

令和 5 年 10 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15130

研究課題名(和文)サルコメア合成機構の解明に基づいた新規的筋萎縮治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for muscle atrophy based on the elucidation of the mechanism of sarcomere synthesis.

研究代表者

林地 のぞみ(Hayashiji, Nozomi)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：80772433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サルコメアとは骨格筋を構成する最小の収縮器官である。栄養状態や運動負荷に合わせてサルコメアの合成と分解を行うことで骨格筋量を随時調整している。本研究はサルコメアの合成機構を解明し、筋量の増加を促進する分子を同定することを目標とした。本研究は顆粒球コロニー刺激因子の欠損がサルコメア構造の不安定化および合成抵抗性を示すことに着目し、サルコメアの安定化に関与する因子として糖鎖合成酵素Fucosyltransferase 8 (Fut8)を見出した。さらに、FUT8の機能を増強する因子としてL-fucoseを同定しin vitro及びin vivo両方において有効であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は、運動機能としての役割だけでなく代謝や恒常性の維持など生存に重要な様々な機能を担っている。近年、骨格筋量は健康寿命やがんの予後などに正の相関にあり、骨格筋量そのものを保つことが重要であることが相次いで報告された(BMJ 2008; BMJ 2012)。しかし、骨格筋量を規定する機構は十分に解明されておらず、現在のところアミノ酸・タンパク質の摂取や運動療法以外有効な因子の特定には至っていない。以上のことから、骨格筋量を規定する因子を明らかとする本研究は、学術的のみならず社会的意義においても非常に重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：Sarcomeres are the smallest contractile organs of skeletal muscle. Skeletal muscle mass is regulated from time to time by the synthesis and degradation of sarcomeres in response to nutritional status and exercise load. The aim of this study was to elucidate the mechanism of sarcomere synthesis and to identify molecules that promote muscle mass gain. This study focused on the fact that granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) deficiency leads to sarcomere structural instability and synthesis resistance, and found the glycosyltransferase Fucosyltransferase 8 (Fut8) as a factor involved in sarcomere stabilisation. Furthermore, L-fucose was identified as a factor that enhances the function of FUT8 and was found to be effective both in vitro and in vivo.

研究分野：骨格筋再生

キーワード：サルコメア 顆粒球コロニー刺激因子 糖鎖修飾 糖鎖合成酵素 Fucosyltransferase 8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコメアとは、骨格筋を構成する最小の収縮器官であり、環境に合わせてサルコメアを合成・分解させることで骨格筋量が最適となるよう常に調整している。重症の糖尿病、心臓病、末期のエイズ、ガン、長期の安静状態により生じる廃用萎縮症候群といった疾患では、分解系経路の過剰な活性化により急激な筋萎縮が進行することから、分子機構の詳細がわかってきた。一方、合成機構については適切なモデルが存在しないため、その実体は不明なままである。申請者は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体欠損マウスが成体のサルコメア合成抵抗性を示すことを世界に先駆けて見出し(Hayashiji N *et al.*, *Nat communi.* 2015)、G-CSF シグナルの下流にサルコメア合成に関与する経路の存在を提示した。そこで、本研究では、合成抵抗性モデルを用いてサルコメア合成経路に関する遺伝子・分子を同定し、合成機構を解明することを目的とする。さらに「サルコメア合成・促進機構」に作用する化合物を同定することで、筋萎縮に関連する疾患の新規治療法の開発に繋げることを目標とする。

2. 研究の目的

本研究はサルコメアの合成機構を明らかとすることを目標とする。具体的には1) G-CSFR KOマウスのサルコメア合成抵抗性マウスの樹立と解析、2) サルコメア合成のメカニズムを解明、3) サルコメア合成を促進する低分子化合物を同定、4) 筋萎縮モデルマウスにサルコメア合成促進剤を投与し有効性を検証することである。これら成果は、従来サルコメアの過剰な分解に対しては、サルコメア分解抑制(Nakao R *et al.* *Mol Cell Biol.* 2009)、もしくは筋量を増加させるが副作用の強い蛋白同化ホルモンによる治療研究が主流であるのに対し、本研究の独自性は、合成促進剤によってサルコメア合成を促進させ、筋萎縮を改善する新たなアプローチである。なお、本研究による合成機構の解明は「サルコメア合成・促進機構」という新しい課題を突破し、当該専門分野の発展に寄与する研究である。サルコメアの合成は骨格筋の再生・促進のみならず、生体における生理的肥大に必要不可欠であり、その応用は幅広い。さらに、合成促進剤が同定できれば、ヒトにおいて重症の糖尿病、心臓病、末期のエイズ、がん、筋ジストロフィーといった重篤な筋萎縮を呈する治療法の確立されていない疾患の新しい治療法開発への波及効果が期待される。

