

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04079

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質Musashiが骨格筋の萎縮を防ぐ機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which the RNA-binding protein Musashi prevents skeletal muscle atrophy

研究代表者

古市 泰郎 (Furuichi, Yasuro)

東京都立大学・人間健康科学研究科・助教

研究者番号：40733035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞の運命決定因子であるRNA結合タンパク質Musashi2 (Msi2)が、骨格筋量を維持し、筋萎縮を予防する機序を解明することを目的とした。Msi2欠損マウスの骨格筋を解析したところ、Msi2の欠損によって筋は萎縮するだけでなく白色に変色し、筋力および糖代謝能力が低下していた。また、速筋でありながら遅筋の性質を持つType IIa線維がMsi2の欠損によって減少していた。さらに、RNAシーケンスと培養細胞を用いた実験によってMsi2が筋代謝に重要な遺伝子の発現を制御していることが示された。以上よりMsi2は骨格筋萎縮と代謝能力を制御する新規因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不活動や加齢による骨格筋の萎縮は、運動機能を低下させて、生活の質の低下を招く。高齢化社会が進む日本において、高齢者の骨格筋を健常に保つことは、労働力の確保や医療費の削減につながるため、最も重要な課題のひとつとされている。Musashi-2 (Msi2)が筋量や筋代謝能力の維持に必要な新規因子であるという発見は、筋萎縮の治療薬や効果的な運動プログラムの策定に応用される。特に、Msi2は運動によって増加するType IIa線維の量を制御することが示唆されたため、運動適応に必要な因子であると推察される。Msi2が制御する細胞内情報伝達機構の解明は、筋萎縮の予防と治療を実現させる新たな戦略につながる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism by which the cell fate determinant Musashi2 (Msi2), an RNA binding protein, maintains skeletal muscle mass and prevents muscle wasting. Analysis of skeletal muscles from Msi2-deficient mice revealed that the loss of Msi2 not only atrophied the muscles but also caused them to turn white, and impaired muscle strength and glucose metabolism. In addition, type IIa fibers, which have the characteristics of fast but slow muscle, were reduced in the Msi2-deficient mice. In addition, RNA sequencing and cell culture experiments showed that Msi2 regulates the expression of genes important for muscle metabolism. These results suggest that Msi2 is a novel regulator of skeletal muscle atrophy and metabolic capacity.

研究分野：運動生化学

キーワード：骨格筋 RNA結合タンパク質 筋線維タイプ 筋萎縮

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の萎縮は生活の質の低下に直結するため、その機序を解明して予防法を確立することが求められている。申請者はこれまで、筋萎縮の原因となる新規の遺伝子を発見するために、マウス骨格筋の網羅的スクリーニングを行ってきた。その結果、萎縮とともに発現量が減少する遺伝子として Musashi-2 (Msi2) に注目した。Musashi はもともとショウジョウバエの神経発生に必須の遺伝子として発見され、Musashi タンパク質は特定の mRNA に結合して遺伝子発現を翻訳レベルで調節する機能を持つことが明らかにされている。特に神経細胞やガン細胞では、細胞の増殖や分化を制御する細胞の運命決定因子として知られているが、骨格筋における Musashi の役割については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Msi2 は骨格筋において細胞の運命決定因子として、筋量の維持および筋代謝能力の維持に働くという仮説を検証することである。Msi2 が筋萎縮を予防する機序を明らかにすることによって、Msi2 が筋萎縮の治療標的となる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋における Msi2 の発現解析

BL6 マウスからヒラメ筋と長指伸筋 (EDL) を摘出し、ホモジナイズすることでタンパク質を抽出した。ウエスタンブロッティングによって Msi2 の発現量を比較した。また、下腿三頭筋の凍結切片を作製し、免疫染色によって Msi2 の局在を明らかにした。さらに連続切片上でミオシン重鎖 (MHC) アイソフォームを染色して筋線維タイプを同定することで、筋線維タイプによる Msi2 の発現量の比較をした。

(2) Msi2 欠損マウスにおける骨格筋および全身代謝能力の解析

Msi2 を欠損したマウス (KO マウス, 熊本大学 CARD) を入手し、野生型 (WT) マウスと比較した。下腿骨格筋に発現するタンパク質をウエスタンブロッティングで定量し、さらに免疫染色によって各筋線維タイプの細胞数を比較した。続いて、SDS-PAGE によって MHC アイソフォームを分離し、筋線維タイプの変化を検討した。

