

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19940

研究課題名(和文) 運動トレーニング及び肥満への適応は筋幹細胞にメモリーされるか？

研究課題名(英文) The role of muscle satellite cells on muscle adaptation

研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化は、エピジェネティックな遺伝子修飾の一つであり、骨格筋におけるトレーニング適応や不活動による萎縮に関係している可能性が考えられる。我々は、骨格筋量を制御する因子である神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)に着目し、不活動筋におけるnNOSのDNAメチル化や損傷筋におけるnNOSの遺伝子発現とDNAメチル化、さらに高脂肪食負荷による変化を検討した。DNAメチル化は、骨格筋のnNOS発現の制御因子であることが明らかとなったが、今のところ、その影響が筋サテライト細胞に継承されるかどうかは不明のままである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は、力学的負荷により肥大し、脱負荷により萎縮する。健康寿命の延伸には、生涯にわたり骨格筋量をいかに維持するか、そして代謝を含めた機能をいかに高めるか、重要である。本研究は、筋量を制御する因子の一つである神経型一酸化窒素合成酵素のエピジェネティックな遺伝子修飾を明らかにした。高齢社会におけるフレイル・サルコペニアの課題を解決するためのエビデンスの一つになったものと考えている。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation may play an important role in regulating gene expression in skeletal muscle to adapt to physical activity and inactivity. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in skeletal muscle is a key regulator of skeletal muscle mass; however, it is unclear whether nNOS expression is regulated by DNA methylation. While, muscle satellite cells, which are stem cells of skeletal muscle, play an important role in muscle regeneration and repair. We therefore determined nNOS expression and DNA methylation in muscle satellite cells in injured muscle-derived muscle satellite cells (CTX). The number of Pax7+ cells were significantly lower in CTX group than that in control group. The number of Pax7+nNOS double-positive cells and nNOS gene expression levels in CTX group were comparable to those in control group. These results suggest that CTX induced injury does not affect nNOS expression in muscle satellite cells.

研究分野：運動生理学

キーワード：サテライト細胞 一酸化窒素合成酵素 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

肥満(脂肪の過剰蓄積)は、血糖値の調節に重要な役割を担うホルモンである、インスリンの作用を減弱させる。しかし、持続的アスリートの骨格筋細胞内脂肪だけは例外である。すなわち、持続的アスリートは、肥満者よりもさらに多量の骨格筋細胞内脂肪を蓄積しているにも関わらず、インスリン作用は増強するという、パラドックスが存在する。

本研究では、持続的トレーニングおよび肥満モデルに加え、薬理的な暴露による筋損傷モデル、ギプス固定による筋萎縮モデルを用いて、マウス骨格筋より採取した筋幹細胞を培養して作成した筋管細胞に、適応の記憶が受け継がれるか、受け継がれると仮定した場合、その分子メカニズムは何か、明らかにすることに挑戦する。

2. 研究の目的

研究1: 骨格筋は、力学的負荷により肥大し、脱負荷によって萎縮する。筋量は、骨格筋の組織幹細胞である筋サテライト細胞によって制御されていることが知られており、筋サテライト細胞は、筋損傷時に活性化し、筋再生に寄与する。近年、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS: neuronal nitric oxide synthase)由来の一酸化窒素(NO: nitric oxide)が筋量調節に関与しているだけでなく、筋サテライト細胞の活性化に関与していることが報告されている。我々は、筋サテライト細胞の核にnNOSの発現が認められることを明らかにした。しかしながら、筋サテライト細胞に発現するnNOSの役割は不明である。そこで、筋サテライト細胞のnNOSの役割を明らかにするために、筋サテライト細胞の活性化を促すモデルとしてCTX投与による筋損傷モデルを作成した。研究1では、CTX投与時の骨格筋及び筋サテライト細胞のnNOSの遺伝子発現の変化を検討することとした。

