

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09611

研究課題名(和文) 亜鉛シグナルを標的とした筋萎縮および骨粗鬆症に対する新たな予防・治療法の確立

研究課題名(英文) Targeting zinc signaling as a novel therapeutic strategy for muscle wasting and osteoporosis

研究代表者

田村 行識 (Tamura, Yukinori)

神戸学院大学・栄養学部・講師

研究者番号：40580262

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)：本研究では、糖尿病に伴う筋萎縮と骨粗鬆症に対する亜鉛シグナルの役割を検討した。糖尿病マウスの筋組織では、亜鉛トランスポーターZip9, Zip13, ZnT6の発現が低下しており、これらの機能を *in vitro* で解析した結果、これらの亜鉛トランスポーターの減少が筋分解系の亢進に寄与することが明らかとなった。また、糖尿病マウスの骨組織では、Zip6の発現が減少しており、*in vitro* での検討の結果、骨芽細胞におけるZip6の減少は骨分化を障害することが明らかとなった。本研究結果から、亜鉛トランスポーターの発現変化を介した亜鉛シグナル障害が、糖尿病に伴う筋骨格系障害に関与す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

健康寿命を延伸するためには筋と骨の機能維持は不可欠である。近年、糖尿病に伴う筋萎縮および骨粗鬆症が注目されているがその病態機序は不明な部分が多い。本研究では、亜鉛トランスポーターの発現変化に伴う亜鉛シグナル障害が、糖尿病に伴う筋と骨の異常に関与することを証明した。また、本研究において亜鉛投与が亜鉛トランスポーターの発現変化の改善を介して、筋量と骨量を改善することを見出している。本研究結果は、糖尿病に伴う筋骨格系障害の新たな病態機序を提供する知見であり、亜鉛シグナルを標的とした本病態の新たな予防・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of intracellular zinc signaling in muscle atrophy and osteoporosis induced by diabetes in mice. We found that the expression of several zinc transporters such as Zip9, Zip13 and ZnT6 (located on Golgi apparatus) were decreased in muscle of diabetic mice. *In vitro* study revealed that knockdown of these transporters activates ubiquitin proteasome system and autophagy in C2C12 myotubes, leading to muscle protein degradation. Moreover, we also found that the expression of Zip6 (located on cellular membrane) was decreased in tibia of diabetic mice, and that knockdown of Zip6 impaired osteogenic differentiation in osteoblasts. These findings suggest that impaired zinc signaling due to altered zinc transporter expression is involved in the pathogenesis of musculoskeletal disorders induced by diabetes.

研究分野：分子生物学、病態生化学

キーワード：糖尿病 グルココルチコイド 筋萎縮 骨粗鬆症 亜鉛トランスポーター 亜鉛シグナル 筋-骨連携

## 1. 研究開始当初の背景

筋肉と骨の機能維持は、健康寿命の延伸のために必須である。しかしながら現代では、糖尿病病態などの生活習慣病、グルココルチコイド (GC) などの薬剤投与による副作用、過度な食事制限による栄養飢餓など、筋と骨の機能を同時に障害する危険因子が数多く存在し、その対策が急務となっている。

近年、筋と骨が運動器としての連携のみではなく、両臓器から分泌される液性因子を介して、相互に協調しながら筋量と骨量を維持する機構、すなわち筋-骨連携機構が存在することが報告されている。申請者は、糖尿病病態およびステロイド投与下における筋萎縮と骨粗鬆症において、筋-骨連携機構の破綻が関与することを示してきた (Diabetes 2015, Diabetes Int 2017, J Bone Miner Metab 2018)。しかし、筋-骨連携機構を標的とした筋骨格系の異常の予防・治療法については確立されていない。

