

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07845

研究課題名(和文) AM-RAMP2系の骨格筋制御機構の解明と、サルコペニア・フレイルへの応用展開

研究課題名(英文) Elucidation of the skeletal muscle regulatory mechanism of the AM-RAMP2 system and its application to sarcopenia and frailty.

研究代表者

河手 久香 (Kawate, Hisaka)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：20507503

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)：筋傷害薬カルジオトキシン(CTX)を用いた、マウス骨格筋萎縮、再生モデルを作成し、アドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパクであるRAMP2の、骨格筋とサルコペニアの病態における意義を検討した。

RAMP2ヘテロノックアウト(RAMP2^{+/-})マウスでは、野生型マウスと比較して、CTXの投与後、前脛骨筋における炎症の消退遅延、骨格筋の再生遅延が認められた。一方、野生型マウスにAMを外因性に持続投与すると、炎症が抑制され、筋断面積が大きくなった。これらの結果から、AM-RAMP2系が骨格筋の傷害に対して抑制的に働いてい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

超高齢化社会が進行する中で、高齢者の生活機能障害を予防し、QOLを維持することは喫緊の課題である。最近、サルコペニア・フレイルの様な新しい概念が提唱されたが、我々は、生体内の恒常性制御のメカニズムの解析を進め、その病態を解明することが重要であると考えた。

我々は生理活性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパクRAMP2による生体内の恒常性維持機構に注目してきた。AM、RAMP2は骨格筋にも豊富に存在するが、その機能や病態との関係は不明である。本研究ではAM-RAMP2システムのサルコペニア・フレイルにおける病態生理学的意義と治療応用の可能性を検証した。

研究成果の概要(英文)： We generated a mouse model of skeletal muscle atrophy and regeneration using the cardiotoxin (CTX) to investigate the significance of adrenomedullin (AM) and its receptor activity-modifying protein, RAMP2, in the pathogenesis of skeletal muscle and sarcopenia.

RAMP2 heterozygous knockout (RAMP2^{+/-}) mice showed delayed resolution of inflammation and delayed skeletal muscle regeneration in the tibialis anterior muscle after administration of CTX compared to wild-type mice. On the other hand, continuous administration of AM to wild-type mice suppressed inflammation and increased muscle cross-sectional area. These results indicate that the AM-RAMP2 system acts in an inhibitory manner against skeletal muscle injury.

研究分野：内科学一般

キーワード：骨格筋 サルコペニア アドレノメデュリン RAMP2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会が進行する中で、高齢者の生活機能障害を予防し、その自立性と生活の QOL を維持することは喫緊の課題である。こうした背景の中、サルコペニア・フレイルの様な新しい疾患概念が提唱された。サルコペニアの分子病態については不明点が多く、診断、治療のコンセンサスは十分には得られていない。さらに、骨格筋は体重の約 40% を占める、人体で最も大きな臓器・組織でもあり、全身の代謝にも直接関与している。サルコペニアは、エネルギー消費量減少、耐糖能低下、血糖値上昇によって、肥満・糖尿病などの他の全身性疾患の原因にもなる。我々は、サルコペニア・フレイルの新しい治療戦略のためには、生体内恒常性制御のメカニズムの包括的な解析を進め、病態の本質を解明することが不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

我々は生理活性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパク RAMP2 による生体内恒常性維持機構に注目してきた。AM, RAMP2 は骨格筋にも豊富に存在するが、その機能や病態との関係は不明である。骨格筋、特に Type I, Type IIa 線維はミトコンドリアに富み、ミトコンドリアの量的・質的变化がサルコペニアの一因と考えられるため、AM-RAMP2 系による骨格筋のミトコンドリア制御との関係などが注目される。また他の疾患モデルにおいては、AM-RAMP2 系が抗炎症、抗酸化ストレス作用を有することが示されていることから、AM-RAMP2 系がサルコペニアにおける骨格筋の傷害を抑制する可能性もある。