研究2: 生体において遺伝子発現を調節する重要なエピジェネティック修飾の一つとして、DNAメチル化があり、遺伝子発現を抑制する機構として知られている。DNAメチル化による遺伝子発現制御は、正常な発生・分化に必須であるだけでなく、骨格筋を含む成熟した組織において、環境からの刺激に対する適応機構として重要な役割を果たしている。骨格筋の不活動は、筋萎縮を惹き起こす。その分子機序の一つとしてnNOSが知られている。nNOS由来のNOは、筋萎縮関連遺伝子として知られるMuRF1やAtrogin-1を誘導することで筋萎縮シグナルに関与している。これまでの報告から、筋不活動はnNOS/NO経路を介して筋萎縮を促進することが明らかになっている一方で、筋萎縮時のnNOS発現を調節する適応機序については不明である。そこで研究2では、1週間の片脚ギプス固定による萎縮筋のnNOS発現調節において、DNAメチル化制御が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

研究3: 高脂肪食は肥満を誘発する。一方、運動介入は体重の減少とともに肝脂肪の顕著な減少を認めるが、持続的トレーニング者の筋内脂肪はむしろ増加していることが知られている。従って、肥満や運動トレーニングは、骨格筋への適応が異なるかもしれない。我々は、6週齢の雄性マウスに対し6週間の高脂肪食摂取介入を行い、その後の6週間は高脂肪食摂取に加えて、自発的運動群と非運動群に分けて介入を行い、骨格筋への適応について、nNOSのDNAメチル化を評価するとともに、筋から得たサテライト細胞にそれらの記憶が継承されているか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究1: 9週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。10 μ MのCTXを前脛骨筋に50 μ l、腓腹筋に100 μ l投与することで筋損傷を誘導した(CTX群)。対照筋には同量の生理食塩水を投与した(コントロール群)。骨格筋を採取後、筋サテライト細胞を単離し、培養した。筋サテライト細胞は、筋サテライト細胞のマーカーであるPax7の免疫組織化学染色により同定した。培養5日目の筋サテライト細胞におけるnNOSの発現は、nNOSとPax7の二重染色によって評価した。骨格筋および筋サテライト細胞のnNOSの遺伝子発現は、リアルタイムPCR法により検討した。

研究2: 被験動物は、雄性C57BL/6Jマウスを用いた。マウスの片側後肢を石膏ギプスで固定し、1週間飼育した(IM群、Fig. 1)。非固定脚ではなく無処置の別個体のマウスをコントロール(CON)群とした。ギプス固定期間中の体重、摂餌量に群間差は認められなかった。1週間の飼育後、頸椎脱臼により屠殺し、遅筋型のヒラメ筋(So1)、速筋型の長趾伸筋(EDL)を摘出した。タンパク質発現量、遺伝子発現量、DNAメチル化レベルの評価のために、それぞれウェスタンブロット法、RT-PCR法、パイロシーケンス法を用いた。

研究3: 4週齢のC57BL/6J雄性マウスを用いた。2週間の順化期間後、マウスは普通食群と高脂肪食群に無作為に分け、6週間の食事介入を行った。その後、高脂肪食群はさらに自発的運動群と運動なし群に分け、さらに6週間介入した。それぞれの群より下肢筋を採取し、DNAを抽出

後、研究1および2同様な手法で解析を進めた。

4. 研究成果

<研究1>CTX群において、Pax7+細胞数が少なかったこと、筋芽細胞が確認されたことから、CTX投与によって筋サテライト細胞の活性化が進行していたことが考えられる。免疫組織化学染色の結果より、CTX群においても筋サテライト細胞の核にnNOSが発現しており、その細胞数はControl群と同等であった(図1)。

骨格筋におけるnNOSの遺伝子発現は、CTX群において減少していた一方で筋サテライト細胞においては変化しなかった(図2)。この結果は、nNOS由来のNO産生が、Control群とCTX群の筋サテライト細胞の間で変わらない可能性を示している。CTX投与時のnNOSの局在は、骨格筋においては細胞膜から細胞質へと局在が変化することが明らかとなっているが、本研究の結果から筋サテライト細胞においてCTX投与によるその局在の変化は生じないことが示唆された。NO産生は局所的であり、骨格筋のようなサイズの大きな組織ではnNOSの局在を変化させ、シグナル伝達を行っていると考えられるが、筋サテライト細胞はサイズが小さく、その局在を変化させる必要がないのかもしれない。

