

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34439

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01741

研究課題名(和文)脂溶性リガンド受容体シグナルからの骨格筋線維制御に関する研究

研究課題名(英文)Functional regulation of skeletal fiber due to fat-soluble receptor (GPCR) signaling

研究代表者

足達 哲也 (Adachi, Tetsuya)

千里金蘭大学・生活科学部・准教授

研究者番号：60345014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋に発現する脂溶性リガンド受容体(GPCR)について、骨格筋細胞C2C12においてRT-PCR法によって発現解析を行った。また、C2C12および筋サテライト細胞(SC)における筋線維分化過程でのGPR30およびGPR81の発現とエストロゲンおよび乳酸感受性との関係について、筋線維分化への検討を進めた。さらに、GPR30およびGPR81からのシグナル伝達系の調節について検討を進めた。

また、生体系に近い骨格筋モデルを構築するため、in vitroでの骨格筋筋線維分化モデルの開発を進めた。また、SCと骨格筋細胞との共培養系の構築も行い、筋線維への分化過程について観察することができた。

研究成果の概要(英文)：Expression analysis was performed on fat-soluble ligand receptor (GPCR) expressed in skeletal muscle by RT-PCR method in skeletal muscle model cell C2C12. We examined the relationship between expression of GPR30 and GPR81 in muscle fiber differentiation in C2C12 and muscle satellite cells (SC) and the sensitivity of estrogen and lactic acid to muscle fiber differentiation. We further investigated the regulation of signaling pathway from GPR30 and GPR81. We also developed a skeletal muscle fiber differentiation model in vitro to construct a skeletal muscle model near the biological system. Furthermore, we constructed a co-culture system of SC and skeletal muscle cells, and could observe the process of differentiation into muscle fibers.

研究分野：応用健康科学

キーワード：骨格筋 GPCR エストロゲン 乳酸

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣病、メタボリックシンドローム患者数およびその予備軍の数は、我が国のみならず、アジア地域を中心として、全世界で増加の一途をたどっている。増加の主な原因は、過食と運動不足であり、特に運動不足は全身代謝に影響をおよぼすこともわかってきている。運動を司る主要な器官は、全身に存在する骨格筋であり、骨格筋がエネルギーを代謝することで、運動エネルギーに変換し、我々の活動を担っている。近年の運動不足により、骨格筋のエネルギー代謝が減少することによって、骨格筋の代謝活動の低下のみならず、骨格筋活動低下から全身のエネルギー代謝にも影響することが考えられる。さらには全身のエネルギー代謝の異常により、最近急増しているサルコペニア(肥満)にもつながることも懸念されている。

生活習慣病を含めた代謝異常疾患において、疾患関連臓器での脂溶性リガンド受容体の機能解析を進めてきており、脂溶性リガンド刺激により、消化管では消化管ホルモン、膵β細胞ではインスリン、脂肪組織ではアディポサイトカイン分泌の亢進が認められている。しかしながら、多くの組織での脂溶性リガンド受容体(GPCR)の機能解明は発展途上にあり、これらの受容体の機能を明らかにすることにより、骨格筋においても代謝や活動性向上が期待できることから、生活習慣病・メタボリックシンドロームの新しい予防・治療法の開発につながるものと期待できる。近年、骨格筋線維の増殖、分化、融合の調節には、筋サテライト細胞(SC)の関与が知られてきている。SCは運動によって増殖し、筋線維タイプ変化に関与することがわかってきている。申請者の予備検討およびデータベース検索により、いくつかの膜型脂溶性リガンド受容体が骨格筋細胞およびSCに発現することを見いだしてきた。

2. 研究の目的

本申請では、骨格筋細胞およびSCにおいて、脂溶性リガンド受容体(GPCR)の発現検索とリガンド刺激における細胞内シグナル伝達系の解明、シグナル伝達が筋の分化機構に及ぼす作用の解明を目指す。受容体の発現解析、機能解析には、計算機系アプローチおよびウェット実験系(主に培養細胞系)を用いて行う。また、新規リガンド探索には計算機系アプローチを利用することにより、特異性の高いリガンドの探索を目指す。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋に発現する脂溶性リガンド受容体(GPCR)の探索

骨格筋細胞およびSCに発現する脂溶性リガンド受容体については、データベース検索(PubMed、GenBankなど)により網羅的に検索を行った。

(2) 探索により見出された脂溶性リガンド受容体(GPCR)の発現検討

骨格筋は細胞培養株のC2C12(ATCC)を用いて、探索により見出された脂溶性リガンド受容体(GPCR)の発現について、リアルタイムPCR法により行った。C2C12の分化過程(分化前、分化開始後1、3、7、10日)での発現変化についても同様に行った。細胞培養については、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ナカライテスク)10%牛胎児血清(Gibco)を用いて培養を行った。C2C12の筋分化は、10%牛胎児血清含有DMEMを2%馬血清(ハイクローン)含有DMEMに置き換えることにより行った。

