

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20027

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによる筋萎縮に対し $\alpha 7$ アセチルコリン受容体刺激が与える影響研究課題名(英文) The effect of $\alpha 7$ acetylcholine receptor stimulation on muscle atrophy by inflammatory cytokines

研究代表者

笹川 智貴 (Sasakawa, Tomoki)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30400112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカイン存在下に筋芽細胞から筋管への分化は阻害された。炎症性サイトカイン非存在下においてGTS21による $\alpha 7$ アセチルコリン受容体刺激は筋管径を増大させ、重鎖ミオグロビンの発現を促したが、炎症性サイトカイン存在下では同様の効果を認めなかった。炎症性サイトカイン存在下ではGTS21の刺激による筋肥大作用を得ることは難しいかもしれない。過去の報告ではGTS21投与によりマウスの筋萎縮を抑制した報告がなされているが、今研究の結果は筋肉細胞への直接作用によるものではなく、別の作用機序が関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Differentiation of myoblasts into myotubes in the presence of inflammatory cytokines was inhibited. In the absence of inflammatory cytokines, stimulation of $\alpha 7$ acetylcholine receptor by GTS21 increased myotube diameter and promoted expression of heavy chain myoglobin, but similar effects were not observed in the presence of inflammatory cytokines. In the presence of inflammatory cytokines it may be difficult to obtain a muscle hypertrophic effect by stimulation of GTS21. Previous published papers reported that muscle atrophy of mice was suppressed by administration of GTS 21 but the results of the present study are not due to direct action on muscle cells but the possibility that another mechanism of action may be involved.

研究分野：麻酔

キーワード：アセチルコリン受容体 筋萎縮 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症のように高濃度の炎症性サイトカインに暴露された筋肉は萎縮し、患者の離床を遅らせるばかりか生命予後にも影響を与えることが知られ集中治療領域での筋萎縮予防・治療は喫緊の課題である。通常 $\alpha 2\beta\gamma\epsilon$ の五つのサブユニットで構成されるAChR(成熟型)は終板に最も数多く存在し、神経筋接合部での刺激伝達に参与している。一方で、発生段階の胎児の筋肉や、除神経されて萎縮した筋肉には、通常成人骨格筋には存在しない中枢型AChR、 $\alpha 7$ AChR が発現することが知られている。この異所性に発現した $\alpha 7$ AChR は麻酔中に一般的に使用される非脱分極性筋弛緩薬への耐性をもたらし、脱分極性筋弛緩薬による高カリウム血症を増悪させる可能性が示唆されている。しかし実際のところ、筋肉上に異所性に発現した中枢型AChR がどのような生理的意義を持つかについては未だ明らかにはなっていない。中枢神経細胞や内皮細胞では $\alpha 7$ AChR の刺激がAkt およびJak/Stat3, TLR4 signaling pathway を活性化させる報告がされており、筋肉においても同様のpathway の活性化が予想され、抗炎症作用や筋肥大、分化促進作用が期待できる。

(2) $\alpha 7$ AChRの刺激はミトコンドリアでチトクロームcの作用を調節していることが報告され(Int J Biochem Cell Biol. 2014;49:26-31)過酷な環境下での細胞エネルギー調節の一役を担っている可能性もある。

今研究では炎症性サイトカインに暴露された骨格筋細胞における $\alpha 7$ AChR 刺激薬の治療的役割を検討する。

2. 研究の目的

(1) 選択的 $\alpha 7$ AChR 刺激薬が炎症性サイトカインによる筋萎縮を予防、治療できる新しい治療法への基盤となりうるか検討する。

① 非サイトカイン環境下でのマウス骨格筋細胞C2C12へのGTS 21の効果をコントロールとして記録する。

② C2C12細胞が筋芽細胞から筋管へと分化する過程において炎症性サイトカイン(今研究ではLPSとTNF- α およびIFN γ のサイトカインミックスを用いる)が筋管形成へ与える影響を明らかにする。

③ サイトカイン投与下・非投与下各C2C12細胞において特異的 $\alpha 7$ AChR 刺激薬GTS21(DMXB-A)を使用して $\alpha 7$ AChR を刺激し、筋分化促進促進、筋肥大の実際の効果を明らかにする。

(2) 炎症サイトカイン環境下におけるミトコンドリア酸素消費量を測定し、 $\alpha 7$ AChR 刺激薬によるミトコンドリアパイオエナジェスティクス変化の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ① C2C12細胞培養系の確立

筋肉細胞のもでるとしてマウスから樹立されたC2C12細胞を実験対象として使用する。37度5%二酸化炭素環境下に1%ペニシリン-ストレプトマイシン添加10%仔牛血清入りDulbecco's modified Eagle medium(DMEM)にて培養を行う。菌関係性には血清を2%ウマ血清に変更した培地に変更し、6日間培養を行った。

② 非炎症性サイトカイン環境下C2C12細胞におけるGTS21の筋管径計測

炎症性サイトカインのない環境下での筋管形成過程でGTS21を投与し、筋肥大作用の有無をギムザ染色した筋管径を計測して比較する。また、筋管径を増加させる至適GTS21濃度を決定する。

③ 非炎症性サイトカイン環境下での GTS21 投与がミオシン重鎖発現量に与える影響

②で得られた筋管を用いて、ウェスタンブロッティング法によりミオシン重鎖発現量の比較を行った。

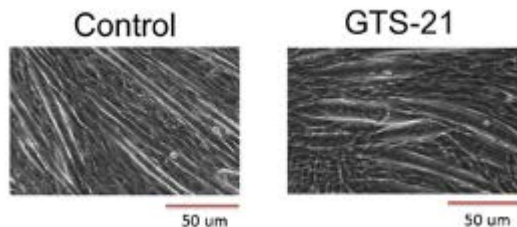
(2) ① 炎症性サイトカイン環境下におかれた C2C12 の分化と筋萎縮の検討