亜鉛は、体内分布として 60%が筋に、30%が骨に含まれる生命活動に必須の微量栄養素で、様々な酵素の補因子などとして生理機能に関与している。近年、細胞膜や細胞内小器官に発現する亜鉛トランスポーターが、細胞内の亜鉛局在を精密に制御し、その発現変化が、アポトーシス、細胞分化、オートファジーなどを調節することが明らかとなっている。さらに、亜鉛は筋細胞の分化や骨芽細胞の骨分化を正に調節していることが知られており、その調節に関与する亜鉛トランスポーターが同定されつつある。

しかしながら、糖尿病病態および GC 投与下の筋肉と骨における亜鉛シグナルの変化と、その筋-骨連携機構の破綻に及ぼす影響については明らかではない。また、わが国の小児、若年者および高齢者を中心に体内の亜鉛が不足していることが推定されており、糖尿病病態や GC 投与下に、慢性的な亜鉛不足に伴う亜鉛シグナル異常が加わる可能性も高い。このような背景から、糖尿病病態および GC 投与下の筋と骨の異常および筋-骨連携機構の破綻における亜鉛シグナルの役割を解明することは重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、①糖尿病および GC 投与に伴う筋萎縮および骨粗鬆症に亜鉛トランスポーターの発現変化を介した亜鉛シグナル障害が関与しているか？、②亜鉛投与によりこれらの筋萎縮あるいは骨粗鬆症が改善するか？、③糖尿病およびグルココルチコイド投与に伴う筋-骨連携の破綻に亜鉛シグナル障害が関与するか？の 3 点を明らかにすることを目的とし、マウスおよび培養細胞を用いて検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病モデルマウスの作製と経口亜鉛投与

C57BL/6 マウスを 7 週齢まで予備飼育した後、群間における体重差がないように 4 群 (コントロール群、亜鉛添加群、STZ 群、STZ+亜鉛添加食群) に分けた。STZ 群には STZ (200 mg/kg 体重) を腹腔投与し、投与 4 日後の血糖値が 300 mg/dL 以上であるものを糖尿病とみなした。その後、標準食または亜鉛添加食 (30 mg/100g diet) を 4 週間自由給餌させ、定量 CT 解析 (Latheta LCT-200 (日立製作所)) にて脛骨周囲筋肉量、脛骨の骨密度を測定後に解剖し、血液および各臓器の解析を行った。すべての動物実験は文部科学省・動物実験指針、および神戸学院大学の動物実験実施指針に従って行った。

### (2) 培養細胞を用いた検討

C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞株) は、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下において、10%ウシ胎児血清、ペニシリンストレプトマイシン (100 mg/ml) を含む DMEM 培地で培養した。筋管への分化は 2%ウマ血清を含む DMEM 培地にて行った。MC3T3E1 細胞 (マウス前骨芽細胞株) は 37°C 5%CO<sub>2</sub> 環境下において、10%ウシ胎児血清、ペニシリンストレプトマイシン (100 mg/ml) を含む DMEM 培地で培養した。control siRNA および各亜鉛トランスポーターの siRNA は Lipofectamine RNAi max を用いて細胞に導入した。C2C12 筋芽細胞および筋管細胞への GC 投与モデルとして、Dexamethason (Dex, 10<sup>-7</sup> M) 刺激を行った。

### (3) リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティング

マウス腓腹筋、脛骨および培養細胞から RNeasy mini-kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、LightCycler 96 システム (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム PCR 解析を行なった。また、それぞれの組織および培養細胞からタンパク質を抽出し、標的タンパク質の発現量をウェスタンブロッティング法にて解析した。

