

令和 3 年 7 月 9 日現在

機関番号：13903

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0192

研究課題名（和文）mTORC2/c-Myc経路を介した新たな骨格筋運動適応メカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of mTORC2/c-Myc pathway in exercise-induced skeletal muscle adaptation

研究代表者

小笠原 理紀 (Ogasawara, Riki)

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：10634602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,300,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、レジスタンス運動のような高強度筋収縮によってc-MycがmTORC2を介して増加することを明らかにした。また、c-Mycの増加はリボソーム生合成を高めること、筋タンパク質合成を増加させることを明らかにした。さらに、c-Mycの増加は糖輸送体や解糖系酵素、ミトコンドリア関連タンパク質といったエネルギー代謝に関わるタンパク質も増加させた。c-Mycは持久性運動では大きく変化しないことから、c-Mycはレジスタンス運動に特異的なタンパク質同化作用やエネルギー代謝改善効果に関与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジスタンス運動は筋肥大や筋力増強効果があることがよく知られているが、持久性運動のようなエネルギー代謝改善効果も観察される。本研究ではc-Mycがレジスタンス運動によるタンパク質同化作用に関わることに加え、エネルギー代謝改善にも関わることを明らかにした。c-Mycの増加はレジスタンス運動に特徴的な変化であり、持久性運動では大きく変化しない。したがって、c-Mycの増加はレジスタンス運動特異的な新規のエネルギー代謝改善メカニズムであると考えられる。今後その調節メカニズム等を詳細に解析することで、運動や栄養介入効果の最適化に貢献する魅力的な分子ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that c-Myc was increased by resistance exercise via mTORC2. In addition, we found that c-Myc increased ribosome biogenesis and muscle protein synthesis, and that c-Myc also increased proteins involved in energy metabolism, such as glucose transporters, glycolytic enzymes, and mitochondria-related proteins. c-Myc did not change significantly by endurance exercise, suggesting that c-Myc may be involved in protein anabolism and energy metabolism improvement specific to resistance exercise.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：筋収縮 mTOR リボソーム タンパク質合成 解糖系 エネルギー代謝 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

大規模な疫学研究によって、骨格筋量・機能の低下は多くの生活習慣病罹患率、死亡率、認知機能低下率を上昇させ、寿命を短くする独立した因子であるとのエビデンスが蓄積されてきている。運動は、その効果として血糖値の改善、体脂肪の減少、骨格筋量の増加、認知機能の向上など幅広く知られており、“運動は万能薬”などと言われている。しかし、骨格筋量を増加させることができる運動は高強度筋収縮を伴うレジスタンス運動 (RE) のみである。持久性運動 (EE) では筋肥大は生じない。RE 効果の恩恵を受けるとされる高齢者などでは RE の実施自体が難しいことも多く、近年は RE 効果を模倣する食品や医薬品開発へのニーズが高まっている。そのためには骨格筋がいかんして運動による様々な刺激を読み取り、刺激に応じた適応を生み出すのか理解する必要があるが、近年まで RE に関する理解は非常に限定的であった。その主な理由は、EE にはトレッドミルなどの動物モデルが存在したのに対し、RE には適切な動物モデルがなかったためである。そのような状況下、我々はヒトに類似した骨格筋適応が生じる動物 RE モデルを確立し、RE による筋タンパク質合成 (MPS) 増加・筋肥大メカニズムについて mechanistic target of rapamycin (mTOR) に注目して解析を進めた。

mTOR は、その名の通り免疫抑制剤ラパマイシン (RAPA) の標的分子として同定されたもので、生体内では 2 種類のタンパク質複合体 (mTORC1 と mTORC2) を形成して存在している。このうち mTORC1 のみ RAPA に感受性を示す (厳密には RAPA は mTORC1 の全機能を抑制できないが、ここでは感受性があるものを mTORC1、ないものを mTORC2 とする)。近年まで 10 年以上にわたって RE による MPS 増加はアミノ酸などと同様に RAPA で抑制できる mTORC1 依存的なプロセスであると考えられてきた。しかし、我々は RE による MPS 増加と筋肥大は RAPA では完全に抑制できないことを見出した (Ogasawara et al. Sci Rep 2016)。つぎに、mTOR 機能を完全に抑制したところ (mTORC1 も mTORC2 も抑制)、RE による MPS 増加は完全に抑制され、RAPA 非感受性 mTOR が MPS 調節に関わることを報告した (Ogasawara and Suginothara. FASEB J 2018)。我々は安静時における MPS や骨格筋量の維持においても RAPA 感受性 mTOR の貢献が少ないことを見出しているが (Ogasawara et al. Sci Rep 2016)、アミノ酸を繰り返し飲んで筋肥大しないことや、不活動による筋萎縮に対するアミノ酸投与の効果が極めて限定的であることなどの知見も合わせると、ラパマイシン非感受性 mTOR (mTORC2) が骨格筋量調節において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