SCについては、既報(Montarras *et al.*, 2005)に従って、単離および培養を行った。単離された細胞において、脂溶性リガンド受容体(GPCR)の発現の検討を同様の方法で行った。

(3) 脂溶性リガンド化合物刺激でのシグナル伝達系解析

発現が認められた受容体について、C2C12および単離SCを用いて、受容体のリガンドとなる化合物を添加し、シグナル伝達からの細胞の応答性の解析を行った。具体的には、リガンドを刺激することによって、受容体からのシグナル伝達系について、ERKおよびリン酸化ERKの解析、転写因子MyoDについて、ウエスタンブロット法を用いて行った。ウエスタンブロット法用の抗体はCST社のものを用いた。

(4) 脂溶性リガンド化合物刺激による骨格筋細胞の機能解明

発現が認められた受容体について、C2C12および単離SCを用いて、受容体のリガンドとなる化合物を添加し、細胞増殖性への作用についてはWST-1アッセイを行った。骨格筋細胞の分化過程における上述の作用について検討を行い、同時に組織染色を施し、分化に及ぼす評価した。細胞増殖アッセイにはWST-1法(ナカライテスク)を用いた。組織染色については、抗Myosin Fast-typeおよび

抗 Myosin Slow-type 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いた免疫染色法を用いて行った。

(5) 三次元培養系骨格筋モデルおよび三次元骨格筋細胞 - SC 共培養系の構築

より生体系に近い骨格筋モデルを作製するため、マトリゲル (Corning) およびアルギン酸足場非依存性三次元培養系 (PG リサーチ) を用いて、C2C12 の増殖および分化培養を行った。また、同様の素材を用いて、C2C12 と単離 SC との共培養系により、生体により近いモデル系の構築を目指した。

4. 研究成果

脂溶性リガンド受容体の骨格筋 (マウスヒラメ筋) における発現の有無についてまとめたのが表 1 である。

表 1 骨格筋 (マウスヒラメ筋) での脂溶性リガンド他 GPCR の発現

GPR30	+
GPR40	ND
GPR120	ND
GPR81	+
GPR41	ND
GPR43	ND
GPR109A	+
GPR109B	ND

+: Positive, ND: not detected

エストロゲンをリガンドとする GPR30 の発現は認められたが、脂肪酸をリガンドとする受容体である GPR40、GPR120 (長鎖脂肪酸型)、GPR41、GPR43 (短鎖脂肪酸型) の発現は認められなかった。一方で、乳酸をリガンド GPR81 およびニコチン酸をリガンドとする GPR109A の発現が認められた。先行研究においては、GPR30、81 および 109A の骨格筋での作用についてはほとんど明らかになっていないので、リガンドからのシグナル伝達から、骨格筋の筋線維分化に何らかの作用があるものと考えた。

そこで、骨格筋細胞の C2C12 の分化過程における GPCR の発現について検討を行った。その結果、GPR30、81、109a のいずれも、分化過程において発現の上昇が認められ、分化経過依存的に発現上昇が認められた (図 1)。

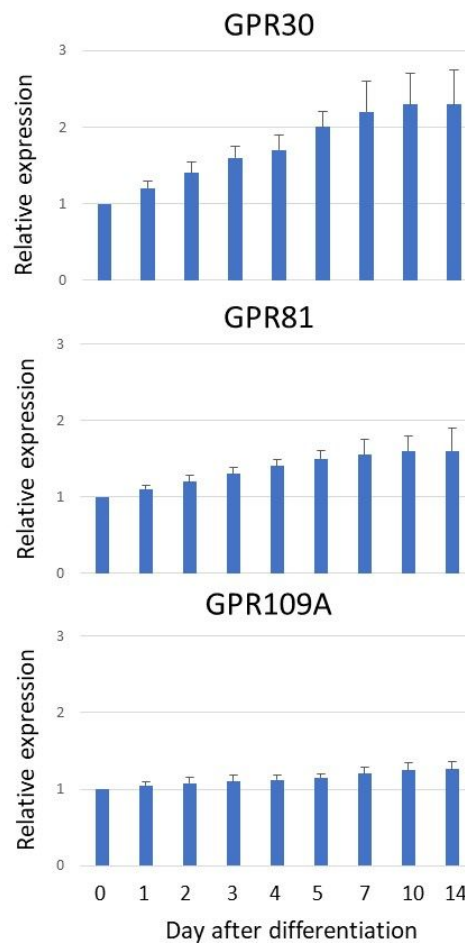
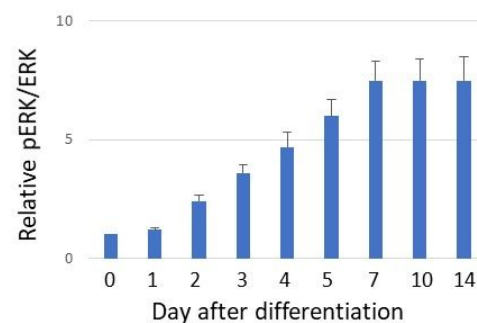