### (4) 統計解析

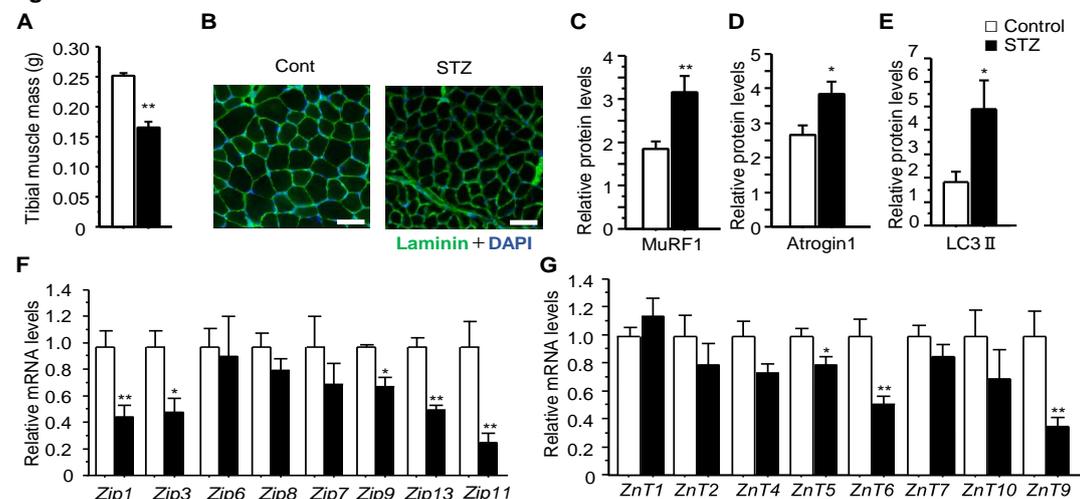
すべてのデータは平均値±標準誤差で表した。統計学的有意差検定には、対応のない student の t 検定および two-way ANOVA を用い、多重比較には Holm-sidak 検定を用いた。なお、p<0.05 を統計学的に有意とした。データの統計処理は、統計ソフト Graphpad Prism8.2.0 を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) STZ 誘導性糖尿病が筋量と亜鉛トランスポーター発現に及ぼす影響 (Fig.1)

STZ 誘導性糖尿病マウスでは、脛骨周囲筋肉量 (CT 解析) の減少および筋線維の萎縮 (腓腹筋の横断切片の解析) が観察され、ユビキチン-プロテアソーム系マーカー (Atrogin1、MuRF1) とオートファジーマーカー (LC3 II) の発現増加がみられた。筋組織における亜鉛トランスポーターの発現変化を検討した結果、細胞膜に局在する Zip1、Zip3、ゴルジ体に局在する ZnT6、Zip9、Zip13 の発現減少がみられた。

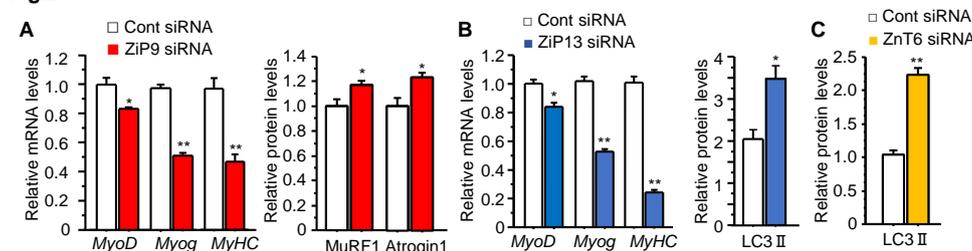
Fig.1



##### (2) C2C12 筋細胞における Zip9、Zip13、ZnT6 の発現抑制の影響 (Fig.2)

ゴルジ体に発現する亜鉛トランスポーターの変化に注目し、C2C12 筋芽細胞においてこれらの亜鉛トランスポーターをノックダウンし、筋管への分化およびタンパク質分解系への影響を検討した結果、Zip9 および Zip13 のノックダウンにより筋分化マーカー (MyoD、Myogenin、MyHC) の mRNA 量の著明な減少が認められた。また、ZnT6 および Zip13 のノックダウンによりオートファジーの亢進と、Zip9 のノックダウンにより、ユビキチン-プロテアソーム系マーカータンパク質の発現亢進がみられた。このことから、これらの亜鉛トランスポーターが筋分化および筋分解の調節に関与することが示唆された。