mTORC2 の骨格筋における役割についてはあまり知られていなかったが、下流因子として全遺伝子の約 15% のプロモーター領域に結合して遺伝子発現を大規模に調節し、タンパク質合成を正に制御する転写因子 c-Myc が知られていた。c-Myc の発現量はアミノ酸や持久性運動では変化しないが、RE によって増加する (Ogasawara et al. Sci Rep 2016)。しかし、骨格筋における c-Myc の役割はほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

1. 筋収縮による MPS 亢進における mTORC2 の役割について明らかにすること。
2. 筋収縮による c-Myc の増加に mTORC2 が関与するか否か明らかにすること。
3. c-Myc の発現量増加が MPS 増加に及ぼす影響について明らかにすること。
4. c-Myc の発現量増加がエネルギー代謝関連酵素の発現に及ぼす影響について明らかにすること。
5. c-Myc の発現量増加が筋収縮による遺伝子発現の変動に及ぼす影響について明らかにすること。

であり、以上から骨格筋の運動適応における mTORC2/c-Myc 経路の役割を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

【実験 1】

若齢の野生型 (WT) と骨格筋特異的 Rictor 欠損 (mTORC2 抑制, KO) マウスを対象とし、それぞれ麻酔下で電気刺激 (100 Hz, ~30 V) によりレジスタンス運動を模した筋収縮を誘発した。筋収縮 1 時間前に RAPA (1.5 mg/kg) もしくはその溶媒を腹腔内に投与し (RAPA もしくは RAPA⁺)、筋収縮 3 時間後に腓腹筋を採取した。

【実験 2】

若齢の C57BL/6J マウスを対象とし、左脚の下腿三頭筋にコントロール AAV6 ベクター (AAV6-CON)、右足の下腿三頭筋に c-Myc 発現 AAV6 ベクター (AAV6-c-Myc) を投与した。投与から 2 週間後に絶食介入もしくは筋収縮介入 (筋収縮は実験 1 と同様) を行い、腓腹筋を採取した。

【実験 3】

若齢の C57BL/6J マウスを対象とし、実験 2 と同様、左脚の下腿三頭筋にコントロール AAV6 ベクター (AAV6-CON)、右足の下腿三頭筋に c-Myc 発現 AAV6 ベクター (AAV6-c-Myc) を投与した。投与 4 週間後に 3 時間の絶食条件下でインスリンもしくは PBS を腹腔内に投与し、その 30 分後に腓腹筋を採取した。