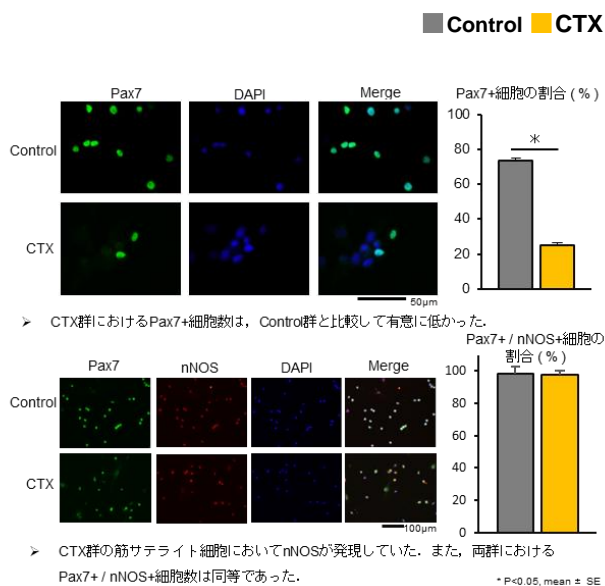


図1 損傷筋由来の筋サテライト細胞におけるnNOS発現

<研究2>ギプス固定群のSolでは、相対筋重量及び筋線維横断面積の減少、筋線維タイプIIaからIIbへの移行が観察された。EDLでは、絶対筋重量の減少は認められたが、筋線維横断面積や筋線維タイプへの影響は観察されなかった。ギプス固定群のSolにおけるnNOSタンパク質発現量はCON群と比較して有意に減少していたが、EDLでは変化が認められなかった。nNOSのアンカーとなる細胞膜タンパク質の一つであるCaveolin3発現はSolとEDLでギプス固定により変化しなかった。タンパク質の結果と同様に、nNOS遺伝子発現は、IM群のSolにおいてのみ顕著な減少が認められた。SolにおけるnNOS DNAメチル化レベルは、ギプス固定により有意に増加し、一方でEDLでは減少する傾向が認められた(図3)。Solでは、nNOS遺伝子発現量とDNAメチル化レベルとの間に負の相関関係が認められた($p < 0.05$, $r = -0.54$)。

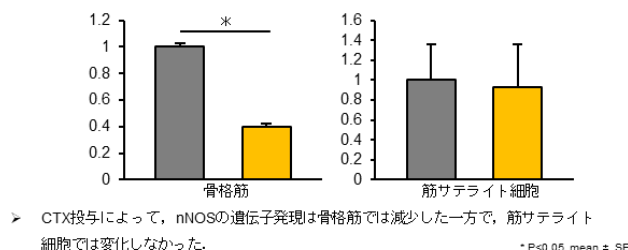


図2 損傷筋および筋サテライト細胞におけるnNOS発現

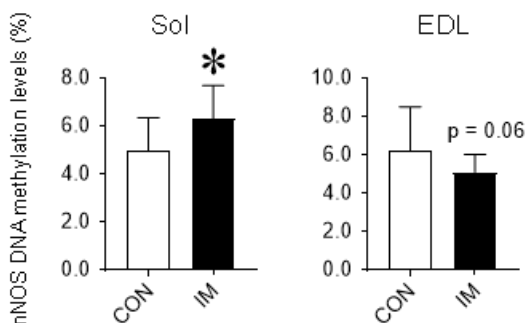


図3 ギプス固定(IM)による筋nNOSのDNAメチル化

<研究3>

高脂肪食摂取群では、介入2週間後および6週間後において体重の増加が認められた($p < 0.01$)。同様に、腸間膜から採取した内臓脂肪量も顕著に増加しており($p < 0.01$)、2、6週間の高脂肪食摂取により肥満状態を呈していることが示唆された。これらのマウスの骨格筋において、ミトコンドリアのマーカーであるクエン酸シンターゼ活性は、2週間の介入では変化がなかったが、6週間の高脂肪食摂取に

