

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17534

研究課題名（和文）骨格筋量制御におけるカルシウム依存性シグナルの解析

研究課題名（英文）Analysis of calcium-dependent signaling in regulation of skeletal muscle mass

研究代表者

平田 悠（HIRATA, Yu）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70846352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：不動化による筋萎縮の分子機構について解析した。転写因子KLF15は不動化性筋萎縮における重要な制御因子であり、KLF15の上流の制御機構として「基底状態より低下したCa²⁺シグナル」が関与することを明らかとした。また、不動化性筋萎縮に関わる責任Ca²⁺チャネルとしてメカノセンサーであるPiezo1を同定し、不動化ではPiezo1の発現低下によって細胞外からのCa²⁺流入が減少してCa²⁺シグナルが低下し、KLF15の発現増加を通じて筋萎縮が生じ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

不動化では基底状態以下へのCa²⁺濃度の低下が筋萎縮の引き金になると考えられたが、Ca²⁺濃度が「基底状態以下に低下」することによって発動する生命現象を初めて同定した。また、新規に確立した骨格筋Ca²⁺ハイオミメーティング法は各種の筋・神経疾患の研究に応用できる可能性があり、本研究によって同定されたPiezo1/KLF15経路は運動とは独立した不動化固有のシグナルであることから、新規な観点からの筋萎縮抑制薬の開発に繋がる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the molecular mechanism of skeletal muscle atrophy due to immobilization. Transcription factor KLF15 is an important regulator in immobilization-induced muscle atrophy. It was revealed that a decline in intracellular Ca²⁺ concentration from the basal level is involved in an upstream regulatory mechanism of KLF15. We also identified Piezo1, a mechanosensor, as the responsible Ca²⁺ channel for immobilization-induced muscle atrophy. We thus revealed that a decrease in Ca²⁺ signaling of muscle cells, which is caused by a reduction in expression of the Piezo1 channel, triggers immobilization-induced muscle loss through the action of KLF15.

研究分野：糖尿病代謝学

キーワード：骨格筋 不動化性筋萎縮 KLF15

1. 研究開始当初の背景

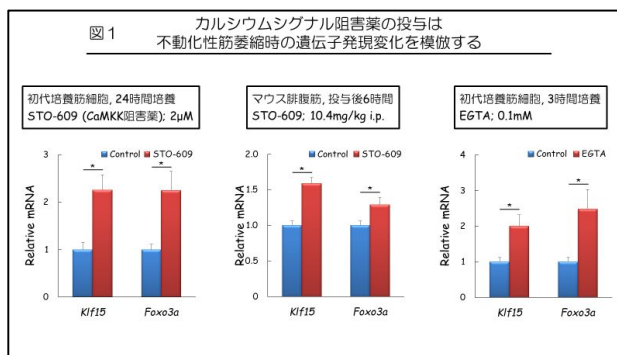
サルコペニアは超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命短縮の重要な要因であるが、その発症の分子機構の詳細は明らかではなく、現在、有効な治療薬はない。既知の候補分子を標的とした創薬戦略が失敗していることを踏まえても、新たな観点から筋量制御に対する理解や創薬標的の探索が重要なことは明らかである。

糖尿病はサルコペニアの重要な促進要因であるが、糖尿病が筋量減少や筋力低下を促す機構は十分に明らかではなかった。代表者はこれまでに糖尿病による筋萎縮の分子機構について解析し、糖尿病モデルマウスの骨格筋では、高血糖によってユビキチンリガーゼ VWP1 の発現が低下することにより、転写因子 KLF15 のユビキチン化とプロテアソーム依存性の蛋白分解が抑制されて KLF15 が過剰蓄積し、アミノ酸異化や筋萎縮関連遺伝子の発現増加を介して筋萎縮が促進されるという新規なメカニズムを明らかとした (JCI Insight. 2019;4(4):e124952)。

身体活動低下や不動化もサルコペニアの重要な促進要因であるが、身体活動低下や不動化が筋量減少を促すメカニズムの詳細は明らかでない。従来、不動化による筋量減少は、運動による筋量増加シグナルの減弱という観点から解析されてきた。しかし、運動による筋量増加は数週から数ヶ月かけて認められるのに対し、不動化による筋量減少は数日から数週で生じるという時間軸の違いを考慮しても、運動による筋量増加機構とは独立した「不動化固有の筋減少シグナル」が存在する可能性は高い。

