

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20046

研究課題名(和文)L型カルシウムチャネルのベータサブユニットはサルコペニアの治療標的になるか

研究課題名(英文)Up-regulation of CaVb1 expression in denervation-induced muscle atrophy

研究代表者

小松 雅俊(Komatsu, Masatoshi)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：60723070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋萎縮病態におけるL型カルシウムチャネルのサブユニット(CaV<sub>v1</sub>)の役割について検討を行った。これまでの研究で老齢マウスと除神経モデルマウスにおいて、CaV<sub>v1</sub>の発現量が増加することを見いだしていた。検討の結果、増加したCaV<sub>v1</sub>はCaV<sub>v1a</sub>と呼ばれるバリエーションである可能性が高いこと、この増加がmRNAの増加を伴わない機構で起きていること、などが明らかになった。今回の検討では、正常マウスにCaV<sub>v1a</sub>を強制発現しても筋力の低下は認められなかった。今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously found that an expression level of CaV<sub>v1</sub> in the tibialis anterior (TA) was significantly increased by sciatic nerve transection. In this study, we revealed that the variant of CaV<sub>v1</sub> with increased expression was likely as CaV<sub>v1a</sub>. Quantitative PCR showed that a CaV<sub>v1</sub> mRNA level was not increased but significantly decreased by sciatic nerve transection, suggesting that increases in CaV<sub>v1</sub> protein was due to post-translational modification. Overexpression of CaV<sub>v1a</sub> by adeno-associated virus vector in the tibialis anterior muscles of wild type mice did not significantly change the contractile forces. Further studies are necessary to reveal a role of CaV<sub>v1</sub> in the pathophysiology of muscle atrophy.

研究分野：整形外科学

キーワード：L型カルシウムチャネル サルコペニア

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは不安定性や易転倒性、インスリン抵抗性などに関係しており、高齢化が加速する本邦の医療において重要な病態である。

サルコペニアの原因は、ホルモン減少、不動化、運動神経刺激の減少・異常、栄養不良などがある。これらに対してはそれぞれホルモン補充療法、運動、分枝アミノ酸補充などを行うことで筋肉量が増えることが報告されているが、筋力の回復には現在運動療法以外の選択肢が存在しない。しかし、高齢者は他疾患の併発など、運動療法が困難であるケースが多く、薬物治療法の開発が急務である。

研究代表者らはこれまでの研究で、老齢マウスと除神経モデルマウスにおいて、L型カルシウムチャネル(LTCC)の $\beta$ サブユニット( $Ca_v\beta_1$ )の発現量が増加するという、新たな事実を見いだした。しかし筋萎縮病態と $Ca_v\beta_1$ の増加との関連については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、サルコペニアなどの筋萎縮病態におけるLTCCの $\beta$ サブユニット( $Ca_v\beta_1$ )の役割と、治療標的としての可能性を明らかにすることである。 $Ca_v\beta_1$ はLTCCが正常な機能を果たすために必須のサブユニットであり、筋の興奮収縮連関において重要な役割を果たしている。そこで $Ca_v\beta_1$ が筋萎縮病態に果たす役割などを解析し、治療標的となりうるか否かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 除神経モデルマウスの作製: 10-13週齢の雄性C57BL/6マウスの坐骨神経を切除し、2週間後に無処置の反対側(健側)をコントロールとして比較検討を行った。

#### (2) マウス骨格筋の収縮力測定

麻酔下のC57BL/6マウスの前脛骨筋(TA)を露出させ、遠位の腱を糸で結紮し、糸をFDピックアップTB611T(日本光電)に固定した。針型電極を筋線維に穿刺した後、電気刺激装置(日本光電)を用いてtwitch刺激(1 ms duration, 10 V), tetanus刺激(1 msec duration, 100 Hz, 100 train, 10 V)を行い、筋力を測定した。張力の解析にはPowerLabシステム(バイオリサーチセンター)を用いた。測定後の筋肉はHE染色を行い、断面積を測定した。