3. 研究の方法

1. G-CSFR KOマウスのサルコメア合成抵抗性モデルの樹立と解析

サルコメアの構造に異常をきたすモデルは多数存在するが、その多くが発生段階から異常がおこる。発生期と成体ではサルコメアの合成機構が異なることが知られており、成体特異的に異常がおこるモデルはない。この問題が、成体でのサルコメア合成解明の障壁である。成体の G-CSFR KO マウスはサルコメアの新規合成ができないこと、またサルコメア構造を維持できず筋原線維が断裂する等、サルコメア合成抵抗性を示すことから G-CSF 受容体欠損マウスを用いて解析を行う。

2. サルコメア合成に関与する遺伝子やシグナル経路の解明

現在までに、申請者は G-CSF 受容体が、サルコメアの Z line 上の筋膜特異的に発現することを既に特定している。Z line 上の筋膜にはラミニン、インテグリンファミリーといった筋線維と細胞外マトリックスを繋ぎ、サルコメアの構造維持とシグナル伝達を担う重要なタンパクが

多数発現している。G-CSF 受容体がこれらタンパクに直接作用しているのかどうか、実験 1) で得られた責任遺伝子を中心に、サルコメア合成に必要な遺伝子や分子を未知遺伝子・タンパクの機能同定や遺伝子・タンパク間の相互作用を解析できるポストシーケンス解析により同定する。得られた候補遺伝子や分子は *in vitro* において gain of function、loss of function の両面から検証することで、サルコメア合成機構の解明を試みる。

3. ゼブラフィッシュを用いた *fut8a* の筋発生の作用機序

2 で同定した糖鎖合成酵素 *Fucosyltransferase(Fut8)* は骨格筋での機能が全くの未知の分子である。そこで、筋発生のモデルとして広く使用されるゼブラフィッシュを用いて *fut8a* の機能の解析を試みる。

4 . 研究成果

顆粒球コロニー刺激因子がサルコメアを合成に関する下流のシグナルの因子として *Fut8* の同定に成功し、その詳細の検討を行った。*Fut8* は脳・神経や癌領域で研究されているが骨格筋に対しては全くの未知である。そこで最初に、ゼブラフィッシュとモルフォリノを用いて *fut8a* の筋発生成に与える影響の解明を試みた。

モルフォリノで *fut8a* の発現を低下させると、1.5 ng と低濃度で体躯の小型化、脊椎が彎曲などの表現型が現れた。また、濃度依存的に孵化できずに死亡する個体が増加しモルフォリノを 12 ng 注入した個体は全て孵化することなく死亡した。形態に表現型が現れた個体を免疫化学染色により解析を行うと、ミオシン重鎖やジストログリカンといった細胞外マトリックスに発現するタンパク質に構造異常が認められた。また、マイオセプタとよばれる哺乳類の腱に相当する器官に複数の断裂が認められるなど筋組織の発生成に異常が起こった。電子顕微鏡でモルフォリノを投与した個体のサルコメアを観察すると、マイオセプタに結合したサルコメアが少なく構造も著しく乱れていた。以上のことから、*Fut8* は骨格筋のサルコメア合成に必要な因子であることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Hayashiji Nozomi, Kawahara Genri, Xu Xing, Fukuda Tomohiko, Kerever Aurelien, Gu Jianguo, Hayashi Yukiko K., Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 12
2. 論文標題 -1,6-Fucosyltransferase Is Essential for Myogenesis in Zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 144 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12010144	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 骨格筋における糖鎖修飾因子fut8が細胞外マトリックスに与える影響
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた 1.6フコース転移酵素fut8欠損筋の形態学的解析
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 糖鎖修飾因子が筋発生および筋再生に与える影響
3. 学会等名 日本体力医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 糖鎖修飾における筋再生および筋発生
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashiji Nozomi
2. 発表標題 Expression of Granulocyte -Colony Stimulating Factor Receptor in Sarcoma and its Action
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 サルコミアにおける顆粒球コロニー刺激因子受容体の発現とその作用
3. 学会等名 第5回日本筋学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 筋疾患におけるメカノトランスダクション機構の解明、令和元年度筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発(29-4)
3. 学会等名 西野班 班会議
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 -骨格筋再生研究の新展開-Granulocyte colony stimulating factor and new development in muscle regeneration
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 林地 のぞみ
2. 発表標題 サルコミアにおける顆粒球コロニー刺激因子受容体の機能
3. 学会等名 筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林地 のぞみ	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 410
3. 書名 precision Medicine	

〔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

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1件

国際研究集会 Gordon Research	開催年 2019年～2019年
---------------------------	--------------------

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
---------	---------