全身の糖代謝能力を評価するために、糖負荷試験を行った。また、摘出したヒラメ筋を *in vitro* の培養装置に装着し、インスリン刺激による糖の取り込み量を評価した。さらにヒラメ筋を縫合糸によって張力測定器に装着することで、電気刺激による筋の発揮張力を評価した。

(3) Msi2 過剰発現による変化

マウス骨格筋から Msi2 遺伝子をクローニングして、発現ベクターに組み込んだ。エレクトロポレーションによって WT マウスの前脛骨筋に遺伝子導入した。反対脚は Empty ベクターを発現させたコントロールとした。

4. 研究成果

(1) 骨格筋における Msi2 の発現

Msi2 は神経やガン細胞で強く発現していることは知られているものの、骨格筋に発現しているかどうかは不明であった。マウス脳と同様に EDL の組織をサンプルとしてウエスタンブロッティングで Msi2 の発現を検証したところ、EDL でも Msi2 のバンドが認められた。ただし、筋組織には筋細胞 (筋線維) 以外にも神経細胞や内皮細胞が含まれるため単一筋線維を単離したところ、ここでも Msi2 の発現が確認された。また速筋である EDL と遅筋であるヒラメ筋で発現量を比較すると、Msi2 はヒラメ筋で有意に多かった。

免疫染色によって下腿三頭筋の Msi2 の局在を可視化したところ、ヒラメ筋および腓腹筋の深層部で Msi2 の発現が観察された。連続切片で MHC アイソフォームを特異的に染色し、筋線維タイプを特定したところ、Msi2 は特に Type IIa 線維で強く発現していた。

(2) Msi2 欠損マウスの解析

Msi2 KO マウスの骨格筋を解析したところ、KO マウスのヒラメ筋は WT と比較して筋重量が有意に減少していた。免疫染色によってラミニンを染色し、筋線維サイズを定量したところ筋サイズが KO で低下していた。さらに(1)と同様の方法で MHC を染色し、筋線維タイプ別に細胞数を定量した。ヒラメ筋では WT と比較して KO マウスで総細胞数が減少していたが、Type I 線維と Type IIx 線維には変化がない一方で、Type IIa 線維が KO で少ないことが明らかとなった。MHC の電

気泳動によってアイソフォームを分離したところ、MHC 11a が K0 マウスで減少していた。Type 11a 線維は速筋でありながら、代謝能力に優れるタイプの筋線維であり、トレーニングによって増加する細胞として知られている。以上の結果から、Msi2 は Type 11a 線維の維持に寄与することが示された。

WT と K0 マウスの代謝能力を比較するため糖負荷試験を行ったところ、糖投与後の血糖値は K0の方が高く、糖の処理能力が低下していることが示された。しかしながら、単離骨格筋の糖の取り込み速度は WT と K0 マウスで変化が認められなかった。ただし、WT よりも K0 では筋重量が低下していたため、骨格筋組織あたりの糖の取り込み量は K0 が低いこととなり、それが全身の糖処理量を減少させていると推察された。また、単離骨格筋の発揮張力は K0 で有意に低下していた。

ウエスタンブロッティングによってヒラメ筋に発現するタンパク質を比較したところ、ミトコンドリアのマーカである COX IV および酸素結合タンパク質であるミオグロビンの発現量が K0 マウスで減少していた。

(3) Msi2 過剰発現

Msi2 の cDNA を WT マウスの前脛骨筋に注射し、エレクトロポレーションによって遺伝子導入した。2週間後に筋を摘出し、Empty ベクターを導入した対称脚と比較した。MHC 11a 量は Msi2 の発現増加によって変化が認められなかった。一方で、COX IV とミオグロビンのタンパク質発現量は Msi2 の過剰発現によって増加した。

以上の結果から、Msi2 は遅筋タイプの骨格筋に強く発現し、遅筋の筋量や代謝能力の恒常性に必須の分子であることが示唆された。Msi2 の欠損によって筋線維の数および筋サイズが減少するだけでなく、ミトコンドリアや呼吸に必要なタンパク質の発現量が減少することが明らかとなった。今後は、どのようなメカニズムで Msi2 が骨格筋細胞の性質を変化させているか、特に RNA 結合タンパク質として標的の遺伝子発現を制御する分子機序を解明する予定である。