#### (3) ウェスタンブロッティング

各マウスよりTAを単離し、液体窒素で急速凍結した。凍結した組織はプロテアーゼインヒビターカクテル(ナカライテスク)を加えたホモジネーションバッファー(20 mM HEPES, 320 mM Sucrose, pH 7.4)中でホモジナイズした後、2000 gで15分遠心し、沈殿したデブリスを取り除いた。得られた上清を100,000 gで1時間遠心し、上清を取り除いた。沈殿をリシスバッファー(10 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% グリセロール、

1% Triton X100, pH 7.5)に懸濁し、10,000 gで30分間遠心し、得られた上清をミクロソーム分画とした。得られたミクロソーム分画を常法に従いSDS-PAGEで電気泳動した後、PVDF膜に転写した。非特異的吸着を防ぐためにメンブレンをブロッキングワン(ナカライテスク)で処理した後、抗Cacnb1エクソン1抗体(Stressmarq), 抗Cacnb1エクソン14抗体(Sigma)で一晩反応を行った。翌日、洗浄バッファー(1% Triton X100含有PBS)で洗浄した後、HRP標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch)を反応させ、洗浄を行った。Immobilon Western Chemiluminescent HRP(Merck Millipore)を用いて発光反応を行い、my ECL Imager(Life Technologies)によって発光を検出した。得られたバンドはImageJを用いて解析・定量した。

#### (4) 定量PCR

C57BL/6マウスよりTAを単離し、液体窒素で急速凍結した。凍結した組織からIsogenを用いてtotal RNAを抽出した。各total RNAを鋳型にSuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(インビトロジェン)を用いてcDNAを合成した。PCR反応試薬としてFastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(ロシュ)を用い、測定機器はStepOnePlus(アプライドバイオシステムズ)を使用した。

#### (5) 蛍光カルシウムイメージング

マウスより短趾屈筋を採取し、5 mg/mlのコラゲナーゼを含むDMEMで37℃, 1時間分解した。単離した筋線維をラミニンコートしたガラスボトムディッシュに接着させ、蛍光カルシウム指示薬Fluo-4を取り込ませた。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡LSM7 Live(Zeiss)で測定した。電気刺激にはフィールド刺激用の電極を用い、twitch刺激(1 ms duration, 50 V), tetanus刺激(1 msec duration, 100 Hz, 100 train, 50 V)を行った。また、カルシウム非存在下にて、イオノマイシン、シクロピゾン酸、EDTAを混合したカルシウム放出試薬で刺激することで、筋小胞体中のカルシウム量を測定した。

#### (6) アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入

$Ca_v\beta_1$ サブユニット遺伝子はマウス骨格筋cDNAライブラリよりクローニングした。得られたcDNAはpCMV-AAVベクター(Clontech)に導入した。このプラスミドを、pRC6とpHelperプラスミドとともにAAVpro細胞にトランスフェクションし、アデノ随伴ウイルスを発現させた。ウイルスはAAVpro purification kitを用いて精製した。得られたウイルス粒子を、正常マウスのTAに注射( $2 \times 10^{10}$  vg/foot)した。14日後に筋収縮力を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 除神経による $Ca_v\beta_1$ サブユニットの増加  
これまでの検討で、除神経モデルマウスで

は  $Ca_v\beta_1$  サブユニットが増加することを見いだしていた。 $Ca_v\beta_1$  サブユニットには、エクソン 7 (エクソン 7A か 7B) とエクソン 14 (エクソン 14 の有無) の部位が異なるスプライスバリエントが存在する。本研究では、まず増加している  $Ca_v\beta_1$  サブユニットがどのバリエントであるかを確認するために、これらの遺伝子を強制発現させた細胞のライセートと、除神経マウスの筋由来のマイクロソームを用いてウェスタンブロッティングを行った。はじめに、全てのバリエントに共通の配列である、エクソン 1 を認識する抗体を用いた (図 1)。その結果、強制発現させたサンプルでは、それぞれの予想されるサイズにバンドが確認できた。除神経を行ったマウスでは、発現量の増加が認められた。検出されたサイズはエクソン 7A を持ち、エクソン 14 を持たない、 $Ca_v\beta_{1a}$  サブユニットと呼ばれるものとはほぼ等しかった。また、エクソン 14 を認識する抗体を用いた検討では、除神経マウス由来のサンプルでシグナルが検出できなかった。これらの結果は、除神経によって増加しているバリエントが  $Ca_v\beta_{1a}$  サブユニットであることを示唆している。

