

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03258

研究課題名(和文) 骨格筋における免疫学的微小環境と筋機能

研究課題名(英文) Microenvironment of skeletal muscle and muscle function

研究代表者

池田 真一 (Ikeda, Shin-ichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50534898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の質は筋機能のみならず、個体の寿命をも制御しうる報告が相次いでいる。しかしながら骨格筋の質とは一体なんであるかと言う本質的な問いに対する答えは全く明らかにされていない。研究代表者は骨格筋線維1本1本を取り囲んでいる基底膜を構成するECM成分こそが骨格筋の質の本質であると考えた。運動後の質の良い骨格筋と、徐神経や糖尿病などの質の悪い骨格筋とのECM遺伝子を網羅的に解析した結果、Lamb3遺伝子を見出した。これは筋再生過程で強く発現が誘導されAkt経路を介して骨格筋の再生・肥大を正に制御することを見出した。これらの結果は、骨格筋内のECMは筋機能を規定する重要な内部環境であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康増進のために運動をする人は多く、脂肪燃焼や基礎代謝亢進によって健康増進効果が期待されている。研究代表者はそれだけではなく、運動によって骨格筋の質が向上することが健康増進のみならず個体寿命をも制御しうると考えているが、骨格筋の質とは何であるかと言う点が不明である。本研究によって質の本体が明らかになることで、健康寿命の延伸や場合によっては個体寿命の制御が可能となりうる点で学術的意義・社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Quality of skeletal muscle is determined not only muscle function but also life span of individual. However, the question of what is "quality of skeletal muscle" is not answered currently. From my previous study, I hypothesized component of extracellular matrix (ECM) in basal lamina covered a skeletal muscle fiber is the substance of "quality of skeletal muscle". I compared between "good skeletal muscle" such as trained muscle and "bad skeletal muscle" such as denervated or diabetic muscle using qPCR array and identified Lamb3 gene as a muscle quality control gene. Lamb3 gene is poorly expressed in normal skeletal muscle and strongly induced during muscle hypertrophy and muscle regeneration. Lamb3 activates Akt pathway, resulting in muscle regeneration and hypertrophy. These results suggested that muscle ECM is an important internal environment and their manipulation can control muscle quality.

研究分野：細胞生物学・生化学・運動生理学

キーワード：骨格筋の質 細胞外マトリックス Lamb3

### 1. 研究開始当初の背景

古くから骨格筋は、運動によって余剰なカロリーを消費し生活習慣病などを防ぐとともに、身体機能を高めることで生活の質を向上させるなど単純な運動器官としての役割しか有していないと考えられてきた。しかしながら近年、**骨格筋の量や質が個体の健康寿命の延長や生命に関わるという報告が続々となされている**。*Lama2* ( $\alpha$ -2 chain of laminin-2) 遺伝子欠損は致死性の遺伝子欠損であり、筋ジストロフィー様の症状を呈し生後 50 日以内には死亡するが、Cyclophilin D の遺伝子欠損または薬理的阻害によりミトコンドリアの膨潤を妨げることで、筋ジストロフィー様の症状ならびに致死率が大幅に改善した (Millay et al, *Nat Med*, 2008)。ショウジョウバエを用いた検討では、適度な酸化ストレスは骨格筋のミトコンドリア機能を良好に保ち、このことが個体の寿命を引き延ばすことにつながる (Owusu-Ansah et al, *Cell*, 2013)。カヘキシアは癌などの疾患による筋量低下である。筋肥大抑制効果をもつ TGF- $\beta$ ファミリーの一員であるミオスタチンのレセプターであるアクチビン受容体 B の薬理的阻害剤を数種類の癌モデルマウスに投与すると、カヘキシアによる筋量低下が抑制されただけでなく、腫瘍の成長は進行しているにも関わらず、生存率は劇的に改善されたという報告がなされた (Zhou et al, *Cell*, 2010)。また、デンマークで行われた 12 年間の追跡調査の結果、大腿が太いほど死亡の危険率は低下するという関係も見出されている (Scott IA, *BMJ*, 2009)。このように**骨格筋は単純な運動器官ではなく、個体の健康・寿命をつかさどる中枢である可能性がある**。実際に、骨格筋はサイトカインなどを分泌することで他の臓器にも影響を与えうることも続々と報告されている (マイオカイン仮説)。しかしながら**本質的な疑問が全く解決されていない**、すなわち、**個体の健康寿命に与える影響を与える骨格筋の質とは何なのか？骨格筋の質の変化がどのように個体の寿命に影響するのか？**という 2 つの疑問である。



図1  
骨格筋の質が個体の健康寿命を決定する

### 2. 研究の目的

運動は骨格筋ミトコンドリア量の増加やインスリン感受性亢進など酸化的代謝を良好に変化させ、また筋サイズを増加させることで筋の質を高めている。研究代表者は大学院の頃より運動による筋代謝亢進の研究を進めてきており、その中で“**骨格筋の質**”の変化の本質は免疫細胞に対する骨格筋内微小環境の変化ではないかという知見をいくつか見出し**てきた**。しかし、骨格筋線維(細胞)と筋常在マクロファージとの間には細胞外マトリックスからなる基底膜で隔てられている(図2)。研究代表者はこの基底膜こそが骨格筋内の微小環境そのものであり、その構成成分の変化が骨格筋の質を決定しているのではないかと仮説し、その検証を本研究課題の目的とした。

