

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20424

研究課題名(和文)NF- κ Bシグナルを標的とした骨格筋萎縮性疾患治療の分子基盤形成研究課題名(英文)The molecular basis for the treatment of muscle atrophy targeting NF- κ B signaling

研究代表者

古株 彰一郎(Kokabu, Shoichiro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30448899

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)：骨格筋の萎縮は要支援・要介護の大きな原因であり、超高齢社会のわが国にとって優先的に取り組むべき課題である。NF- κ Bは様々な生命現象に不可欠な因子である。今回、骨格筋代謝におけるNF- κ Bの役割の解明を試みた。NF- κ Bの活性は筋線維の分解・減少期と増殖期には亢進し、それに引き続く分化融合期には減少する。さらに、TNF α で誘導したNF- κ Bは筋の分解と増殖を促進し、分化・融合を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling has also been shown to be involved in skeletal muscle atrophy. However, the role of NF- κ B on the skeletal muscle metabolism and the regenerative capacity of satellite cells during the muscle atrophy process still remains unknown. NF- κ B signaling was increased during muscle fiber degradation and during the proliferative stage of satellite cells. In contrast, NF- κ B signaling was decreased during the differentiation/fusion stage of satellite cells. Moreover, NF- κ B signaling induced muscle fibers degradation and satellite cells proliferation but suppressed differentiation and fusion of satellite cells. These data suggest that inhibitors of NF- κ B are potential candidates for the treatment of skeletal muscle atrophy. However, our data also suggests that a stage-specific regulation of NF- κ B signaling will be necessary during therapeutic intervention so as not to repress the proliferation of satellite cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 骨格筋萎縮 NF- κ B サテライト細胞 オーラルフレイル

1. 研究開始当初の背景

摂食機能障害は食物の認識から咀嚼による食塊形成、嚥下における障害であり、誤嚥性肺炎の主要な原因となり生命に直結するばかりでなく、“食事を楽しむ”という人生の大きな喜びを奪う。そしてこの摂食機能障害の原因として脳血管障害による麻痺やサルコペニアなどによる摂食嚥下関連筋の萎縮があり、超高齢社会のわが国では国民が健やかに老いることができる将来を実現するために、筋の衰弱・萎縮を予防することは優先的に組むべき課題である。

骨格筋は定常状態でも一定の割合で分解し減少しているが、筋線維表面に存在する骨格筋組織幹細胞(サテライト細胞)が増殖、筋芽細胞に分化することで減少した骨格筋量と同量の骨格筋を再生し、骨格筋量が維持される。骨格筋の萎縮はこの分解・減少と再生のバランスが崩れ、骨格筋の分解・減少が相対的に再生を上回ることで生じる。

転写因子 NF- κ B は免疫応答、細胞分化や増殖などのさまざまな生命現象に関与する。サルコペニア患者では NF- κ B シグナルを誘導する TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの血中濃度が高いこと、がんの悪液質による筋萎縮で NF- κ B シグナルの亢進することが知られる。また NF- κ B の阻害分子である I κ B の過剰発現では筋萎縮に対して抵抗性を示し、逆に、NF- κ B を活性化させる I κ B kinase の過剰発現で骨格筋の分解の亢進が報告されている。これらは NF- κ B シグナルは種々の筋萎縮性疾患の予防や治療のターゲットと成り得る可能性を示すが、骨格筋萎縮における NF- κ B 活性化メカニズムやいつどの細胞で NF- κ B シグナルが亢進するか不明な点が多い。

2. 研究の目的

骨格筋代謝における各ステップ、すなわち筋線維の分解・減少、サテライト細胞の増殖、サテライト細胞が分化融合する過程における NF- κ B シグナルの挙動とその役割が明らかにする。