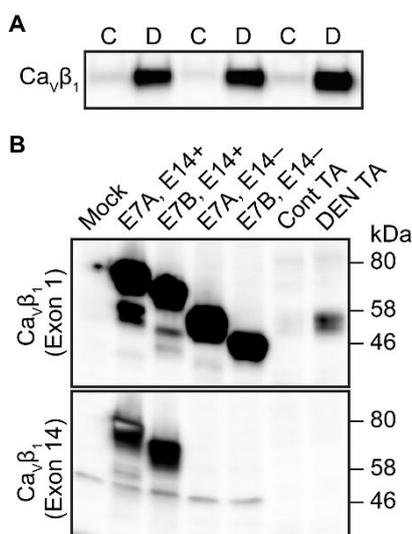


図 1 除神経による  $Ca_v\beta_1$  サブユニットの増加とバリエントの同定。(A) TA の  $Ca_v\beta_1$  の発現量に対する除神経の影響。C: 健側, D: 除神経側。(B) TA の  $Ca_v\beta_1$  と強制発現した各バリエントの比較。左側 5 レーンは、HEK293 細胞に強制発現したサンプルである。

## (2) 定量 PCR による $Ca_v\beta$ サブユニット mRNA の定量

$Ca_v\beta_1$  サブユニットの増加メカニズムを明らかにするために、定量 PCR による mRNA 量の測定を行った。その結果、除神経側と健側で、 $Ca_v\beta_1$  の mRNA 量はむしろ有意に減少していた (図 2)。また他の  $\beta$  サブユニットである  $Ca_v\beta_2$ ,  $Ca_v\beta_3$ ,  $Ca_v\beta_4$  においても発現量が増加しているものは認められなかった。この結果から、 $Ca_v\beta_1$  サブユニットの増加は、タンパク質の分解抑制などの、転写の増加によらない機構で起きていることが示唆され

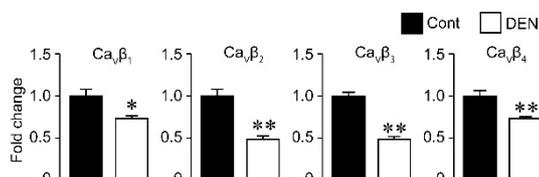


図 2  $Ca_v\beta$  mRNA 発現量に対する除神経の影響。除神経処置後に TA を採取し、定量 PCR 法にて  $Ca_v\beta$  mRNA 量を定量した。Mean  $\pm$  SE. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01。

た。

## (3) 除神経による筋収縮力への影響

除神経 2 週間後の TA を用いて、*in vivo* での収縮力測定を行ったところ、除神経側での有意な減少が認められた。また、切片を用いて測定を行った結果、筋断面積も有意に減少していた。さらに単位面積当たりの筋張力も減少していたことから、除神経が筋萎縮のみでなく、筋繊維当たりの収縮力が低下していることが示された。

## (4) カルシウムイメージング

L 型カルシウムチャネルが正常な機能を維持することは骨格筋の興奮収縮連関に必須である。 $Ca_v\beta_1$  サブユニットは LTCC の膜輸送に重要な役割を果たしているため、その増加が興奮収縮連関に影響を与えている可能性がある。そこで、蛍光色素を用いたカルシウムイメージングを行った。その結果、除神経側では、電気刺激によるカルシウム上昇が有意に低下していた。また、筋小胞体中のカルシウム含量を測定したところ、半分程度まで減少していた (図 3)。