4. 研究成果

【実験 1】

WT と KO マウスで体重、腓腹筋重量、筋線維組成の違いは観察されなかった。

MPS は、KO-RAPA⁻ マウスでは WT-RAPA⁻ マウスと同程度、筋収縮によって増加した(図 1)。

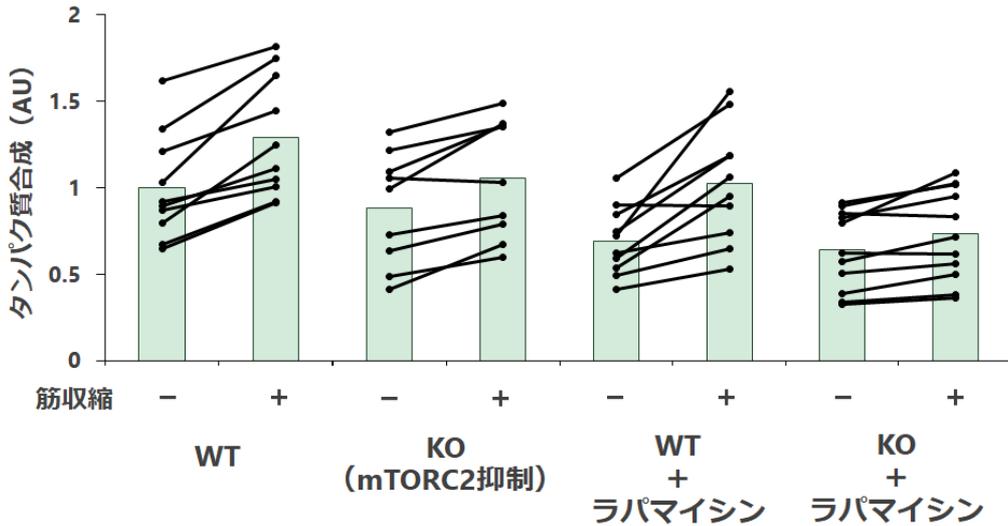


図 1 筋収縮による筋タンパク質合成の変化

したがって、仮説とは異なり mTORC2 は単独では MPS や骨格筋量調節の役割は小さいと考えられた。一方、WT-RAPA⁻ マウスと比べ WT-RAPA⁺ マウスでは MPS 亢進に差がなかったが、KO-RAPA⁺ マウスでは筋収縮によって MPS がわずかに亢進したものの増加が抑制された。骨格筋特異的 Raptor 欠損 (mTORC1 抑制) マウスでは筋収縮による MPS が抑制されない一方で (You et al. FASEB J 2019), ATP 競合性 mTOR 阻害剤 (mTORC1 と mTORC2 の両方を抑制) では筋収縮による MPS 亢進が抑制されることから (Ogasawara and Suginoahara, FASEB J 2018), mTORC1 と mTORC2 は協調的に MPS を制御している可能性が考えられた。

mTORC2 抑制マウスでは安静時および筋収縮後の c-Myc 発現量が WT マウスと比べ低値であった (図 2)。したがって、骨格筋においても mTORC2 が c-Myc の一つの上流因子であることがわかった。

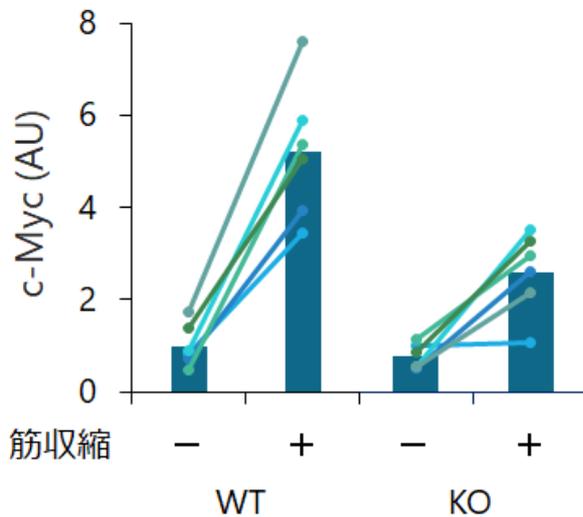


図 2 筋収縮による c-Myc タンパク質の変化

【実験 2】

c-Myc の過剰発現によってリボソーム RNA (rRNA) 前駆体, rRNA, 筋タンパク質合成が増加した (図 3). RNA-Seq によって遺伝子発現を網羅的に調べたところ, c-Myc によって有意に変動した遺伝子は同定数 17871 に対して 16 と少なかったものの, GO 解析ではリボソーム生合成に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた.

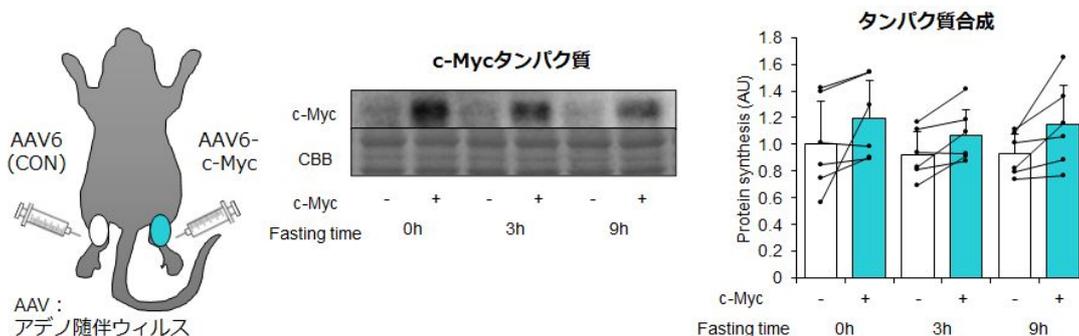


図 3 c-Myc の過剰発現による筋タンパク質合成の変化

c-Myc の過剰発現は筋収縮によって変化する遺伝子数を増加させた (133 170). 一方, 筋収縮による MPS 亢進は抑制された. これは安静時の MPS が c-Myc 過剰発現によって増加していたためであると考えているが, 今後詳細な検討が必要である.

