

令和元年9月3日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03082

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾を介する骨格筋糖代謝の分子適応機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic modification of neuronal nitric oxide synthase gene in skeletal muscle on glucose metabolism

研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋糖代謝調節機構における重要な分子である、一酸化窒素を合成する酵素(nNOS)の遺伝子発現について、身体不活動、加齢および運動に対する応答にDNAメチル化が関与しているか、検討した。その結果、身体不活動により骨格筋のnNOSのDNAメチル化の増加とタンパク発現の減少を認め、エピジェネティックな遺伝子修飾が関与していることが明らかとなった。また、加齢によりnNOSタンパク発現の亢進を認め、豊かな環境はその亢進を減弱させたが、それらの調節機構にエピジェネティックな遺伝子修飾の関与を証明するには至らなかった。これらの研究成果の一部は、国内外の学会及び学術雑誌にて公開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身体不活動や肥満による生活習慣病の蔓延は、医療費の増大を招くことから、早急に対策を講じる必要のある喫緊の課題である。しかしながら、なぜ、身体不活動や肥満が、糖尿病や認知症などに代表される生活習慣病を惹起するのかその詳細なメカニズムはわかっていなかった。本研究では、骨格筋の糖代謝調節の一端を担う一酸化窒素に着目し、その合成酵素である神経型一酸化窒素合成酵素の遺伝子発現が、DNAのメチル化を介して調節されている可能性を明らかにした。一酸化窒素は、筋萎縮や加齢による不安現象と関係していることがわかっており、将来的にはサルコペニア・フレイル予防や認知症予防につながる研究となることを期待している。

研究成果の概要(英文)：We determined whether neuronal nitric oxide synthase (nNOS) DNA methylation is involved in the regulation in gene expression in mice skeletal muscle and brain under physical inactivity, aging, and exercise training. The average nNOS DNA methylation level in skeletal muscle after cast immobilization was significantly increased compared with that in control mice, suggesting epigenetic modification occurred in inactive muscle. We also determined the association between ageing and nNOS expression in the brain from rearing mice in an enriched environment (EE) or sedentary environment. We observed that nNOS expression levels increased with age in the brain aged mice. While EE reduced nNOS expression in the brain. In the present state we did not clear the association nNOS gene expression and DNA methylation in the brain. Our studies suggest that physical activity has therapeutic potential to prevent muscle atrophy and age-related impairment of brain function via nNOS/NO pathway.

研究分野：健康科学

キーワード：DNAメチル化 一酸化窒素合成酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、消化・吸収した糖処理の大部分を担う組織である。我々は、骨格筋の糖代謝調節機構において、一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) と過酸化水素 (Hydrogen peroxide: H₂O₂) が身体不活動や運動刺激による急性及び慢性適応に係る重要な分子である可能性を見出し、活性酸素種の核内制御機構の解明を進めてきた。核内制御機構の一つに、DNA のメチル化および脱メチル化による転写制御機構があり、同じ DNA 配列でもメチル化されると眠る遺伝子、脱メチル化されると働く遺伝子に制御される。これまで、糖尿病発症に係わる遺伝子多型解析より、同一の体質を有していても肥満や環境要因 (身体活動や栄養摂取) によりリスクが異なることから、遺伝子多型を修飾する機構の関与を推測し、以下の仮説を立てた。

【作業仮説】

加齢、肥満、トレーニングおよび身体不活動は、間欠的または持続的な酸化ストレス刺激を惹き起こすが、糖代謝に及ぼす酸化ストレス刺激への適応 (良役) と破綻 (悪役) の違いは、核シグナル伝達分子である NO をトリガーとする糖代謝調節遺伝子のプロモータ領域のメチル化及び脱メチル化で調節されている。