3. 研究の方法

10週令雄の NF- κ B レポーターマウスの坐骨神経を切除し、除神経性骨格筋萎縮モデルを作製した。除神経後 1, 3, 5, 7 日後に前脛骨筋(TA)を採取しルシフェラーゼ活性を測定した。10週令雄野生型マウスから長指伸筋(EDL)を採取し TNF で 3 日間培養した。6週令雄 NF- κ B レポーターマウスの脛骨筋に 250 ng の Notexin を注射し、骨格筋再生モデルを作製した。Notexin 注射後、0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 日後に TA を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。10週令雄野生型マウスから採取した EDL 上でサテライト細胞を 2 日間培養し、Pax7, p65, MyoD, Ki67 抗体で免疫染色を行った。EDL 上でサテライト細胞を TNF 存在下で 3 日間培養し Pax7 抗体で染

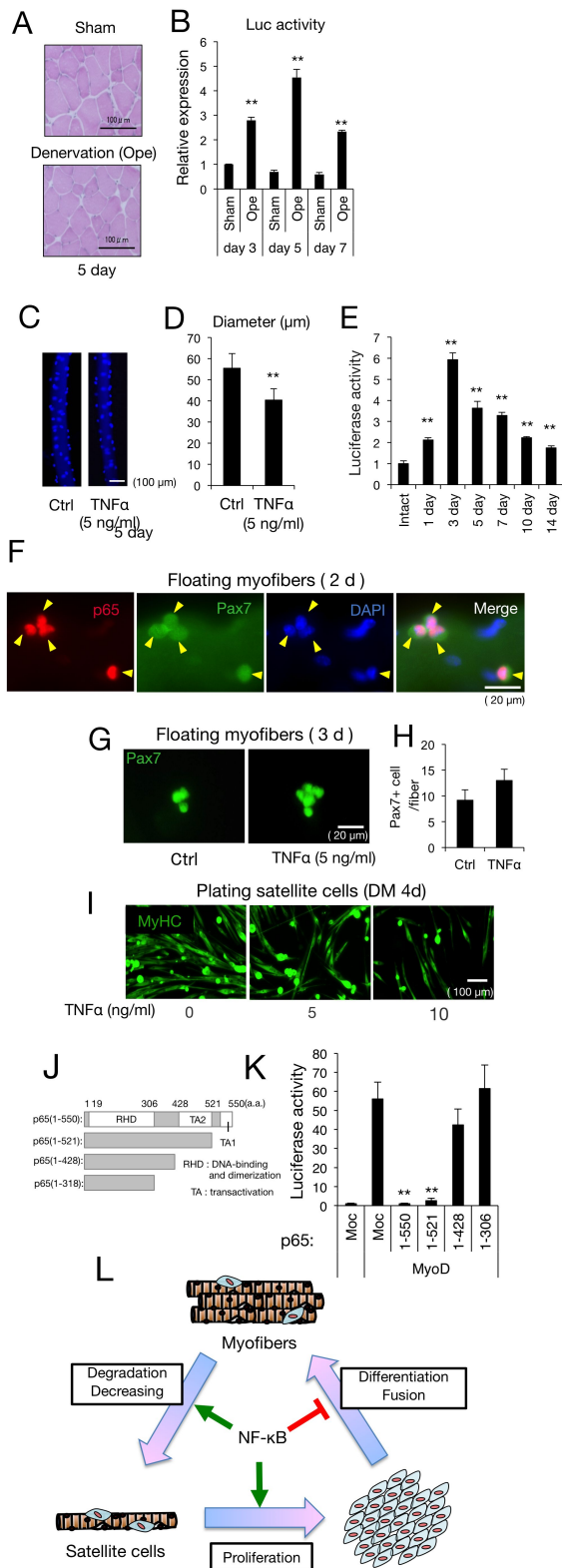
色後、増殖した細胞数を定量した。EDL から単離したサテライト細胞を 5%ウマ血清培地で筋分化を誘導し MF20 抗体で免疫染色を行い TNF の影響を検討した。10T1/2 細胞に MG185 ルシフェラーゼレポータープラスミド、MyoD ならびに p65 ベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