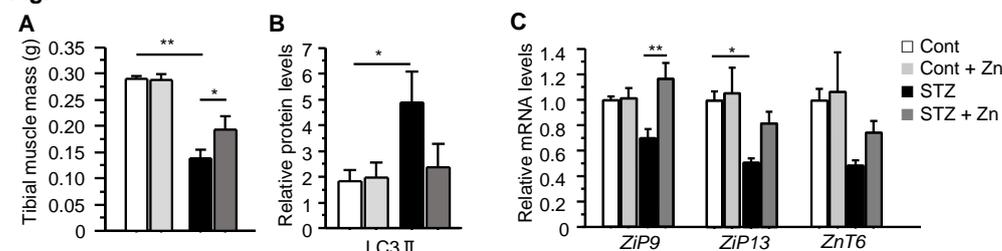
Fig.2



##### (3) 糖尿病性筋萎縮に対する経口亜鉛投与の効果 (Fig.3)

糖尿病マウスに亜鉛添加食を 4 週間摂取させたところ、オートファジーの抑制とともに筋量減少が抑制された。また、筋組織における亜鉛トランスポーター発現を検討した結果、ゴルジ体に局在する Zip9、Zip13、ZnT6 の糖尿病に伴う発現低下が改善される傾向がみられた。

Fig.3

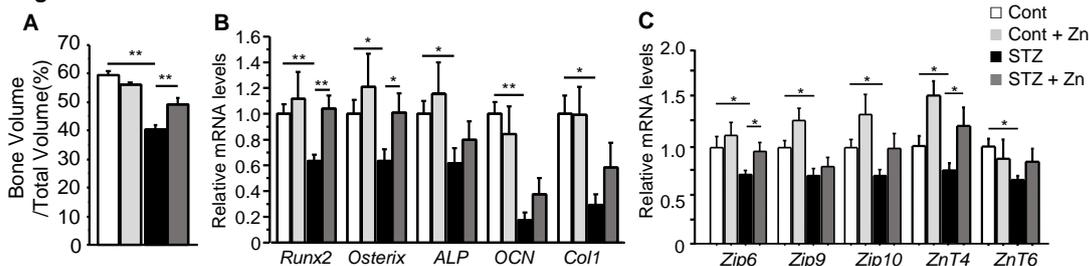


##### (4) STZ 誘導性糖尿病に伴う骨粗鬆症に対する経口亜鉛投与の効果 (Fig.4)

糖尿病マウスに亜鉛添加食を 4 週間摂取させた結果、脛骨における骨量減少 (CT 解析) が抑制された。また骨組織における骨分化マーカーを測定した結果、骨分化マーカーの Runx2、Osterix、Osteocalcin、Type1 Collagen の発現が改善および改善傾向を示した。次に、脛骨における亜鉛トランスポーターの mRNA 量の変化を網羅的に検討したところ、糖尿病に伴い、細胞膜に局在する Zip6、Zip10、ゴルジ体に局在する Zip9、ZnT6、エンドソーム・リソソームに

局在する ZnT4 の発現が減少し、亜鉛投与によって、Zip6 および ZnT4 の発現の改善がみられた。

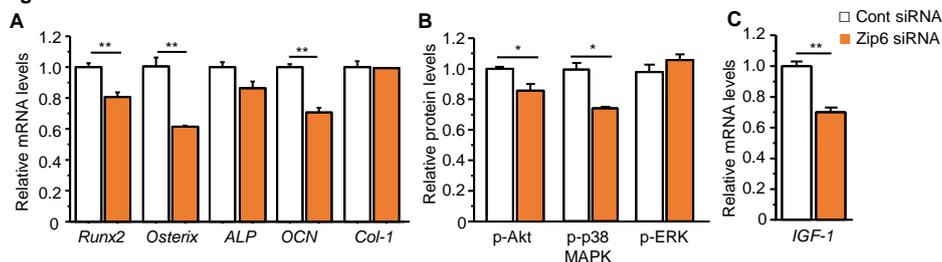
Fig.4



(5) MC3T3E1 骨芽細胞における Zip6 ノックダウンの影響 (Fig.5)