2. 研究の目的

- (1) 骨格筋糖代謝亢進に係る神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal NO synthase: nNOS) の発現について、筋線維タイプ別および臓器ごとに検討すること。
- (2) 筋不活動が nNOS の発現及び DNA メチル化修飾に及ぼす影響を明らかにすること。
- (3) 加齢に伴う骨格筋組織と脳組織の nNOS 発現および不安様行動に対する運動の抗加齢効果を明らかにすること。
- (4) 高脂肪食負荷による肥満および運動の併用が脳および骨格筋組織の nNOS の発現及び DNA メチル化修飾に及ぼす影響を明らかにすること。
- (5) 身体不活動に伴う酸化ストレス暴露は血糖コントロールの破綻を来し、慢性腎臓病 (CKD) 発症のリスクを増大させる。そこで、新規 CKD 発症と運動習慣との関係を前向きコホート研究より明らかにすること。
- (6) CKD 発症予防のための至適運動強度を決定するために、運動強度と腎血流量との関係を明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6J 雄性マウス (10-11 週齢) を被検動物とした。被検部位は、全血、脳 (大脳、小脳、海馬)、臓器 (腎臓、肝臓、結腸、心臓)、遅筋の代表としてヒラメ筋と腓腹筋 (赤色部)、速筋の代表として長趾伸筋、腓腹筋 (白色部)、足底筋、混在型の筋として前脛骨筋を用いた。各組織から DNA を抽出後、パイロセフェン処理によるメチル化領域の標識を行った。PCR 法による DNA 増幅後に、パイロシーケンス法によって DNA メチル化レベルを定量した。
- (2) C57BL/6J 雄性マウス (10-11 週齢) を用い、1 週間の片側後肢ギプス固定によるギプス群と、同様の環境下で飼育した無処置群に分類した。被験筋は長趾伸筋 (EDL) とヒラメ筋 (Sol) とした。筋線維横断面積 (CSA) 及び筋線維タイプ割合は、MHC-s 抗体を用いた免疫組織化学染色により定量した。nNOS タンパク質及びプロモータ領域の DNA メチル化レベルは、ウェスタンブロット法及びパイロシーケンス法を用いて定量した。
- (3) C57BL/6J 雄性マウス (10-74 週齢) を用い、12 週齢、48 週齢、72 週齢、84 週齢時に解剖し、各組織を採取した。尚、運動の抗加齢効果を検証するために、78 週齢より豊かな環境で飼育する群と通常飼育環境群の 2 群を設定した。豊かな環境とは、自発運動を促すホイール、木片、プラスチック製管などが配置された飼育ゲージで飼育することとし、マウスは 6 週間、それらの環境下で飼育した。行動テストには、ランウェイテストを用い、暗い場所から明るい場所への移動回数と移動距離より、不安様行動を評価した。nNOS タンパク質及びプロモータ領域の DNA メチル化レベルは、ウェスタンブロット法及びパイロシーケンス法を用いて定量した。また、nNOS の遺伝子発現は、リアルタイム PCR 法にて解析した。
- (4) C57BL/6J 雄性マウス (6 週齢) を用い、マウスは普通食群と高脂肪食群にランダムに分け、6 週間飼育した。6 週間の食事介入後、高脂肪食群は運動 (HFD+Ex) 群と、運動を行わず、食事介入のみ継続した (HFD) 群に分け、さらに 6 週間飼育した。6 週間の運動介入に割り付けられたマウスはマウス回転式運動量測定器のゲージで飼育した。HFD+Ex 群の運動は自発的運動とし、その運動量はゲージに付属するカウンターにより評価した。介入の各時点で、上記 (3) と同様な手法を用いて解析を行った。

- (5) 2008年に特定健診を受診し、腎機能が正常で6年間追跡可能であった男性303名(平均年齢 52.2 ± 6.7 歳)を対象とした。観察期間を独立変数、推定糸球体濾過率(eGFR)を従属変数とし、個々に観察期間に対するeGFRの一次回帰直線を求め、一次回帰直線の傾きをeGFR低下速度と定義した。自記式質問票を用いて、運動、身体活動、食事、喫煙、飲酒に関する9つの生活習慣について調査を行い、健康的生活習慣の保有数を7個以上、6個、5個、4個以下の4群に分類し、4群間におけるeGFR低下速度について検討した。
- (6) CKDステージ2に分類される対象者に漸増運動負荷試験を施行し、運動強度と腎血流量の関係について検討した。腎血流量の評価には、超音波診断装置を用いた。

4. 研究成果

- (1) 脳におけるnNOSのDNAメチル化レベルは海馬で高値を示した。臓器においては顕著な差がみられなかった。骨格筋においては前脛骨筋と長趾伸筋で高値を示し、ヒラメ筋と足底筋では低値を示した。また、海馬、腎臓、前脛骨筋、長趾伸筋では個体差がみられた。(学会発表)
- (2) 1週間の片側後肢ギプス固定は無処置群に比べて、ヒラメ筋における筋重量及び筋線維横断面積の顕著な減少がみられた。萎縮が見られたヒラメ筋のnNOSタンパク量は減少し、一方DNAメチル化は増加した($p < 0.05$)。(学会発表)
- (3) 加齢に伴うnNOS発現は、海馬と小脳で増加し大脳皮質では変わらなかった。不安様行動は加齢に伴い増加するが、高齢を迎えたのち、豊かな環境で飼育されたマウスは不安様行動が軽減されると共に、海馬や小脳で増加したnNOSのタンパク発現が抑制された(図1)。