一方で、サルコペニア研究において標準的といえる動物モデルは、現在、存在しない。坐骨神経除神経などの方法では、不可逆的に筋萎縮を生じることから、病態の改善効果の判定に限界がある。また後肢懸垂などの方法では、効率良く再現性の高い筋萎縮が得られない場合がある。本研究では、簡便かつ再現性の高い筋萎縮が得られる、筋傷害薬 Cardiotoxin(CTX)を用いて、筋萎縮、再生モデル作成し、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Cardiotoxin 投与による骨格筋傷害・再生モデルの作製

Cardiotoxin(CTX)は、*Naja pallida* 由来のへび毒であり、PKC を特異的に阻害する細胞毒素で、骨格筋線維の脱分極作用を有する薬剤である。CTX は生理食塩水で溶解し 20 μ M になるよう調整した。C57BL/6J Wild-type マウスおよび RAMP2 $^{+/-}$ マウスを用いて、CTX 誘導骨格筋傷害・再生モデルを作製した。イソフルランによる吸入麻酔を行いながら、10-12 週齢のマウスの前脛骨筋(TA:tibialis anterior)領域を予め剃/除毛し、27G 針を用いて、前脛骨筋の足関節側から 1/4 位の場所に針先を挿入し、前脛骨筋の中心を通る様に膝側に向けて押し進め、針先をゆっくり引きながら、CTX 20 μ M、100 μ L を、前脛骨筋全体に行き渡る様に注射した。主に左側前脛骨筋を標的にした。頸椎脱臼によりマウスを屠殺し、前脛骨筋を回収した。回収した前脛骨筋は重量を測定し、病理および遺伝子解析に使用した。RAMP2 $^{+/-}$ マウス骨格筋傷害・再生モデルでは、コントロールに Wild-type マウスを用いて、Wild-type マウス生理食塩水(生食)投与群、RAMP2 $^{+/-}$ マウス生食投与群、Wild-type マウス CTX 投与群、RAMP2 $^{+/-}$ マウス CTX 投与群の 4 群を実験群とし、生食投与群は 14 日間、CTX 投与群は 7、14 日間経過観察した。

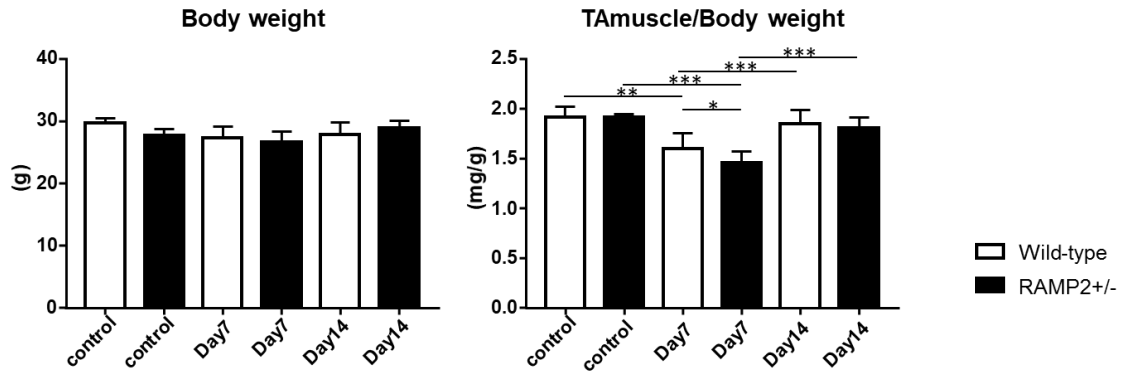
(2) AM の浸透圧ポンプによる持続投与

Recombinant human AM を生理食塩水で希釈し、6 μ g/ μ L/kg になるように調節した。これを浸透圧ポンプ(Alzet)を用いて 3 μ g/Kg/hr でマウスに持続投与した。AM のコントロールには生理食塩水を使用した。浸透圧ポンプはマウスの背側皮下に埋め込んだ。

