

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08102

研究課題名(和文) グルコルチコイドによるイヌ骨格筋におけるインスリン抵抗性および筋萎縮の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology of glucocorticoid-induced muscle atrophy and insulin resistance

研究代表者

西飯 直仁 (Nishii, Naohito)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20508478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イヌおよび培養イヌ骨格筋細胞を用いて、グルコルチコイド過剰の病態モデルを作成し、その病態解明を目的として研究した。グルコルチコイド過剰によって骨格筋は明確に萎縮し、GRB10を始めとした筋萎縮に関連する遺伝子の発現量増加がみられた。イヌにおけるグルコルチコイド筋萎縮の病態には、これらの遺伝子発現量増加に伴う、骨格筋でのタンパク質分解の促進と、合成の低下が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルコルチコイド過剰の生体および細胞モデルが作成されたことで、その病態解明や新規治療法の開発が促進される。そしてグルコルチコイド過剰に伴って生じる遺伝子発現変化などの分子病態の解明により、治療において重要となる標的が明確となってきた。これによってグルコルチコイド過剰による筋萎縮により苦しむ伴侶動物に対する新たな治療法の確立に近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)：We established pathophysiological model of glucocorticoid excess using dogs and cultured canine skeletal muscle cells. Glucocorticoid excess significantly induced skeletal muscle atrophy, and increased muscle atrophy-related gene (e.g. GRB10) expressions. The present results suggested that increased catabolism and decreased anabolism of protein through the elevation of these genes might induce glucocorticoid-induced muscle atrophy in dogs.

研究分野：獣医学

キーワード：グルコルチコイド 筋萎縮 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドの骨格筋における副作用としてインスリン抵抗性と筋萎縮が挙げられる。犬においてグルココルチコイドの長期投与により糖尿病を発症する個体が少なくないほか、筋萎縮により生活の質が大幅に低下する。外因性グルココルチコイドによる副作用の場合、投与量を減量する以外に対処法はなく、減量が困難である場合、副作用を管理することは不可能である。さらに内因性グルココルチコイドが増加する副腎皮質機能亢進症においても同様のインスリン抵抗性と筋萎縮が臨床上的大きな問題となっている。しかし犬においてグルココルチコイドによるインスリン抵抗性および筋萎縮の分子病態に関する情報は驚くほど少なく、有効な治療法は存在しない。グルココルチコイドの投与は骨格筋においてインスリンシグナル伝達を阻害して糖取り込みを減少させ、また蛋白質合成を阻害すると同時に蛋白質異化を促進することが明らかとなっている。近年齧歯類において、骨格筋におけるグルココルチコイド応答性の遺伝子のうち、インスリンシグナルおよび蛋白代謝に関与する遺伝子が明らかとなり、グルココルチコイドによるインスリン抵抗性および筋萎縮の主要因子の候補として注目されている。これらの因子がイヌのグルココルチコイドによるインスリン抵抗性や筋萎縮の予防および治療の標的となりうるか、調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的はイヌにおいてグルココルチコイドがインスリン抵抗性と筋萎縮を引き起こす病態を解明することである。特に細胞内インスリンシグナルや蛋白の異化および同化に影響を与える、グルココルチコイド応答性遺伝子に着目し、新規治療法の標的となる分子を探索する。

3. 研究の方法

1) ビーグル犬にプレドニゾロンを4週間経口投与し、グルココルチコイド過剰モデルを作成した。定期的にCT撮影により全身の骨格筋の体積および断面積を測定するほか、筋生検を行い、筋線維断面積について評価した。また糖負荷試験を実施し、グルココルチコイドによるインスリン抵抗性について評価した。さらに生検材料から蛋白質およびRNAを抽出し、候補分子の発現量の変化について解析した。

2) 培養イヌ骨格筋細胞にデキサメサゾンを追加し、グルココルチコイド過剰モデルを作成した。細胞径を測定し、筋萎縮の程度について評価した。またインスリン添加後の糖取り込み量を測定し、インスリン感受性について評価した。細胞から蛋白質およびRNAを抽出し、候補分子の発現量の変化について解析した。

4. 研究成果

1) イヌ生体を用いてグルココルチコイドの作用を検討した。プレドニゾロンの投与後、CT解析および生検材料の組織学的検査において骨格筋（図1）および筋線維（図2）の断面積が有意に減少し、グルココルチコイド筋萎縮の *in vivo* モデルとなることが確認された。