糖尿病マウスにおいて発現変化がみられた亜鉛トランスポーターのうち、Zip6 に着目し MC3T3E1 骨芽細胞におけるノックダウン実験を行った結果、Zip6 ノックダウンにより、Runx2, Osterix, Osteocalcin の発現低下がみられた。また、骨分化に関与する Akt および p38 MAPK のリン酸化の抑制と IGF-1 mRNA の発現低下も認められた。これらのことから Zip6 が骨芽細胞における骨分化を正に制御する亜鉛トランスポーターであることが示唆された。

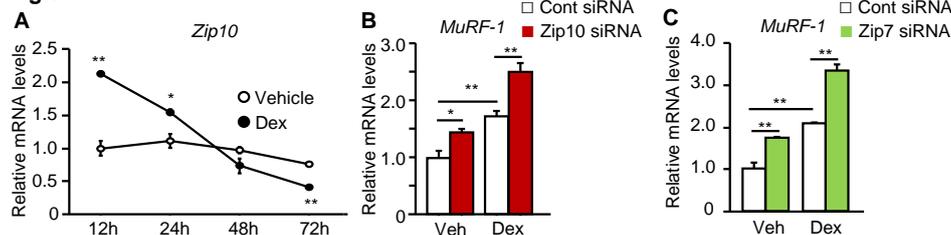
Fig.5



(6) GC 誘導性筋萎縮における亜鉛トランスポーター Zip10 および Zip7 の関与 (Fig.6)

C2C12 筋管細胞に合成 GC の Dex を処理した結果、細胞膜に局在する Zip10 の一過性の上昇がみられ、さらに時間経過とともに、著明な減少がみられた。さらに筋管細胞において Zip10 をノックダウンした結果、Dex による MuRF-1 mRNA の発現増加を増強した。これらのことから Zip10 が GC 投与に伴う筋分解系の亢進に対して防御的働いている可能性を見出した。また、小胞体に局在する Zip7 は、筋分化に関与する亜鉛トランスポーターとして報告されているが、GC による筋分解における役割は不明である。そこで、C2C12 筋管細胞における Zip7 のノックダウン実験を行い、筋分解系マーカーの変化を検討した。Zip7 ノックダウンにより、Dex による MuRF-1 の発現増加が増強された。また、Dex 処理によって筋管細胞における Zip7 の発現の減少が観察されたことから (data not shown)、GC 投与による筋タンパク質分解の亢進に Zip7 の減少が関与していることが示唆された。

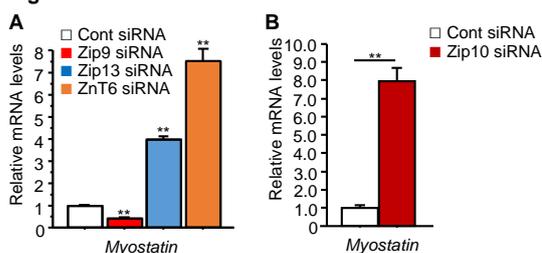
Fig.6



(7) 亜鉛トランスポーターの発現変化が筋-骨連携機構に与える影響 (Fig.7)

Myostatin は主に筋組織で産生・分泌される液性因子で、骨に作用して骨芽細胞の分化を抑制する筋由来骨形成抑制因子であることが知られている。そこで本研究において、筋管細胞における Myostatin の発現に対する Zip9, Zip13, ZnT6, Zip10 のノックダウンの影響を検討した結果、Zip13, ZnT6, Zip10 のノックダウンによって、Myostatin 発現の著明な増加がみられた。