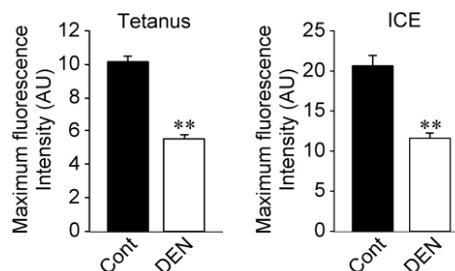


図 3 カルシウムトランジェントに対する除神経の影響。除神経後に FDB を採取し、コラゲナーゼ処理により単離筋線維とした。Tetanus 刺激および小胞体カルシウム放出薬 (10  $\mu$ M イオノマイシン, 30  $\mu$ M シクロピアゾン酸, 100  $\mu$ M EDTA) 刺激を行い、細胞内カルシウム濃度の上昇を蛍光カルシウム指示薬 Fluo-4 により検出した。

## (5) アデノ随伴ウイルスによる $Ca_v\beta_1$ サブユニットの強制発現

$Ca_v\beta_1$  サブユニットの増加が、直接筋の収縮力に与える影響を明らかにするために、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた、*in vivo* での強制発現を行った。 $Ca_v\beta_1$  サブユニットを組み込んだウイルスを投与した 14 日後、筋収縮力の測定を行った。しかし  $Ca_v\beta_1$  サブ

ユニットの強制発現は筋収縮力に影響を及ぼさなかった(図4)。

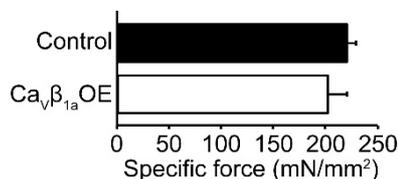


図4 Ca<sub>v</sub>β<sub>1a</sub> サブユニットの強制発現の筋力への影響。Ca<sub>v</sub>β<sub>1a</sub> をアデノ随伴ウイルスベクターで前脛骨筋に強制発現させた。Tetanus 刺激による筋張力と筋断面積から特異張力を求めた。

#### (6) 考察

本研究により、除神経によって骨格筋で増加する Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットが Ca<sub>v</sub>β<sub>1a</sub> と呼ばれるバリエーションである可能性が高いこと、またその増加は mRNA の転写を介さないメカニズムで起きていることが明らかになった。Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットは LTCC の細胞膜への輸送に必須であるが、増加した際の興奮収縮連関への影響については、ほとんど分かっていない。今回の実験では、電気刺激によるカルシウムトランジェントの低下が認められたが、同時に筋小胞体中のカルシウム含量も著名に低下していた。このため今回の実験では、除神経による興奮収縮連関の低下が、LTCC の機能低下によるものか、筋小胞体の異常によるものかは明らかにできなかった。今後、パッチクランプ法などの実験を組み合わせる必要がある。

アデノ随伴ウイルスを用いて正常マウスに Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットを強制発現させた実験では、筋力に影響は認められなかった。この結果は、Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットの増加自体に、筋力を低下させる効果が無いことを示唆している。一方、除神経処置とウイルスによる強制発現では、Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットの発現量や発現後の期間などが異なる可能性もあり、より詳細な検討が必要である。また、除神経モデルマウスの Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> サブユニットの発現を抑制し、筋力の低下や萎縮が抑制されるかどうかなどの検討を行うことで、薬物治療の標的になりうるかどうか判断できる可能性がある。

#### 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1件)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Kojima K, Takeshita T, Yamada M. Physical interaction of junctophilin and the Ca<sub>v</sub>1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 24, 4507-4512, 2018, 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1716649115

[学会発表](計1件)

小松雅俊, 中田勉, 山本竜星, 柏原俊英, 山田充彦: 萎縮骨格筋における L 型カルシウムチャネル β サブユニットの発現増加, 第 134 回日本薬理学会関東部会, 2016.7.9, 栃木

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 雅俊 (KOMATSU, masatoshi)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 60723070