まず、骨格筋分解・減少過程における NF- κ B シグナルの動態を確認した。除神経により骨格筋の減少・分解を誘導した TA では 5 日目をピークに NF- κ B シグナルが上昇した(A and B)。さらに単離した EDL を TNF で 3 日間処理したところ線維幅径の減少(C and D)と筋肉の減少に関与するユビキチンリガーゼの MuRF と Atrogin-1 の発現が上昇していた。次に骨格筋再生過程における NF- κ B シグナルの動態を確認した。Notexin 注射による骨格筋再生モデルでは 3 日目、すなわち増殖期をピークに NF- κ B シグナルが上昇し、分化期に入るにつれて減少していった(E)。増殖期のサテライト細胞ではメインサブユニットの p65 の核移行、すなわち NF- κ B シグナルの亢進が認められた(F)。

TNF 処理によりサテライト細胞の数が増加し(G and H)、細胞周期に関わる遺伝子 CyclinD1 や CyclinA2 の発現上昇が認められた。それとは逆に TNF 処理の濃度依存的にサテライト細胞の分化を抑制した(I)。さらに筋分化のマスターレギュレーターである MyoD の転写活性に対する p65 の作用を検討するために p65 の欠失変異体と MyoD を 10T1/2 細胞に過剰発現し MG-185-ルシフェラーゼ活性を測定した。すると、p65 は MyoD の転写活性を強力に抑制し、その抑制作用には p65 の TA2 ドメインが必要なことがわかった。

以上より、NF- κ B シグナルは筋線維の分解・減少期と増殖期には亢進し、それに引き続く分化融合期には減少する。さらに、TNF で誘導した NF- κ B は筋の分解と増殖を促進し、分化・融合を抑制することが明らかとなった(L)。現在 NF- κ B の阻害剤は骨格筋の分解を抑制するため骨格筋萎縮性疾患の有力な候補となっているが、サテライト細胞の増殖を抑制しないように骨格筋代謝のステージに応じた厳密な NF- κ B のコントロールが重要であることが示唆された。



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 10 件)

- 1) Niimura M, Sato T, Enoki Y, Okubo M, Kokabu S, Takeda S, Yoda T: Semaphorin 3A Promotes Dendrite Elongation of Osteocytes in Association with Down-regulation of CDK6. *In*

Vivo, 30, 231-236, 2016. (IF=0.953)

- 2) Hori N, Abe T, Sato T, Kokabu S, Shimamura Y, Sato T, Yoda T: Data in support of the bone analysis of NOD-SCID mice treated with zoledronic acid and prednisolone. *Data in Brief*, 7, 1486-90, 2016. (IF=N/A)

- 3) Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Ono Y, Addison WN, Lowery JW, Urata M, Hudnall AM, Hitomi S, Nakatomi M, Sato T, Osawa K, Yoda T, Rosen V, Jimi E: The transcriptional co-repressor TLE3 regulates myogenic differentiation by repressing the activity of the MyoD transcription factor. *J Biol Chem*, 292, 12885-94, 2017. (Corresponding author) (IF=4.125)

- 4) Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano-Yamamoto T: Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 489, 472-6, 2017. (IF=2.466)

- 5) Sato T, Kokabu S, Enoki Y, Hayashi N, Matsumoto M, Nakahira M, Sugawara M, Yoda T: Functional Roles of Netrin-1 in Osteoblast Differentiation. *In Vivo*, 31, 321-8, 2017. (IF=0.953)

- 6) Enoki Y, Sato T, Kokabu S, Hayashi N, Iwata T, Yamato M, Usui M, Matsumoto M, Tomoda T, Ariyoshi W, Nishihara T, Yoda T: Netrin-4 Promotes Differentiation and Migration of Osteoblasts. *In Vivo*, 31, 793-9, 2017. (IF=0.953)