Fig.7



総括

本研究において、糖尿病性筋萎縮および骨粗鬆症の病態機序に亜鉛トランスポーターの発現変化を介した亜鉛シグナル障害が関与することが示唆された。また、特定の亜鉛トランスポー

ターの発現抑制が、骨代謝を負に調節する Myostatin の発現増加をもたらす結果が得られたことから、筋肉における亜鉛シグナル障害が、糖尿病や GC 投与に伴う筋-骨連携機構の破綻に關与する可能性が考えられた。また、本研究において、亜鉛投与が糖尿病に伴う筋量減少と骨量減少を改善したことから、亜鉛補充は、亜鉛シグナル障害の改善を介して、筋と骨の異常を同時に改善することが可能な治療法として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yukinori Tamura	4. 巻 28
2. 論文標題 The Role of Zinc Homeostasis in the Prevention of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1109 ~ 1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17057	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 -

1. 著者名 Terumasa Ikeda, Hiroshi Kaji, Yukinori Tamura, Masao Akagi	4. 巻 24
2. 論文標題 Once-weekly teriparatide reduces serum sclerostin levels in postmenopausal women with osteoporosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 532-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.10.028.	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森本満里奈、田村行識
2. 発表標題 グルココルチコイド誘導性筋萎縮における亜鉛トランスポーターZip10の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuka Takeuchi, Marina Morimoto, Yoshinori Mizuno, Yoko Horikawa, Yukinori Tamura
2. 発表標題 Impaired zinc signaling is involved in muscle atrophy in type 1 diabetic mice
3. 学会等名 ASBMR 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内風香, 田村行識
2. 発表標題 骨格筋の亜鉛シグナル障害は1型糖尿病マウスにおける筋萎縮に関与する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshinori Mizuno, Fuka Takeuchi, Marina Morimoto, Yukinori Tamura
2. 発表標題 Role of impaired zinc signaling in the pathogenesis of diabetic osteoporosis in mice
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内風香, 森本満里奈, 水野善教, 濱田悠希, 堀川陽子, 佐々木康人, 田村行識
2. 発表標題 糖尿病性筋萎縮に対する亜鉛摂取の効果と亜鉛トランスポーターの関与
3. 学会等名 第20回亜鉛栄養治療研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内 風香, 森本 満里奈, 濱田 悠希, 水野 善教, 堀川 陽子, 佐々木 康人, 田村 行識
2. 発表標題 骨格筋における亜鉛トランスポーターZip9、Zip13の発現低下は糖尿病性筋萎縮に関与する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内風香、水野善教、瀧田悠希、森本満里奈、堀川陽子、佐々木康人、田村行識
2. 発表標題 糖尿病性筋萎縮の病態における亜鉛トランスポーターの役割
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 水野善教、武内風香、瀧田悠希、森本満里奈、堀川陽子、佐々木康人、田村行識
2. 発表標題 亜鉛摂取はストレプトゾトシン誘導性糖尿病マウスにおける骨粗鬆症を改善する
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 森本満里奈、武内風香、瀧田悠希、水野善教、堀川陽子、佐々木康人、田村行識
2. 発表標題 グルココルチコイド誘導性の筋萎縮における亜鉛トランスポーターの役割
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 瀧田悠希、武内風香、水野善教、森本満里奈、堀川陽子、佐々木康人、田村行識
2. 発表標題 慢性的な亜鉛不足が食事制限時の筋分解に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(1)Researchmap  
<https://researchmap.jp/ytamura>  
(2)神戸学院大学教員総覧  
<https://kenkyu-web.kobegakuin.ac.jp/Profiles/4/0000340/profile.html>

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
研究協力者	水谷 健一  (Mizutani Ken-Ichi)  (40469929)	神戸学院大学大学院・薬学研究科 幹細胞生物学研究室・特命教授   (34509)	
研究協力者	河尾 直之  (Kawao Naoyuki)  (70388510)	近畿大学・医学部 再生機能医学講座・講師   (34419)	

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