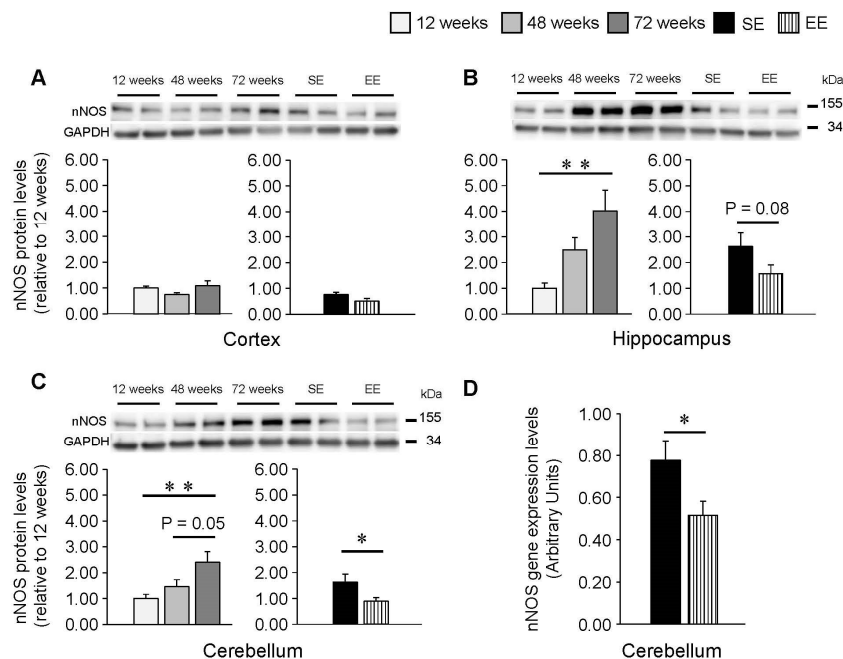


Fig. 1 nNOS protein expression levels in the cortex (A), hippocampus (B), and cerebellum(C) from 12-, 48-, and 72-week standard and enriched environment groups. (発表論文 より引用)

遺伝子発現レベルについて、小脳を被験組織として解析した結果、タンパク発現と同様に抑制されていた。以上のことから、豊かな環境はnNOSの遺伝子発現およびタンパク発現を修飾することで不安様行動を調節している可能性が考えられた。(発表論文、学会発表)

DNAメチル化解析は、組織及び臓器ごとに進めており、骨格筋については筋線維タイプ別の評価を追加解析している。

- (4) 高脂肪食負荷により、海馬及び大脳皮質のnNOSタンパク発現は増加し、運動との併用により改善された。Aktのリン酸化は、海馬の運動併用群においてのみ観察された。また、高脂肪食負荷により肝臓脂肪蓄積の経時的変化および骨格筋のグリコーゲン蓄積について報告した(発表論文、学会発表)

- (5) 6年間に於ける eGFR 低下速度は、平均 $-1.27 \pm 1.16 \text{ ml/min/1.73m}^2/\text{年}$ であった。健康的生活習慣を7個以上有する群は、4個以下の群に比べて eGFR 低下速度が有意に低く($p < 0.05$)。健康的生活習慣と eGFR 低下速度は量-反応関係にあることが明らかとなった(p for trend < 0.0001)。また、ベースライン時の年齢、BMI、eGFR で調整後、運動習慣があるものと夕食以外の間食が少ないものは、そうでないものに比べて eGFR 低下速度が有意に低かった。(発表論文、学会発表)
- (7) 平均年齢70歳の高齢男性(CKD ステージ2)を対象に漸増運動負荷試験を施行し、乳酸閾値(LT)強度を決定した。LT 強度を境に60%、80%、100%、120%、140%LT 強度の多段階運動負荷試験を行い、各ステージ終了直後に腎血流量とカテコールアミン値を評価した。その結果、運動による腎血流量の低下はLT 強度以降に観察され、その背景にはアドレナリンやノルアドレナリンなどの交感神経系亢進の関与が推察された。以上のことから、CKD 者に対する至適運動強度はLT 強度以下の運動であることが明らかとなった(発表論文、学会発表)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- Tomiga Y et al. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 476(4), pp635-640, 2016
- Tomiga Y et al. Exercise training rescues high fat diet-induced neuronal nitric oxide synthase expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice. *Nitric Oxide*, 66(1), pp81-77, 2017
- 吉村 咲紀他、経時的CT撮影による肝脂肪蓄積の評価と自発的運動の効果、*体力科学*, 66(4), pp283-291, 2017
- Yoshimura S et al. Short- and long-term effects of high-fat diet feeding and voluntary exercise on hepatic lipid metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 507, pp291-296, 2018
- 道下 竜馬他、慢性腎臓病(CKD)発症予防に対する生活習慣、*日本臨床生理学雑誌*, 48(5), pp147-153, 2018
- Long-term body weight gain after maturity is associated with the incidence of chronic kidney disease (CKD), independent of current body weight, in middle-aged and older Men. *J Epidemiol*, 2018 Epub ahead of print.
- Kotoku K et al. Effect of exercise intensity on renal blood flow in patients with chronic kidney disease stage 2. *Clin Exp Nephrol*, 23(5), pp621-628, 2019