【実験 3】

実験 2 において, c-Myc の過剰発現によって MPS が増加したことから, より長期間の過剰発現によって骨格筋量が増加すると考えた. しかし, 4 週間の c-Myc 過剰発現は腓腹筋重量を減少させた. 4 週間の時点においても MPS は亢進していたことから筋タンパク質分解が亢進していた可能性を考え, タンパク質分解に関わるユビキチンプロテアソーム系, オートファジー系について検討したが, 大きな変化は観察されなかった. c-Myc は糖代謝も制御することが知られていることから, 糖輸送体や解糖系酵素について測定したところ, GLUT1 や HK2 が増加していた. 一方, 筋グリコーゲンは低下していた. したがって, 筋重量の低下は筋グリコーゲンの低下によって水分量が低下したためである可能性が考えられた.

筋収縮とは異なり, インスリン投与は c-Myc 過剰発現による MPS 亢進をさらに加算的に増加させた. したがって, c-Myc 過剰発現によって MPS は頭打ちになっておらず, 実験 2 において筋収縮によって加算的な MPS 増加が観察されなかったのはそれ以外の要因が関与していたと考えられる.

以上から,

- 1) 筋収縮は骨格筋において mTORC2/c-Myc 経路を活性化する
- 2) 筋収縮による mTORC2 の活性化は急性の筋タンパク質合成亢進には関与しない
- 3) c-Myc の増加はリボソーム生合成の増加を介して安静時の筋タンパク質合成を増加させる
- 4) c-Myc の増加はリボソーム生合成だけでなく, エネルギー代謝に関連するタンパク質も増加させる

ことが明らかとなった.

本研究では, これまでレジスタンス運動によって増加することからリボソーム生合成の主要なメカニズムであると考えられてきものの, その骨格筋における役割については不明であった c-Myc について, 初めてダイレクトに役割について解明することに成功した. また, リボソーム生合成だけでなく, 糖輸送体や解糖系酵素, ミトコンドリア関連タンパク質の増加も観察された. c-Myc は持久性運動では大きく増加しないことから, レジスタンス運動に特異的なエネルギー代謝改善メカニズムである可能性も考えられる. 筋収縮による骨格筋適応における c-Myc の役割解明にはより多角的なアプローチが必要であり, 今後さらなる研究が必要であるが, 非常に重要な経路である可能性が高い.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogasawara R, Jensen TE, Goodman CA, Hornberger TA	4. 巻 47
2. 論文標題 Resistance Exercise-Induced Hypertrophy: A Potential Role for Rapamycin-Insensitive mTOR.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exercise and sport sciences reviews	6. 最初と最後の頁 188-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1249/JES.0000000000000189	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ogasawara R, Knudsen JR, Li J, Ato S, Jensen TE	4. 巻 598
2. 論文標題 Rapamycin and mTORC2 inhibition synergistically reduce contraction-stimulated muscle protein synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5453-5466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP280528	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Mori T, Ato S, Knudsen JR, Henriquez-Olguin C, Li Z, Wakabayashi K, Suginochara T, Higashida K, Tamura Y, Nakazato K, Jensen TE, Ogasawara R	4. 巻 -
2. 論文標題 c-Myc Overexpression Increases Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Independent of mTORC1 Activation in Mouse Skeletal Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-124889/v1	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 峰広、小笠原 理紀
2. 発表標題 c-Mycの過剰発現が筋収縮による筋タンパク質同化作用に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原 理紀
2. 発表標題 骨格筋の運動適応におけるmTORC2/c-Myc経路の役割
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://muscle.web.nitech.ac.jp/
--

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	イェンセン トーマス (Jensen Thomas)	コペンハーゲン大学・Section of Molecular Physiology・Associate Professor	

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			
デンマーク	University of Copenhagen			