図 1 骨格筋細胞 C2C12 の分化過程における GPR30、81 および 109A の発現変化

GPR30 のリガンドであるエストロゲン (17 β -estradiol) 刺激によって、シグナル伝達下流の ERK のリン酸化が分化依存的に亢進



することが明らかとなった (図 2)。

図 2 骨格筋細胞 C2C12 の分化過程における 17 β -estradiol 刺激による ERK のリン酸化

また、GPR30 からのシグナル伝達系と分化について検討を進めたところ、濃度依存的に、骨格筋内転写因子 MyoD の発現の上昇が認め

られた (図 3)。

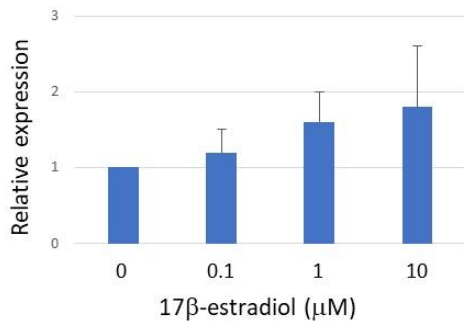


図 3 C2C12 の 17β-estradiol 刺激での転写因子 MyoD の発現

GPR81 のリガンドである乳酸刺激によって、シグナル伝達下流の ERK のリン酸化が分化依存的に亢進することが明らかとなった (図 4)。

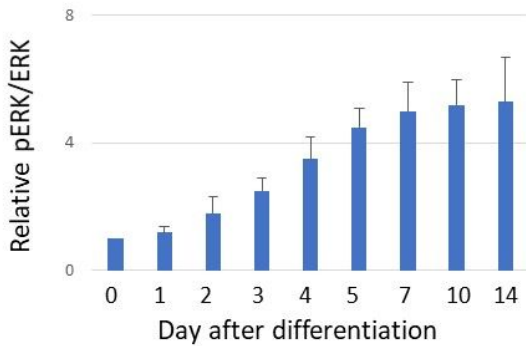


図 4 骨格筋細胞 C2C12 の分化過程における乳酸刺激による ERK のリン酸化

また乳酸刺激によって、Myosin Fast-type の割合が上昇することが明らかとなった (図 5)。一方で、高濃度の乳酸刺激は細胞増殖に悪影響を及ぼしたが、酸化ストレスを軽減することで、Myosin Fast-type の割合が上昇することが明らかとなった (図 5)。

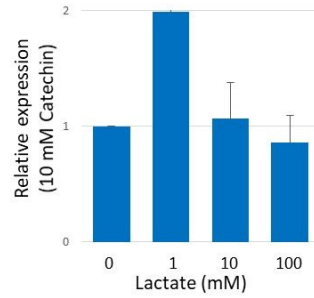
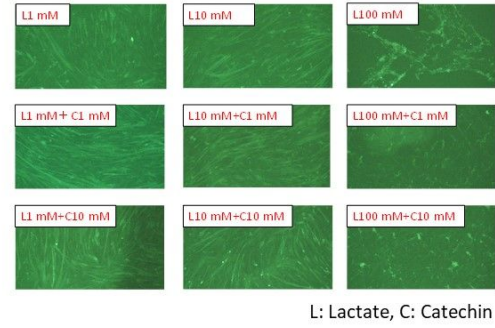


図 5 骨格筋細胞 C2C12 の乳酸刺激による Myosin Fast-type の解析

GPR109A のリガンドであるニコチン酸の刺激では、シグナル伝達下流の ERK のリン酸化については、はっきりした結果が得られなかった (data not shown)。

マウスより SC の単離に成功した。単離された SC と C2C12 の共培養において、培養経過とともに、骨格筋内転写因子 MyoD の発現上昇が認められた (図 6)。C2C12 単独より早い段階で MyoD の発現上昇が認められることが明らかとなった (図 6)。