- 7) Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Yasuda H, Takano-Yamamoto T, Baron R, Jimi E: The actin-binding protein PPP1r18 regulates maturation, actin organization, and bone resorption activity of osteoclasts. *Mol Cell Biol*, 38, e00425-17, 2017. (IF=4.398)

- 8) Kokabu S, Rosen V: BMP3 expression by osteoblast lineage cells is regulated by canonical Wnt signaling. *FEBS Open Bio*, 8, 168-176, 2017. (Corresponding author) (IF=2.143)

- 9) Kokabu S, Lowery JW, Jimi E: Cell Fate and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, article ID 3753581, 2016. (Corresponding author) (IF=3.540)

- 10) Kokabu S, Lowery JW, Toyono T, Sato T, Yoda T: On the Emerging Role of the Taste Receptor Type 1 (T1R) Family of Nutrient-Sensors in the Musculoskeletal System. *Molecules*, 22, E469, 2017. (Corresponding author) (IF=2.861)

[学会発表](計 30 件)

- 1) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 人見涼露, 自見英治郎: NF-κB シグナルは除神経による骨格筋萎縮初期に亢進する. 第 76 回九

- 州歯科学会 (2016年5月, 北九州)
- 2) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: Enhancement of NF- κ B signaling and denervation-induced skeletal muscle atrophy. 第34回日本骨代謝学会(2016年7月, 大阪)
 - 3) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3によるMyoDの転写活性調節機構. 第58回歯科基礎医学会(2016年8月, 北海道)
 - 4) 中富千尋, 古株彰一郎, 松原琢磨, 中富満城, 浦田真梨子, 自見英治郎: NF- κ B非古典的経路は内軟骨性骨形成を調節している. 第58回歯科基礎医学会(2016年8月, 北海道)
 - 5) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 山本照子, 自見英治郎: 新規アクチン結合分子PPP1r18は破骨細胞のアクチンリング形成を阻害する. 第58回歯科基礎医学会(2016年8月, 北海道)
 - 6) 浦田真梨子, 松原琢磨, 竹内 弘, 中富千尋, 平田-土屋志津, 古株彰一郎, 張 皿, 北村知昭, 自見英治郎: Smad4とNF- κ B/p65の会合領域の同定. 第58回歯科基礎医学会(2016年8月, 北海道)
 - 7) 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 自見英治郎: 新規 c-Src 会合分子 PPP1r18 は破骨細胞の骨吸収を負に制御する. 第77回九州歯科学会(2017年5月, 北九州)
 - 8) 小川昌洋, 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 渡邊誠之, 自見英治郎: 悪性黒色腫の上皮間葉移行におけるBMPシグナルの役割. 第77回九州歯科学会(2017年5月, 北九州)
 - 9) 當山健弥, 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 牧 憲司, 自見英治郎: p130Casと結合するタンパク質 Bif-1 は骨吸収に関与する. 第77回九州歯科学会(2017年5月, 北九州)
 - 10) 浦田真梨子, 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 張 皿, 土屋-平田志津, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎: Smad4とNF- κ B p65の結合領域の検討. 第77回九州歯科学会(2017年5月, 北九州)
 - 11) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3は骨格筋幹細胞サテライト細胞の筋分化を制御する. 第77回九州歯科学会(2017年5月, 北九州)
 - 12) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 自見英治郎: アクチン結合分子 PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成および破骨細胞性骨吸収を制御する. 第35回日本骨代謝学会(2017年7月, 福岡)
 - 13) 中富千尋, 古株彰一郎, 松原琢磨, 自見英治郎: NF- κ B非古典経路の内軟骨内骨化過程における役割. 第35回日本骨代謝学会(2017年7月, 福岡)
 - 14) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3はサテライト細胞の筋分化を制御する. 第35回日本骨代謝学会(2017年7月, 福岡)
 - 15) 小川昌洋, 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 渡邊誠之, 自見英治郎: 悪性黒色腫の顎骨浸潤と転移におけるBMPシグナルの役割. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 16) 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3による骨格筋幹細胞サテライト細胞の増殖・分化制御機構. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 17) 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 自見英治郎: 破骨細胞のアクチンリング形成および破骨性骨吸収を制御するアクチン結合分子 PPP1r18. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 18) 中富千尋, 松原琢磨, 中富満城, 古株彰一郎, 自見英治郎: 成長板軟骨細胞の増殖におけるNF- κ B非古典経路の役割. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 19) 浦田真梨子, 松原琢磨, 中富千尋, 土屋-平田志津, 古株彰一郎, 張 皿, 北村知昭, 自見英治郎: BMPによる骨形成促進を目的としたSmad4とNF- κ B p65の会合領域の検討. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 20) 林 直樹, 佐藤 毅, 磯崎裕太, 伊神英治, 湯本愛実, 古株彰一郎, 依田哲也: 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病態解明に関する研究—エストロゲンと β -crystallinA4は腱細胞の分化・増殖を促進させる. 第59回歯科基礎医学会(2017年9月, 松本)
 - 21) 小早川美輝, 柄慎太郎, 細川隆司, 古株彰一郎: うま味受容体 Tas1r1/tas1r3の発現量は飢餓状態の骨格筋線維で低下する. 第29回日本口腔インプラント学会(2018年1月, 北九州)
 - 22) Nakatomi C, Kokabu S, Matsubara T, Nakatomi M, Jimi E: NF- κ B alternative pathway regulates the endochondral ossification. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2016 (May 2016, Kitakyushu)
 - 23) Matsubara T, Nakatomi C, Urata M, Ogawa M, Toyama K, Kunihiro H, Kokabu S, Jimi E: A novel protein actin ring regulator PPP1r18 in osteoclasts. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2016 (May 2016, Kitakyushu)
 - 24) Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Jimi E: TLE3 regulates myogenic differentiation of muscle stem cells by repressing the transcriptional activity of MyoD. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2017 (May 2017, Kitakyushu)
 - 25) Urata M, Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, Zhang M, Hirata-Tsuchiya S, Kitamura C, Jimi E: Identification of the binding region of NF- κ B-p65 on Smad4. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2017 (May 2017, Kitakyushu)
 - 26) Ogawa M, Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara M, Watanabe S, Jimi E: The role of BMP signaling in EMT of malignant melanoma. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2017