筋量や筋質の維持は、健康的な生活を営む上で重要であることは広く認識されている。Msi2 による筋タイプや筋量、そして代謝能力の維持機構は、筋の適応や可塑性の研究で新たな道筋を立てる可能性がある。今後は本研究をさらに発展させることによって、より効果的な運動処方の提案や筋萎縮治療薬の開発などにつなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Furuichi Yasuro, Goto-Inoue Naoko, Uchida Saki, Masuda Shun, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 9
2. 論文標題 Stable isotope-labeled carnitine reveals its rapid transport into muscle cells and acetylation during contraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e15281 ~ e15281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e15281	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 Hamaguchi Hiroki, Dohi Kitora, Sakai Takaomi, Taoka Masato, Isobe Toshiaki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 639
2. 論文標題 PDGF-B secreted from skeletal muscle enhances myoblast proliferation and myotube maturation via activation of the PDGFR signaling cascade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.085	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 Matsuzaki Takahisa, Shimokawa Yuko, Koike Hiroyuki, Kimura Masaki, Kawano Yuma, Okuma Nao, Kawamura Ryuzo, Yoneyama Yosuke, Furuichi Yasuro, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Nakabayashi Seiichiro, Okamoto Satoshi, Nakauchi Hiromitsu, Taniguchi Hideki, Takebe Takanori, Yoshikawa Hiroshi Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Mechanical guidance of self-condensation patterns of differentiating progeny	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105109 ~ 105109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105109	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 Hamaguchi Hiroki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of a system evaluating the contractile force of electrically stimulated myotubes from wrinkles formed on elastic substrate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17548-7	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 Mita Yoshitaka, Zhu Haonan, Furuichi Yasuro, Hamaguchi Hiroki, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 12
2. 論文標題 R-spondin3 is a myokine that differentiates myoblasts to type I fibres	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16640-2	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 Mita Yoshitaka, Ito Miyuki, Yamada Mio, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko, Furuichi Yasuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of chronic muscle contraction on expression of contractile and metabolic proteins in mouse primary cultured myotubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.11.51	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 Goto-Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Kimura Keisuke, Mori Tsukasa, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging reveals local metabolic changes in skeletal muscle due to chronic training	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac037	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 Takakura Hisashi, Yamada Tatsuya, Furuichi Yasuro, Hashimoto Takeshi, Iwase Satoshi, Jue Thomas, Masuda Kazumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Muscle immobilization delays abrupt change in myoglobin saturation at onset of muscle contraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 87 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.11.87	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 Furuichi Yasuro, Kawabata Yuki, Aoki Miho, Mita Yoshitaka, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 64039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.640399	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 -

1. 著者名 Hoshino Daisuke, Kawata Kentaro, Kunida Katsuyuki, Hatano Atsushi, Yugi Katsuyuki, Wada Takumi, Fujii Masashi, Sano Takanori, Ito Yuki, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Suzuki Yutaka, Fujii Nobuharu L., Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 23
2. 論文標題 Trans-omic Analysis Reveals ROS-Dependent Pentose Phosphate Pathway Activation after High-Frequency Electrical Stimulation in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101558 ~ 101558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101558	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 Tamura Kotaro, Goto-Inoue Naoko, Miyata Kaede, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of treatment with conditioned media derived from C2C12 myotube on adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237095	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 Furuichi Yasuro, Furutani Ayana, Tamura Kotaro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 37
2. 論文標題 Lack of Musashi 2 induces type IIa fiber dominated muscle atrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e23154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202300563R	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 古市 泰郎 , 古谷 綾菜	4. 巻 49
2. 論文標題 骨格筋恒常性における Musashi の役割	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 43-45
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6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 身体活動・運動が骨格筋量を維持する機序 糖代謝との関係に注目して
3. 学会等名 第174回日本体力医学会関東地方会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市泰郎, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 糖濃度が筋幹細胞の増殖能力に与える影響
3. 学会等名 第77回日本体力医学会医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市泰郎, 三田佳貴, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋の「質」を制御するマイオカイン
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 筋幹細胞の増殖におけるグルコースの意義
3. 学会等名 日本筋学会第7回学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 RNA結合タンパクMusashiが骨格筋量の維持に果たす役割
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

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 青木美穂, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 高グルコースは骨格筋幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【研究発表】骨格筋の量と質を制御する新たなカギ因子を発見 効果的な運動トレーニングプログラムの確立や筋萎縮の治療薬の開発に期待 https://www.tmu.ac.jp/news/topics/35952.html</p>

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	眞鍋 康子 (Manabe Yasuko) (60467412)	東京都立大学・人間健康科学研究科・准教授 (22604)	

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