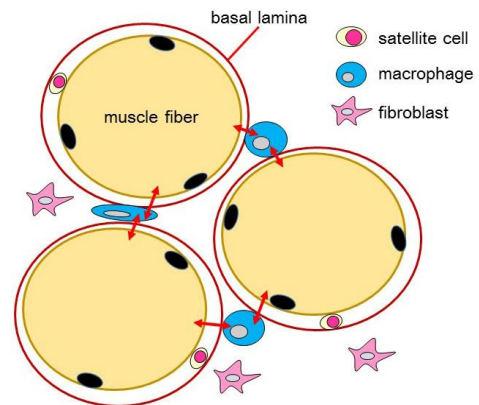


図2  
骨格筋の解剖図(横断面)

### 3. 研究の方法

運動や筋収縮は骨格筋の質を良い方向へと誘導すると考えられ、一方で不使用や加齢などによる筋萎縮や代謝疾患などにおいては骨格筋の質は悪い方向へと誘導すると考えられる。そこで、筋の質を良くすると考えられる介入(持久性運動、高強度運動)と悪くすると考えられる介入(廃用性筋萎縮、助神経、2型糖尿病)とを C57BL6J マウスに施し、骨格筋を摘出、ECM 関連遺伝子発現を網羅的に解析し、良い介入、悪い介入で共通して変化し、かつ良い介入と悪い介入とで変化が逆向きになるような遺伝子の解析を行った。それらの遺伝子について、発現時期・部位を詳細に検証した。

#### 4. 研究成果

種々の介入を施した骨格筋における ECM 関連遺伝子発現の網羅的解析の結果、骨格筋の質に関与しうる候補遺伝子として Lama3, Lamb3, Itga6, Itgb3, Itgb4, Cdh2, Col4a2, mmp15 が見出された(図3)。この中で、Lamb3 は上皮細胞特異的に発現することが知られているラミニンのサブタイプであり、通常状態の骨格筋においてはその発現はほとんど認められなかったが、代償性過負荷刺激(筋肥大刺激)によりその発現が極めて強く誘導され、除神経(筋萎縮刺激)により発現が減少した。経時的な発現変化の検討から Lamb3 は筋損傷初期に発現し、筋再生に関与する可能性を見出したため、カルジオトキシンを用いた筋損傷モデルにて Lamb3 の発現変化を検証したところ、損傷12~24時間でその発現が誘導され、それに伴い Akt, p70S6 キナーゼのリン酸化、ならびにコラーゲン遺伝子(collagen1 & collagen5)の発現も同様のタイムコースで発現が誘導された。Lamb3 の機能を検証するために、損傷筋に Lamb3 の中和抗体を投与したところ、Lamb3 の発現が増強され、それに伴い Akt のリン酸化が増強しており、Lamb3 は Akt の上流因子として作用することが示唆された。また、Lamb3 の発現部位の近傍に線維芽細胞が存在することから、線維芽細胞がその産生細胞と考えられ、損傷刺激により細胞増殖も認められた。また、Lamb3 の発現亢進に伴い、小胞体ストレスの増大も観察された。今後骨格筋内における線維芽細胞が Lamb3 発現の責任細胞であることの証明と Lamb3 の筋損傷・再生過程における詳細な役割の解析が必要である。