4. 研究成果

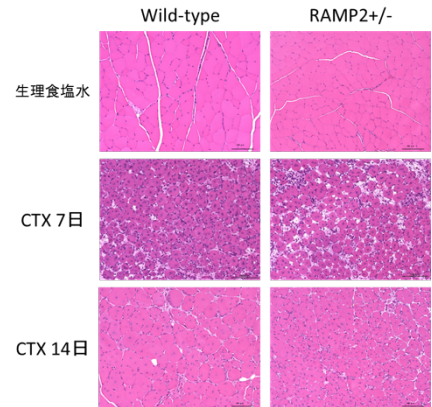
(1) CTX 誘導性骨格筋傷害・再生モデル

体重、骨格筋重量/体重比の測定結果を示す。Wild-type および RAMP2+/-は、CTX を投与しても体重に変化はなかった。骨格筋重量/体重比においては、CTX 投与 7 日後で有意な減少を認め、投与 14 日後で筋重量が回復した。特に、RAMP2+/-の CTX 投与 7 日目においては、Wild-type と比較して、骨格筋重量/体重比の有意な減少を認めた。



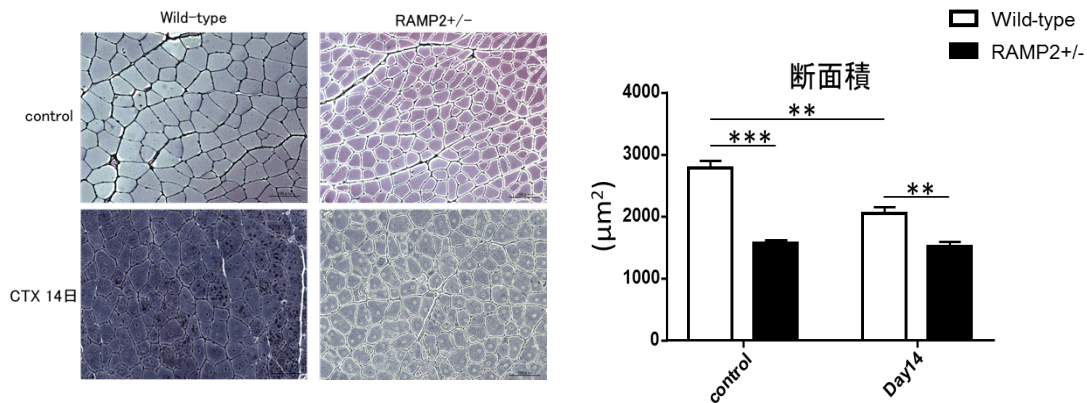
(2) 骨格筋の病理所見

骨格筋の HE 染色の結果を示す。生理食塩水投与群では、両群とも大きな差は見られなかった。CTX 投与 7 日後では、両群とも中心核を有する細かい筋線維および炎症が見られた。投与 14 日後では、中心核を有する太い筋線維が見られたが、RAMP2+/-では Wild-type よりも細かい筋線維が見られた。



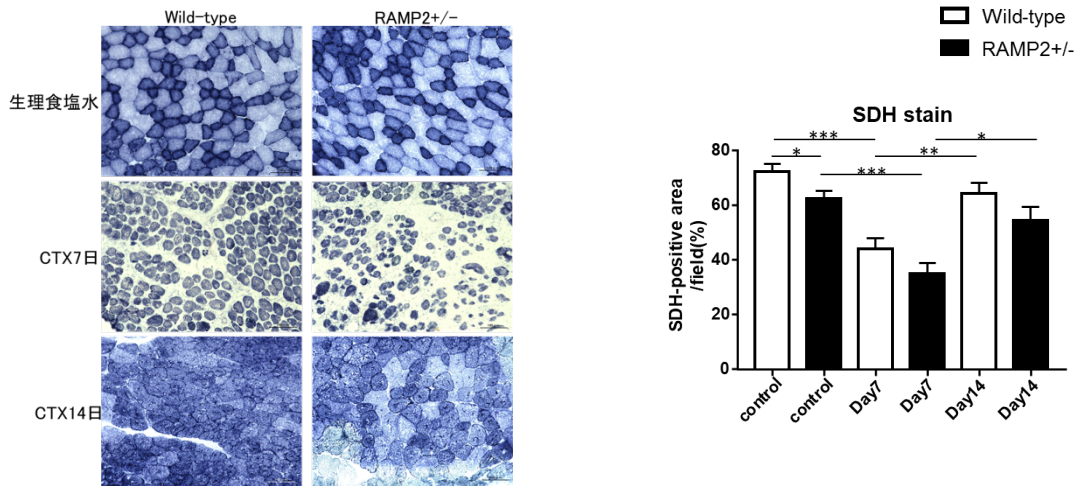
(3) 骨格筋の断面積測定 (鍍銀染色)