より上昇していた ($p < 0.05$)。一方で、骨格筋グリコーゲン量については、2週間および6週間の高脂肪食摂取の影響は認められなかった。また、骨格筋における nNOS DNA メチル化レベルは、2週間および6週間の高脂肪食摂取において変化しなかった (図4)。現在、12週間の介入後のサンプル分析および筋サテライト細胞の解析を継続して進めている。

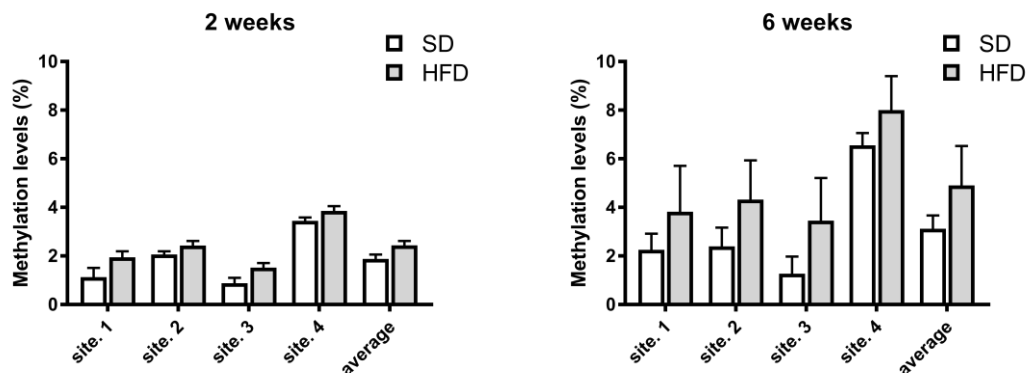


図4. 高脂肪食(HFD)介入後 (2週間, 6週間) の骨格筋における nNOS の DNA メチル化

尚、本研究は、畠中真奈氏 (現国立健康・栄養研究所)、富賀裕貴氏 (日本学術振興会特別研究員、佐賀大学)、伊藤愛氏、吉村咲紀氏、中島志穂子氏との共同により行われました。ここに謝意を表します。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomiga Yuki, Ito Ai, Sudo Mizuki, Ando Soichi, Eshima Hiroaki, Sakai Kazuya, Nakashima Shihoko, Uehara Yoshinari, Tanaka Hiroaki, Soejima Hidenobu, Higaki Yasuki	4. 巻 597
2. 論文標題 One week, but not 12 hours, of cast immobilization alters promotor DNA methylation patterns in the nNOS gene in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5145 ~ 5159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP277019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 富賀裕貴、檜垣靖樹	4. 巻 70(12)
2. 論文標題 エビジェネティクスに着目した身体不活動による骨格筋萎縮の分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 853-858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 畠中真奈、富賀裕貴、北嶋康雄、中島志穂子、上原吉就、檜垣靖樹
2. 発表標題 損傷筋由来の筋サテライト細胞におけるnNOSの発現
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠中真奈、富賀裕貴、北嶋康雄、中島志穂子、上原吉就、田中宏暁、檜垣靖樹
2. 発表標題 骨格筋および筋サテライト細胞におけるnNOS遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hatanaka M, Tomiga Y, Kitajima Y, Nakashima S, Tanaka H, Uehara Y, Higaki Y
2. 発表標題 nNOS gene expression and DNA methylation in muscle satellite cells
3. 学会等名 7th PNU and FU annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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	兼岡 秀俊 (Kaneoka Hidetoshi) (20161169)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	北嶋 康雄 (Kitajima Yasuo) (70734416)	熊本大学・発生医学研究所・助教 (17401)	
研究分担者	安野 哲彦 (Yasuno Tetsuhiko) (80551994)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

	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
研究協力者	富賀 裕貴 (Tomiga Yuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	畠中 真奈 (Hatanaka Mana)		
研究協力者	伊藤 愛 (Ito Ai)		
研究協力者	吉村 咲紀 (Yoshimura Saki)		
研究協力者	中島 志穂子 (Nakashima Shihoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関