[学会発表](計19件)

- 伊藤 愛他、組織及び筋線維タイプにおける nNOS の DNA メチル化修飾に関する研究、日本体力医学会大会、2015
- 富賀 裕貴他、片脚ギプス固定による筋萎縮が nNOS プロモータ領域の DNA メチル化修飾に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2015
- Tomiga Y et al. Association between anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase in old mice under enriched environment. アメリカスポーツ医学会、2016
- 富賀 裕貴他、高脂肪食摂取及び運動介入が骨格筋 nNOS 発現と DNA メチル化に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2016
- 吉村 咲紀他、高脂肪食誘発性脂肪肝に対する運動の効果、日本体力医学会大会、2016
- 釘本 郁美他、高脂肪食と運動トレーニングの併用がグリコーゲン量に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2016
- 釘本 郁美他、高脂肪食と運動トレーニングの併用が脂肪酸酸化能に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2017
- 富賀 裕貴他、高脂肪食摂取および運動が脳のインスリン経路を介した nNOS 調節機構に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2017
- 吉村 咲紀他、高脂肪食摂取および自発的運動がもたらす肝臓脂肪分部の変化、九州体育・スポーツ学会、2017
- 檜垣 靖樹、シンポジウム、腎血流量を減少させない安全な運動強度、日本糖尿病情報学会、2017
- Tomiga Y et al. Time-course effects of exercise on anxiety-like behaviors and hippocampal neuronal nitric oxide synthase in high fat diet-induced obese mice. *Cell Symposia Exercise Metabolism*, 2017
- Yoshimura S et al. Fat accumulation processes in the liver of trained mice and untrained mice. *Cell Symposia Exercise Metabolism*, 2017
- Tomiga Y et al. Exercise training rescues high fat diet-induced neuronal nitric oxide synthase expression in hippocampus and cortex. アメリカスポーツ医学会、2017

檜垣 靖樹、シンポジウム、運動習慣とCKD発症、日本腎臓リハビリテーション学会、2017
道下 竜馬他、健康的生活習慣の集積は中高年男性の腎機能低下を抑制する、日本腎臓リハビリテーション学会、2017

吉村 咲紀他、高脂肪食誘発性脂肪肝に対する運動効果は短期間でも認められるか、日本体力医学会大会、2018

吉村 咲紀他、高脂肪食誘発性脂肪肝に対する自発運動の効果、経時的な変化に着目して、日本肥満学会、2018

富賀 裕貴他、加齢性及び廃用性萎縮骨格筋における nNOS の DNA メチル化パターンの違い、日本体力医学会大会、2018

Kotoku K et al. Effect of exercise intensity on autoregulation of GFR in patients with chronic kidney disease stage 2. アメリカ腎臓病学会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 宏暁

ローマ字氏名：Tanaka Hiroaki

所属研究機関名：福岡大学

部局名：スポーツ科学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00078544

研究分担者氏名：上原 吉就

ローマ字氏名：Uehara Yoshinari

所属研究機関名：福岡大学

部局名：スポーツ科学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70373149

研究分担者氏名：道下 竜馬

ローマ字氏名：Michishita Ryoma

所属研究機関名：福岡大学

部局名：スポーツ科学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10632028

研究分担者氏名：安野 哲彦

ローマ字氏名：Yasuno Tetsuhiko

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80551994

研究分担者氏名：安藤 創一

ローマ字氏名：Ando Soichi

所属研究機関名：電気通信大学

部局名：情報理工学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50535630

研究分担者氏名：須藤 みず紀

ローマ字氏名：Sudo Mizuki

所属研究機関名：公益財団法人明治安田厚生事業団体力医学研究所

部局名：その他部局

職名：研究員

研究者番号(8桁): 10585186