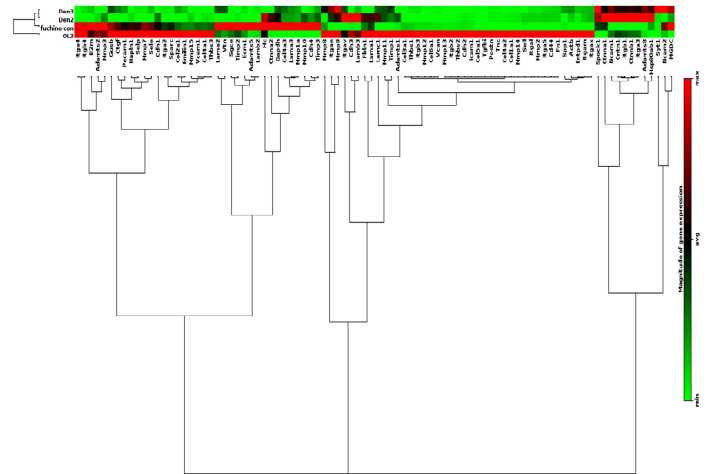


図3 ECM 解析の結果

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

1. Jiang X, Kurihara T, **Ikeda S**, Kunimi H, Mori K, Torii H, Tsubota K. Inducement and Evaluation of a Murine Model of Experimental Myopia. *Journal of Visualized Experiments*. Jan22;(143), 2019. 査読あり
2. Kiwako Mori, Toshihide Kurihara, Maki Miyauchi, Ayako Ishida, Xiaoyan Jiang, **Shin-ichi Ikeda**, Hedemasa Torii and Kazuo Tsubota, Oral crosetin administration suppressed refractive shift and axial elongation in a murine model of lens-induced myopia, *Scientific Reports*, Jan22;9(1):295, 2019. 査読あり
3. Xiaoyan Jiang, Toshihide Kurihara, Hiromitsu Kunimi, Maki Miyauchi, **Shin-ichi Ikeda**, Kiwako Mori, Kinya Tsubota, Hidemasa Torii and Kazuo Tsubota: A highly efficient murine model of experimental myopia, *Scientific Reports*, Feb 1;8(1):2026, 2018. 査読あり
4. **Shin-ichi Ikeda**, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Kageumi Takeno, Yoshio Fujitani, Ryuzo Kawamori and Hiroataka Watada: Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun*, May 13;473(4):947-52, 2016. 査読あり

[学会発表](計 15件)

1. Takanaga Shirai, **Tohru Takemasa**, **Shin-ichi Ikeda**. Effects of exercise/ inactivity on extracellular matrix gene expression in mouse skeletal muscle, *Cell symposia : Exercise Metabolism*, 2019

2. 白井隆長、武政徹、池田真一、運動および不活動が骨格筋細胞外マトリックスに与える影響、第7回骨格筋生物学研究会、2019年
3. 白井隆長、武政徹、池田真一、運動および不活動が骨格筋細胞外マトリックス遺伝子発現に及ぼす影響、第73回日本体力医学会大会、O33-2E-02、2018年
4. 池田真一、栗原俊英、戸田匡太郎、姜効炎、坪田一男：腸内細菌叢の攪乱が誘導マウス近視眼に及ぼす影響、第122回日本眼科学会総会、2018年
5. Shin-ichi Ikeda Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Kiwako Mori, Hidemasa Torii<sup>1</sup>, Shinichiro Kondo, Kazuo Tsubota: Scleral cell biology and biochemistry in murine lens-induced myopia, International Myopia Conference, 2017
6. Kiwako Mori, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Erisa Yotsukura, Yasuhisa Tanaka, Shin-ichi Ikeda, Maki Miyauchi, Hidemasa Torii and Kazuo Tsubota: Effect of high concentrated oxygen on myopia in neonatal and adult mice, International Myopia Conference, 2017
7. Shin-ichi Ikeda, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Yasuhisa Tanaka, Kiwako Mori, Maki Miyauchi, Hidemasa Torii and Kazuo Tsubota: Morphological changes of scleral fibroblasts in a murine lens-induced myopia model, The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 Annual Meeting, 2017
8. Kiwako Mori, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Erisa Yotsukura, Yasuhisa Tanaka, Shin-ichi Ikeda, Maki Miyauchi, Hidemasa Torii and Kazuo Tsubota: Transient exposure of high concentration oxygen induces sustained myopia in adult mouse, The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 Annual Meeting, 2017
9. Xiaoyan Jiang, Toshihide Kurihara, Kiwako Mori, Yasuhisa Tanaka, Shin-ichi Ikeda, Maki Miyauchi, Erisa Yotsukura, Hidemasa Torii and Kazuo Tsubota: A dose dependent myopic shift in refraction and axial length in a murine model of lens-induced myopia, The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 Annual Meeting, 2017
10. 池田真一、姜効炎、田中康久、森紀和子、宮内真紀、鳥居秀成、坪田一男、栗原俊英：マウスレンズ誘導性近視モデルにおける強膜リモデリングに関する細胞間クロストーク、第121回日本眼科学会総会、2017年
11. 森紀和子、栗原俊英、姜効炎、四倉絵里沙、田中康久、池田真一、宮内真紀、鳥居秀成、坪田一男：成体マウスに対する高酸素負荷により持続的な近視が誘導される、第121回日本眼科学会総会、2017年
12. 姜効炎、栗原俊英、森紀和子、田中康久、池田真一、宮内真紀、四倉絵里沙、鳥居秀成、坪田一男：新規レンズ誘導マウス近視モデルの確立及び誘導レンズ屈折力依存性の検討、第121回日本眼科学会総会、2017年
13. 池田真一、栗原俊英、姜効炎、坪田一男：マウス近視強膜における細胞生物学的変化、第21回眼科分子生物学研究会、2017年
14. 池田真一、峰松健夫、仲上豪二郎、真田弘美：高濃度 AHL による細胞死は PKC $\delta$  と caspase-3 の相互作用によって生じる、第46回日本創傷治癒学会、2016年
15. Aya Kitamura, Takeo Minematsu, Gojiro Nakagami, Shin-ichi Ikeda, Hiromi Sanada: PEROXIDASE ACTIVITY DURING WOUND HEALING, 5th congress of World Union of Wound Healing Societies, 2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

【受賞】

白井隆長、武政徹、池田真一、第73回 日本体力医学会 大塚スポーツ・医化学賞 奨励賞、2018年9月

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：武政 徹

ローマ字氏名：TAKEMASA, Tohru

所属研究機関名：筑波大学

部局名：体育系

職名：教授

研究者番号(8桁)：50236501

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。