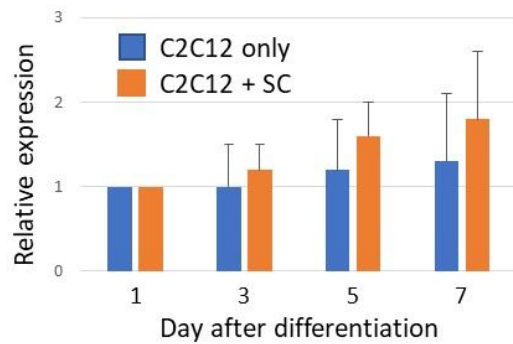


図 6 C2C12 単独および C2C12・SC 共培養系における転写因子 MyoD の発現

生体のモデルにより近づけるべく、マトリゲルおよびアルギン酸足場非依存性三次元培養系を用いた培養を行った。その結果、アルギン酸足場非依存性三次元培養系で、細胞のある程度の分化が認められた(図7)。本培養系においても、GPR30、81 および 109A の発現が認められた。

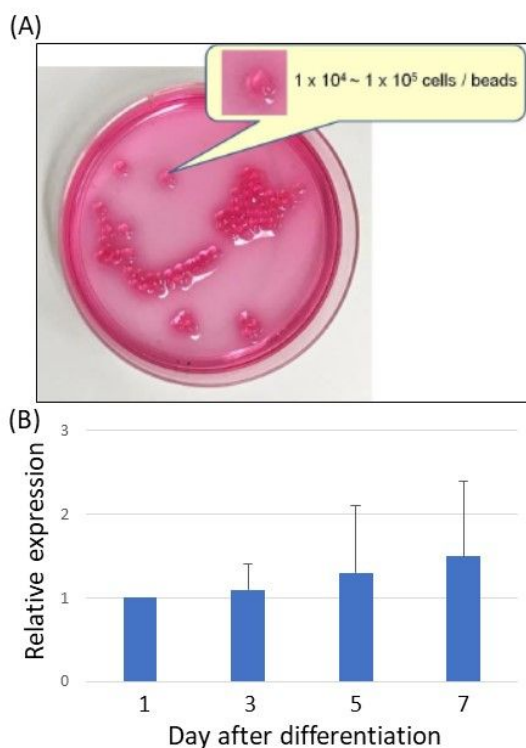


図7 アルギン酸足場非依存性三次元培養系における(A) C2C12 の培養、(B) C2C12 の転写因子 MyoD の発現

本事業において、骨格筋におけるGPCRの発現と、その一部の機能メカニズムについて明らかとなった。また骨格筋の生体モデルにつながる系の構築も行うことができた。本事業の成果を踏まえて、骨格筋増強作用につながる新しい創薬ターゲットを見出す研究を進めている。

本事業では、骨格筋に発現するGPCRについての機能解析を行った。骨格筋にはまだまだGPCRは多く存在し、さらにその機能については未解明である。これらの受容体機能解明などの研究が発展すれば、メタボリックシンドローム予防・治療に結びつくこととなり、医療費削減を目指せるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Harada N, Katsuki T, Takahashi Y, Masuda T, Yoshinaga M, Adachi T, Izawa T, Kuwamura M, Nakano Y, Yamaji R, Inui H. Androgen receptor silences thioredoxin-interacting protein and competitively inhibits gluco- corticoid receptor- mediated apoptosis in pancreatic β -Cells. *J Cell Biochem.* 116: 998-1006, 2015

Adachi T, Ohshima R, Matsunaga T, Yasuda K. Skeletal muscle fiber type in diabetic animals: -Abnormality in fiber type due to diabetes and improvement by exercise- *Proc Minatogawa.* 52: 21-26, 2016

足達哲也. 「脂肪酸の新しい生理機能」食品化学新聞社「技術士リレーシリーズ」2017.03.23, 2017

足達哲也. 「骨格筋の維持・増進を目指した食品機能開発」食品化学新聞社「技術士リレーシリーズ」2017.09.14, 2017

[学会発表](計1件)

足達哲也, 大島里詠子, 松永哲郎 「骨格筋細胞の線維分化に伴う代謝変化」第70回日本栄養・食糧学会大会 兵庫県 2016年5月

[図書](計0件)

[産業財産権]
○出願状況(計0件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

足達哲也（千里金蘭大学・准教授）
研究者番号：60345014

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松永哲郎（武庫川女子大学・准教授）
研究者番号：10452286
山地亮一（大阪府立大学・教授）
研究者番号：00244666
諏訪牧子（青山学院大学・教授）
研究者番号：30242241