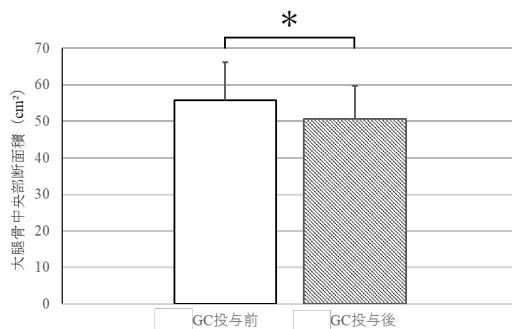


図1 骨格筋断面積

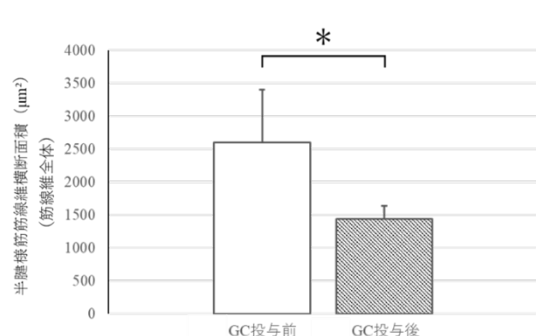


図2 筋線維断面積

この際に生じる骨格筋内での遺伝子発現の変化について解析すると、グルココルチコイド応答性遺伝子の中でもGRB10の発現量増加が著しく（図3）、GRB10を介したインスリンシグナリングの抑制が、イヌにおけるグルココルチコイドによる筋萎縮の原因の1つである可能性が考えられた。GRB10の発現増加は同時にインスリン抵抗性の原因にもなり得るが、本モデルにおいては糖負荷試験における糖耐性低下は明確でなく、糖代謝への影響については明らかではなかった。

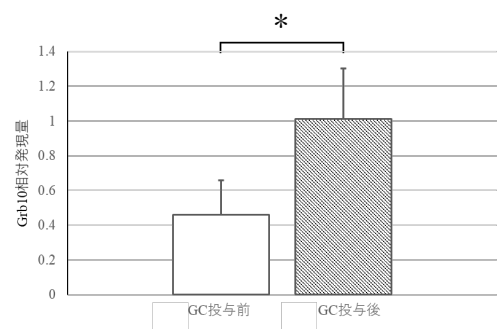


図3 骨格筋における遺伝子発現量の変化

2) イヌ初代培養骨格筋を用いて、グルココルチコイドの作用を検討した。イヌ初代培養骨格筋は安定して筋管細胞へと分化誘導された。分化した培養筋管細胞にグルココルチコイドとしてデキサメサゾンを追加すると、筋管細胞径は有意に減少した(図4)。このことから、デキサメサゾン添加によってグルココルチコイド筋萎縮の病態が再現されたと考えられた。

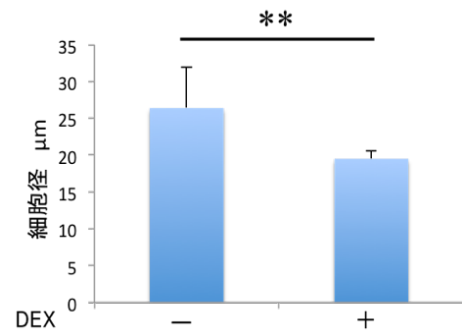


図4 骨格筋細胞径の変化

遺伝子発現量の解析において、DEXを添加するとGRB10、SESN1、Atrogin1、FoxO3、p85、KLF15、Ddit4などの筋萎縮関連遺伝子の発現量が有意に増加していた(図5)。DEX添加により培養イヌ骨格筋細胞の萎縮が認められ、イヌにおけるGC筋萎縮の*in vitro*モデルが作製された。イヌにおけるGC筋萎縮の病態には、Atrogin1、FoxO3、KLF15の遺伝子発現量増加による蛋白異化促進と、GRB10、SESN1、Ddit4、p85の遺伝子発現量増加による蛋白同化抑制が関与している可能性が示唆された。