2. 研究の目的

代表者はこれまでに、ギプス固定による不動化モデルマウスの骨格筋では、KLF15 の遺伝子発現が増加し、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスでは不動化による筋萎縮が顕著に抑制されることを見出した。さらに、不動化性筋萎縮における KLF15 の上流の制御機構を解析した結果、Ca²⁺シグナルの要分子である CaMKK の阻害薬や細胞外 Ca²⁺キレート薬 (EGTA) を用いた検討から、「基底状態より低下した Ca²⁺シグナル」の関与を示唆する知見を得た (図 1)。これらの薬剤は無刺激の定常状態の細胞に作用させた際に、不動化性筋萎縮時の遺伝子発現変化を模倣したことから、細胞外からの Ca²⁺流入阻害によって「基底状態より Ca²⁺シグナルが低下」することが、不動化性筋萎縮に関与する可能性が示唆された。



細胞内 Ca²⁺シグナルの活性化は多彩な生命現象の発現に関与するが、「基底状態より Ca²⁺シグナルが低下」することによって発動される生物学的効果は知られていない。そこで本研究では、骨格筋の Ca²⁺動態を可視化できるバイオイメーキング法の確立や、骨格筋特異的な Ca²⁺シグナル遮断マウスの作成および解析を通じて、「不動化による筋減少シグナルの本態」を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

Ca²⁺バイオイメーキングマウスの開発による不動化による Ca²⁺シグナル低下の証明

本研究では、生体マウスにおける筋細胞内 Ca²⁺レベルの検出を可能とするバイオイメーキング法の確立を目指す。具体的には、Cre 依存性に Ca²⁺センサー分子である GCaMP を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの MLC1f-Cre マウス (骨格筋特異的 Cre トランスジェニックマウス) への投与、および、FRET センサーである YC3.60 を骨格筋特異的に過剰発現するマウスを作成し、骨格筋では「不動化によって筋細胞内 Ca²⁺濃度が基底状態以下に低下する」ことを生体で明らかにする。

骨格筋特異的急性 Ca²⁺シグナル低下マウスの作成

「基底状態より低下した Ca²⁺シグナル」が不動化性筋萎縮の本態であることを証明するため、骨格筋特異的に急性に Ca²⁺シグナルを阻害できるマウスを作成する。具体的には、不動化性筋萎縮に関わる責任 Ca²⁺チャネルを同定し、候補遺伝子の flox マウスとタモキシフェン誘導性骨格筋特異的 Cre 発現 (HSA-Cre-ERT2) マウスとの交配により、タモキシフェン誘導性に Ca²⁺シグナルを急性に遮断できるマウスを作成し、このマウスでは筋萎縮が生じるか否かを検討する。

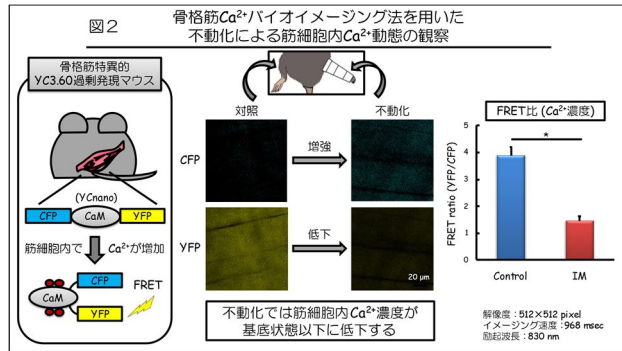
4. 研究成果

Ca²⁺バイオセンシングマウスの開発による不働化によるCa²⁺シグナル低下の証明

Cre 依存性に GCaMP を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを MLC1f-Cre マウスの前脛骨筋に投与し、二光子顕微鏡で観察することにより、基底状態における筋細胞内Ca²⁺濃度を検出することに成功した。

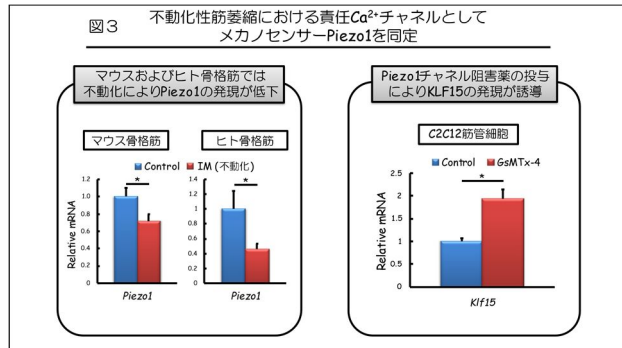
次に、カルモジュリンと YFP/CFP をタンデムに配置した Ca²⁺バイオイメージング遺伝子カセットを発現する YC3.60-flox マウスと MLC1f-Cre マウスとの交配により、YC3.60 を骨格筋特異的に過剰発現するマウスを作成した。このマウスでは、細胞内Ca²⁺濃度が増加すると、CFP が低下し、YFP が増強する。

このマウスにギプス固定による不働化処理を行い、二光子顕微鏡で観察したところ、対照側と比較して不働化側で、CFP が増強、YFP が低下し、Ca²⁺濃度を反映する FRET 比は低下した。すなわち、定量的な手法によって、不働化では筋細胞内Ca²⁺濃度が基底状態以下に低下することを明らかとした(図2)。