鍍銀染色の結果および筋線維の断面積測定の結果を示す。細網線維の好銀性を利用し、銀染色により個々の筋細胞を囲む筋内膜を染色した。この染色結果を用いて、筋線維の断面積を測定した。両群ともに CTX 投与により筋線維径が縮小したが、投与 14 日後には拡大した。CTX 投与 14 日後の RAMP2+/-においては、Wild-type と比較して筋線維径は小さく、骨格筋再生の遅延が確認された。CTX を投与しない control においても、RAMP2+/-は Wild-type に比較して、筋線維径は小さかった。



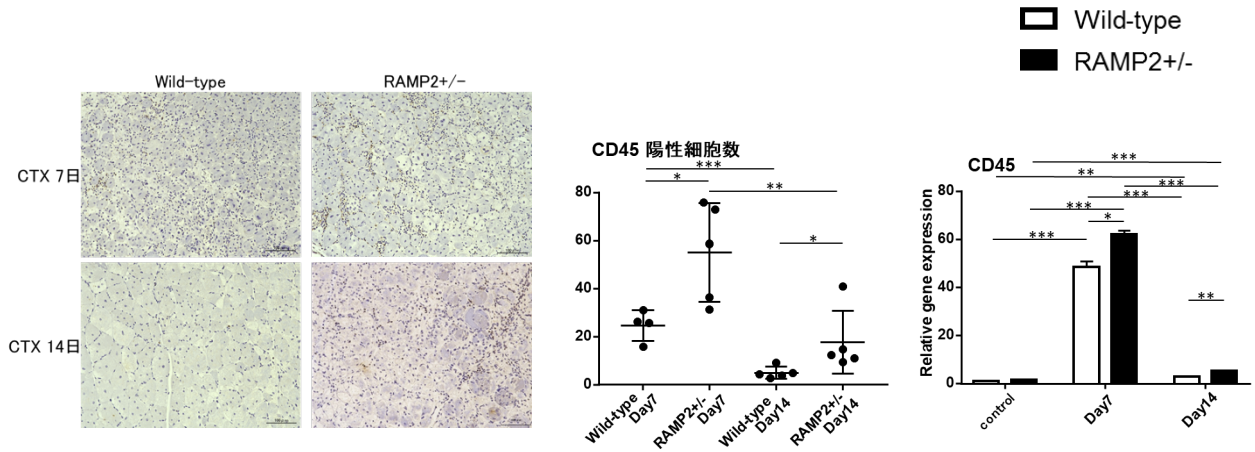
(4) ミトコンドリア活性の評価(SDH 染色)

SDH 染色の結果を示す。ミトコンドリアの活性は、CTX 投与 7 日で減少し、投与 14 日後で回復した。RAMP2+/-では、Wild-type と比較して SDH 染色陽性面積が減少しており、ミトコンドリアの活性が低下していると考えられた。



