\rho 0$ 細胞、部分 $\rho 0$ 細胞および親株の代謝スペクトラムの相違を比較検討するため、シーホース・フラックス解析により酸化的リン酸化と解糖系の変化を検討する。薬剤 (5-FU およびドキソルビシン)の有無による変化も併せて検討する。申請者の先行研究では、MIA-PaCa-2の部分 $\rho 0$ 細胞はゲムシタピン処理によりエネルギー代謝が酸化的リン酸化から解糖系にリプログラミングされROS産生が低下し細胞死が抑制されていた (谷里奈, 森汐莉, 日本病理学会, 2019)。このため、酸化ストレス産生の変化についても、ミトコンドリア由来のスーパーオキシドと過酸化水素、細胞全体における過酸化脂質の生成を検討する。また、幹細胞性を、スフェアアッセイ、シングルセル・サバイバルアッセイ、幹細胞関連遺伝子発現により比較検討する。

### 4. 研究成果

$\rho 0$ 細胞とはミトコンドリアDNA (mtDNA) 障害により、コードされた電子伝達系が抑制された細胞である。 $\rho 0$ 細胞を樹立するためマウスCT26細胞に常法であるEtBr持続投与を行ったところ、mtDNAに変異はみられないが、増殖能、酸素消費量および幹細胞性低下やROS産生増大が確認された。以上よりmtDNAを保持しているがミトコンドリア機能障害がみられた細胞株をpartial  $\rho 0$ 細胞 (p $\rho 0$ )と定義した (図1)。またこのp $\rho 0$ 細胞を同系のマウスに腹腔内接種したところ、親株と比べて腫瘍量が少ないにも関わらず炎症メディエーターの発現亢進により著しい悪液質



が生じた (図2)。さらに p $\rho$ 0 の腫瘍における意義を明らかにするために、抗がん剤による p $\rho$ 0 の誘導を検討した。CT26 に CDDP および 5-FU の持続処理を行ったところ、mtDNA の変異はみられなかったものの、ミトコンドリア膜電位の低下および幹細胞性低下と ROS 産生増大が生じた (図3)。また炎症メディエーターの CXCL3 および IL-8 の遺伝子発現増加がみられた。以上より、がん細胞は持続的な抗がん剤処理に伴って p $\rho$ 0 形質を獲得し、宿主に炎症を誘導することが示唆された。さらに、 $\rho$ 0 細胞では薬剤耐性が著しく減弱したのに対し、partial  $\rho$ 0 細胞では薬剤耐性が認められ、その原因として幹細胞性の亢進が示唆された。