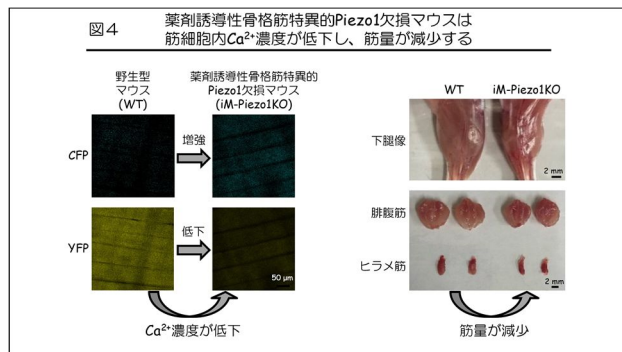


骨格筋特異的急性Ca²⁺シグナル低下マウスの作成

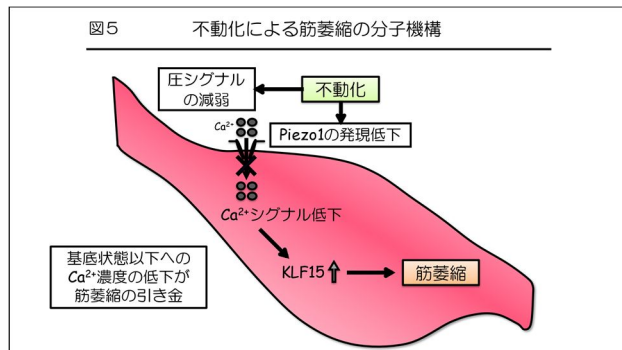
不働化性筋萎縮に関わる責任Ca²⁺チャネルを、DNA マイクロアレイ解析などを用いて網羅的に探索し、機械刺激によって開口するCa²⁺チャネルであるPiezo1を同定した。ギプス固定によって不働化を誘導したマウスおよびヒトの筋ではPiezo1の発現が低下しており、C2C12筋管細胞にPiezo1阻害薬(GsMTx-4)を作用させると、KLF15の発現が増加することを見出した(図3)。



また、Piezo1-flox マウスと HSA-Cre-ERT2 マウスとの交配により、成獣後に、急性かつ骨格筋特異的にPiezo1を欠損できるマウスを作成した。本マウスでは定常状態において、骨格筋Ca²⁺バイオイメージング法で評価した筋細胞内Ca²⁺濃度が低下し、筋量減少に加えて、KLF15や筋萎縮関連遺伝子の発現増加が生じたことから、急性のCa²⁺シグナル遮断によって骨格筋の萎縮が生じることが明らかとなった(図4)。



以上の結果より、不働化では圧シグナルの減弱およびPiezo1の発現低下によって、細胞外からのCa²⁺流入が減少してCa²⁺シグナルが低下し、KLF15の発現増加を通じて筋萎縮が生じることが明らかとなった(図5)。



不働化では基底状態以下へのCa²⁺濃度の低下が筋萎縮の引き金になると考えられるが、Ca²⁺濃度が「基底状態以下に低下」することによって発動する生命現象を今回初めて同定した。また、本研究によって同定されたPiezo1/KLF15経路は運動とは独立した不働化固有のシグナルであることから、新規な観点からの筋萎縮抑制薬の開発に繋がると考えられた。

独立した不働化固有のシグナルであることから、新規な観点からの筋萎縮抑制薬の開発に繋がると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Yu Hirata, Kazuhiro Nomura, Daisuke Kato, Yoshihisa Tachibana, Takahiro Niikura, Kana Uchiyama, Tetsuya Hosooka, Tomoaki Fukui, Keisuke Oe, Ryosuke Kuroda, Yuji Hara, Takahiro Adachi, Koji Shibasaki, Hiroaki Wake, Wataru Ogawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A Piezo1/KLF15/IL-6 axis mediates immobilization-induced muscle atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	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） 10.1172/JCI154611	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、加藤大輔、橘吉寿、内山奏、細岡哲也、原雄二、安達貴弘、柴崎貢志、和氣弘明、小川涉
2. 発表標題 不動態はPiezo1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、加藤大輔、橘吉寿、内山奏、細岡哲也、和氣弘明、安達貴弘、小川涉
2. 発表標題 骨格筋生体イメージングを活用した不動態性筋萎縮の発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小川涉
2. 発表標題 高血糖および不動態における筋量制御のメカニズム
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小川涉
2. 発表標題 高血糖および不動化における筋量制御のメカニズム
3. 学会等名 第41回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川涉
2. 発表標題 不動化はCa ²⁺ シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川涉
2. 発表標題 不動化はCa ²⁺ シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
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 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川涉
2. 発表標題 不動化はCa ²⁺ シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不動化はCa ²⁺ シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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