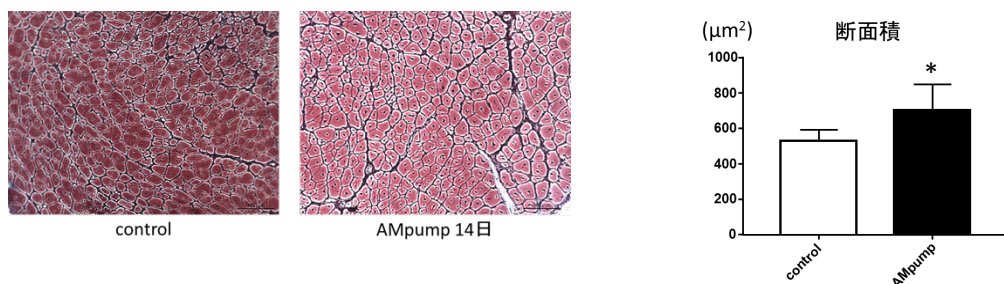
(5) 炎症細胞浸潤の評価(CD45 免疫染色、CD45 の遺伝子発現解析)

抗 CD45 抗体を用いた免疫染色、CD45 のリアルタイム PCR の結果を示す。CTX 投与 7 日後においては CD45 陽性細胞数が上昇したが、投与 14 日後においては減少した。RAMP2+/-では、Wild-type と比較して CD45 陽性細胞が増加していた。リアルタイム PCR による遺伝子発現解析でも、RAMP2+/-では、Wild-type よりも CD45 遺伝子発現が上昇していた。



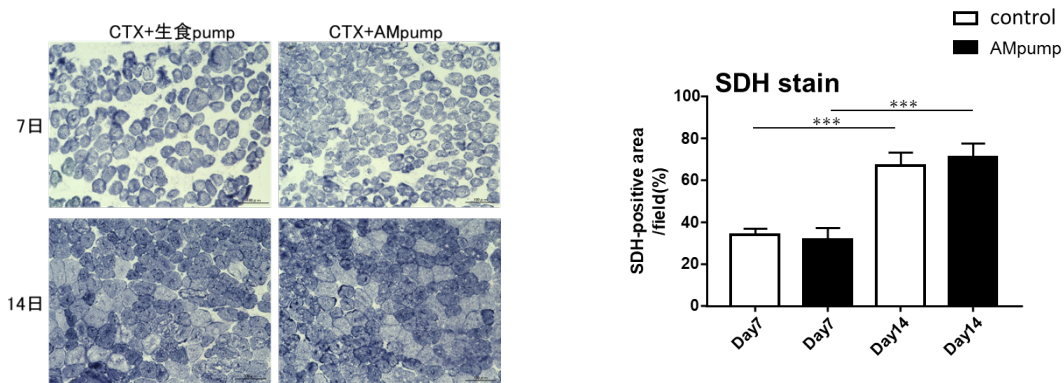
(6) CTX 誘導筋傷害に対する、AM の治療効果の検討

鍍銀染色の結果を用いて、筋線維の断面積を測定した。浸透圧ポンプを用いて AM を外因性に持続投与した AMpump 群は、control に比べて、筋断面積が有意に大きかった。



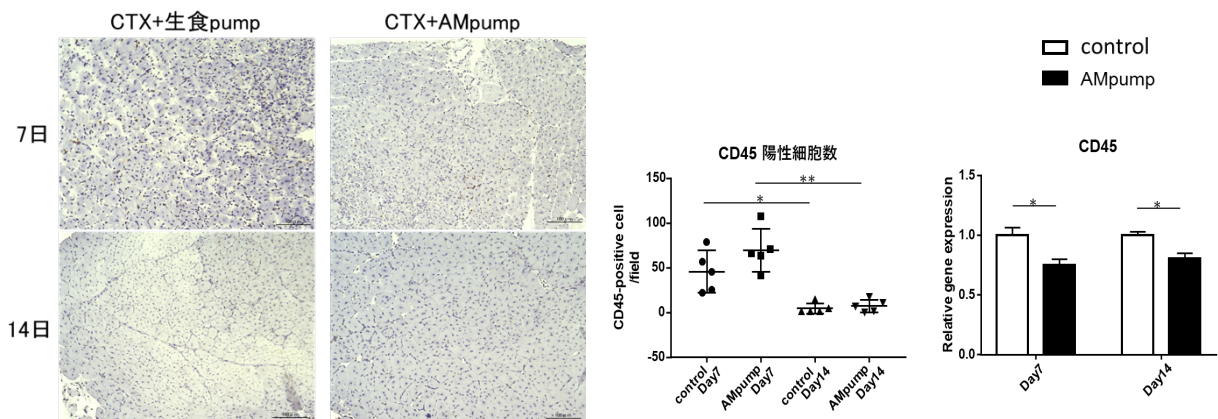
(7) ミトコンドリア活性の評価(SDH 染色)