C2C12 をサイトカインミックス環境下においたものとコントロールとをそれぞれ筋管形成するように分化させた。各分化段階でそれぞれギムザ染色したものを顕微鏡で観察し、ランダムに各プレートの写真を撮影した。撮影された写真は画像解析ソフト ImageJ にてピクセル解析され、筋管径の評価を行った。

② GTS21 投与群と非投与群とでミオシン重鎖の発現をウェスタンブロット法で計測した。

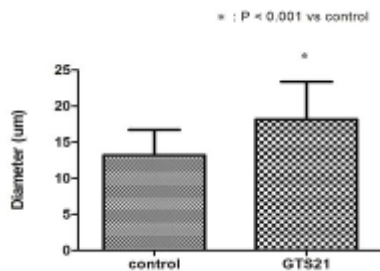
4. 研究成果

(1) ① GTS21 を含んだ培地での筋管の変化

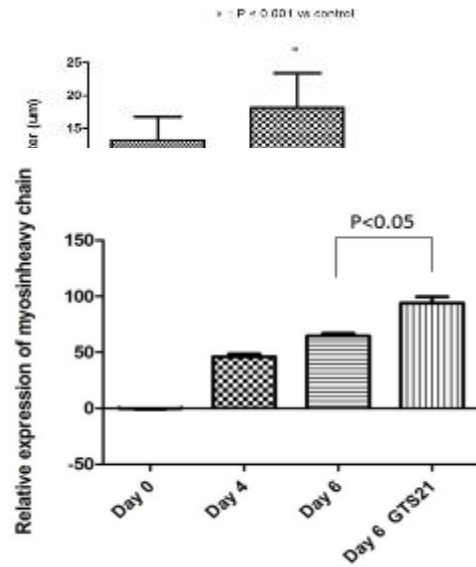


1μM の GTS21 を含んだ培地で培養された筋管は GTS21 を含まない培地で培養された筋管と比較して筋管径が増加する染色像が得られた。

② GTS21 は筋管径を増加させる

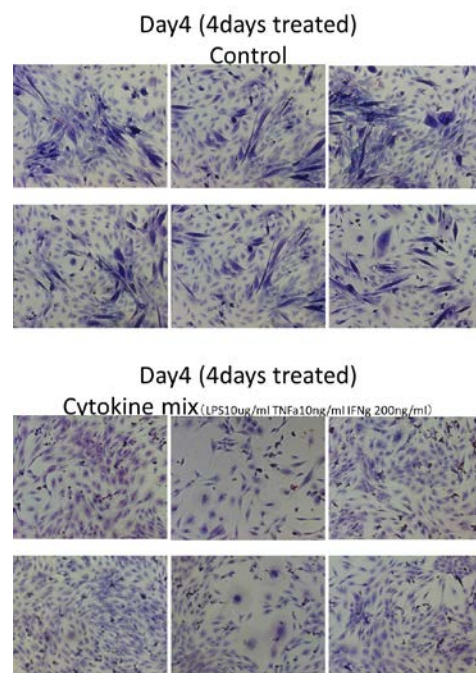


1μM の GTS21 を含んだ培地で培養された筋管径は 18.2±5.2μm であり、含まない培地で培養された筋管径 13.2±3.5μm よりも増加し



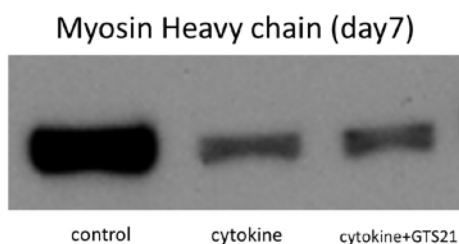
ウマ血清を含む培地に変更後、6日目まで徐々にミオシン重鎖は増加した。1μM の GTS21 を含む培地で培養された細胞では含まない培地と比較してミオシン重鎖の発現量が増加しており、筋管径増加の一因となった可能性が示唆された。

(2) 炎症性サイトカインミックス (LPS10ug/ml TNFa10ng/ml IFNg200ng/ml) 環境下で C2C12 の筋管誘導は遅延する



サイトカインミックス環境下に C2C12 の分化は遅延し、通常分化開始 4 日で筋管の形成が見られるところ筋管形成がほとんど見られなかった。

(3) 今回検討したサイトカインミックス下に GTS21 はミオシン重鎖発現を促進しなかった。



(2)のサイトカイン環境下に GTS 2 1 を加えた系統を作成し、同様に分化 7 日まで培養したものをウエスタンブロッティング法によってミオシン重鎖の発現を比較した。結果 GTS 2 1 投与群は非投与群と比較してミオシン重鎖の発現を増加させず、炎症サイトカイン環境下ではその効果は弱いことが示唆された。

今研究期間では予想された効果を認められなかったが、サイトカインミックスの濃度が高すぎた可能性もあり今後条件を再調整し検討を続ける。

<引用文献>

- ① Khan M.A.S, Sahani N, Neville K.A, Nagashima M, Lee S, Sasakawa T, Kaneki M, Martyn J.A.J., Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors, Can J Physiol Pharmacol, 92:1-8. 2014

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 笹川 智貴、岩崎 肇、Jeevendra Martyn, The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 enhances skeletal muscle differentiation and hypertrophy in C2C12、米国麻酔学会、2015 年 10 月 19 日、San Diego(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 智貴 (SASAKAWA, Tomoki)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30400112

(2) 研究協力者

Jeevendra Martyn (Jeendra Martyn)
ハーバード大学・医学部・教授