- (May 2017, Kitakyushu)
- 27) Nakaminami Y, Akaike Y, Shirai K, Kokabu S, Matsubara T, Jimi E: NF- κ B regulates the differentiation of skeletal muscle stem cells. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2017 (May 2017, Kitakyushu)
- 28) Matsubara T, Nakatomi C, Kokabu S, Jimi E: A novel c-Src binding protein PPP1r18 regulates actin ring in osteoclasts. Asia-Pacific Conference in FUKUOKA 2017 (May 2017, Kitakyushu)
- 28) Yaginuma T, Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, Yada N, Matsuo K, Yoshioka Y, Jimi E: The role of p130Cas in morphological change, mobility, and invasion ability induced by TGF- β in oral squamous cell carcinoma. The 10th Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology and 2nd Asian Symposium on Chemistry-based Biotechnology (November 2017, Kitakyushu)
- 29) Toyama K, Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C, Maki K, Jimi E: A p130Cas binding protein Bif-1 is involved in osteoclastic bone resorption. The 10th Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology and 2nd Asian Symposium on Chemistry-based Biotechnology (November 2017, Kitakyushu)
- 30) Kobayakawa M, Nakashima T, Matsubara T, Addison WN, Hosokawa R, Kokabu S: Expression levels of umami receptor, tas1r1/tas1r3, are decreased in an in vitro model of skeletal muscle atrophy. The 10th Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology and 2nd Asian Symposium on Chemistry-based Biotechnology (November 2017, Kitakyushu)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kyu-dent.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古株彰一郎 (KOKABU Shoichiro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30448899