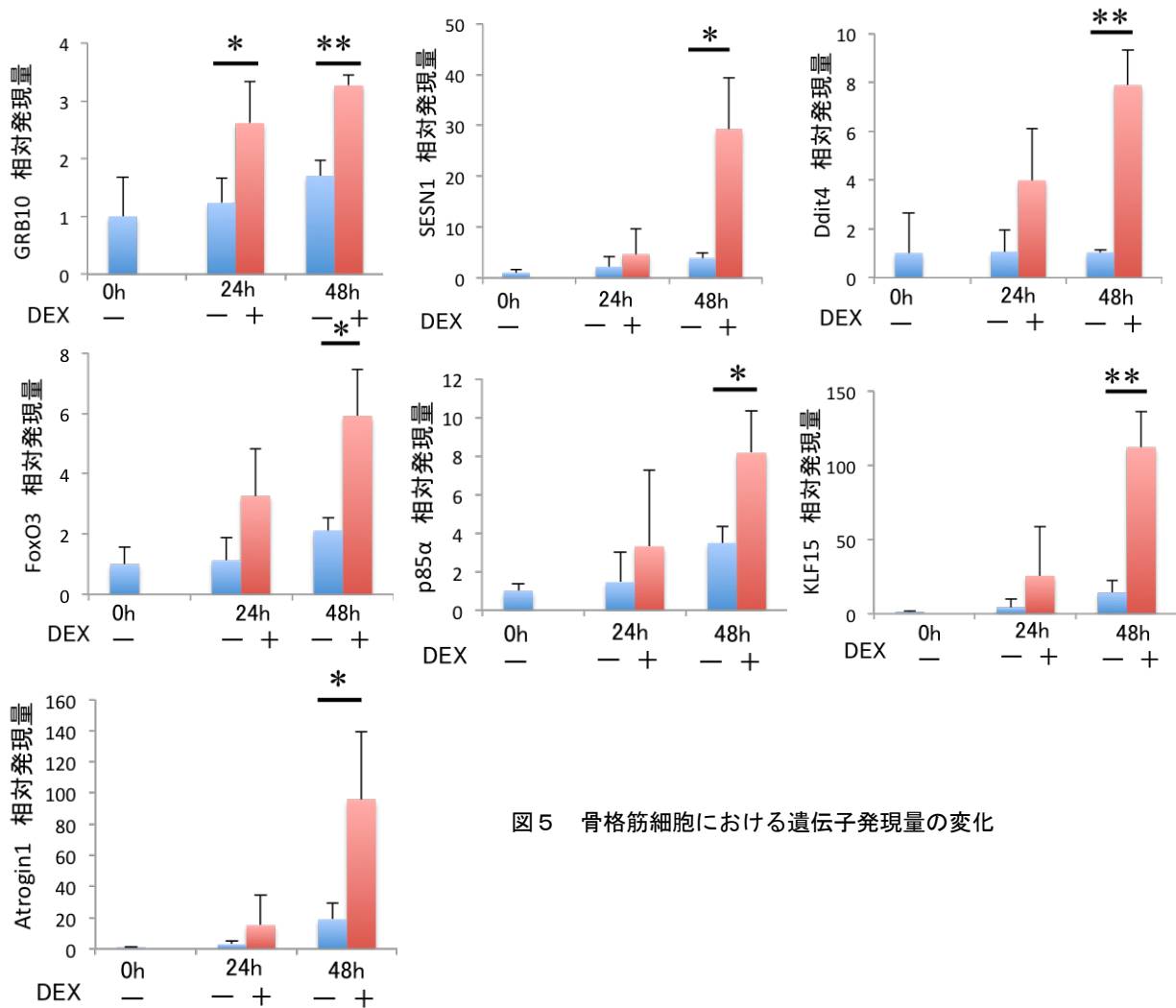


図5 骨格筋細胞における遺伝子発現量の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松岡 利雄, 小島 結, 高島 諭, 西飯 直仁
2. 発表標題 イヌにおけるグルココルチコイド投与による筋萎縮の誘導
3. 学会等名 第161回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村恵里, 高島諭, 小島結, 西飯直仁
2. 発表標題 培養イヌ骨格筋細胞におけるグルココルチコイド筋萎縮の誘導
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishii, N., Matsuoka, T., Kobatake, Y., Takashima, S.
2. 発表標題 Analysis of gene expression in dogs with glucocorticoid-induced muscle atrophy
3. 学会等名 Asia Meeting of Animal Medicine Specialties (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 早苗 (Shibata Sanae) (20588917)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高島 諭 (Satoshi Takashima) (70734664)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	