SDH 染色の結果を示す。CTX 投与 7 日後では、両群とも SDH 染色が不良であったが、14 日後では回復した。2 群間において SDH 陽性面積には差は認められなかった。



(8) 炎症細胞浸潤の評価(CD45 免疫染色、CD45 の遺伝子発現解析)

抗 CD45 抗体を用いた免疫染色、および CD45 遺伝子発現解析の結果を示す。CD45 陽性細胞数は、両群とも 14 日目には減少したが、2 群間に差は認められなかった。CD45 遺伝子発現解析においては、AM pump 群では control と比較して、7 日目、14 日目共に有意な発現低下を認めた。



5. 考察

RAMP2^{+/-}では、Wild-type に比較して、筋断面積が小さかったことから、CTX モデルにおける骨格筋損傷と炎症、骨格筋の再生および肥大の過程において、AM-RAMP2 系の関与が示唆された。CTX モデルにおける炎症の程度を評価するため、抗 CD45 抗体を用いた免疫染色を行い、白血球数を測定したところ、RAMP2^{+/-}では Wild-type と比較して、7 日目、14 日目共に、白血球数が有意に増加しており、炎症反応が亢進していると考えられた。

AM の外因性投与実験においては、筋断面積は AM pump 群で有意に上昇していた。CD45 陽性細胞数は、両群間に差は認められなかったが、遺伝子発現解析においては、AM pump 群は生食 pump 群と比較して、7 日目、14 日目共に CD45 の発現が低下していた。

RAMP2^{+/-}マウスでは、炎症反応の消退遅延および骨格筋の再生遅延が認められるのに対し、AM の外因性投与では、炎症が抑制され、筋断面積が大きくなった。これらの結果は、AM-RAMP2 系がサルコペニアの進展に対して抑制的に働いていることを示しており、サルコペニアの予防、治療の新規標的として AM-RAMP2 系が有用であることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Kakiyama S, Zhao Y, Aruga K, Sanjo H, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF- β 1-Smads pathway and differentiation of myofibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab090	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 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Tanaka M, Wei Y, Kakiyama S, Zhao Y, Aruga K, Kawagishi H, Nakada T, Yamada M, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology,	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab001	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 Tanaka M, Kakiyama S, Hirabayashi K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Aruga K, Yamauchi A, Murata M, Shindo T.	4. 巻 191
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 age-related macular degeneration. Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 652-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.12.012.	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 Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakiyama S, Matsui S, Shindo T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 1914-1930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-1112-z	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 肥満および脂肪肝におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、崔南奇、田中正明、Wei Yangxuan、柿原伸次、Zhao Yunlu、笠原智貴、有賀公亮、新藤隆行
2. 発表標題 肥満および脂肪肝におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有賀公亮、桜井敬之、神吉昭子、市川優佳、河手久香、田中愛、柿原伸次、Zhao Yunlu、松田順繁、新藤隆行
2. 発表標題 サルコペニア病態におけるアドレノメデュリン-RAMP系の病態生理学的意義
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aruga K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Hisaka K, Tanaka M, Kakihara S, Zhao Y, Matsuda Y, Kasahara T, Shindo T.
2. 発表標題 Elucidation of the Significance of the Adrenomedullin-RAMP System as a Novel Therapeutic Target for Sarcopenia
3. 学会等名 第86回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular endothelial homeostasis, which suppresses hematogenous and lymphogenous metastasis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Wei Y, Tanaka M, Kakiyoshi S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka M, Kakiyoshi S, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates age-related macular degeneration by suppressing choroidal neovascularization and subretinal fibrosis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部 循環病態学教室 http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/

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