

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19734

研究課題名（和文）糖尿病性筋萎縮で「筋力」低下が優先的に起こる機序の解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of diabetic muscle atrophy

研究代表者

眞鍋 康子（Manabe, Yasuko）

東京都立大学・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：60467412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性筋萎縮の原因を明らかにするために、糖尿病マウスの血清を骨格筋細胞に投与したところ、筋細胞の収縮力が有意に低下し、糖尿病マウスの血液中には筋力低下を誘導する何らかの因子が存在していることが明らかになった。糖尿病マウスの血液中の成分がタンパク質性であるかを明らかにするために熱処理した血清を細胞に処理し、筋収縮力を測定したところ萎縮を誘導する活性が消失した。萎縮誘導分子がタンパク質性ものであるかを検証するために、セリンプロテアーゼで処理した血清で筋収縮力を測定したところ、萎縮がさらに強く誘導されたことから、萎縮を誘導する分子はプロテアーゼにより活性が促進される分子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糖尿病患者では筋萎縮が生じるリスクが上昇するという現象を明らかにするために、糖尿病マウスの血清中の分子が筋萎縮に関与するかを検証した。糖尿病マウスの血清を処理した筋細胞では、ミオシン重鎖Iの有意な低下、および収縮力の有意な減少が観察された。筋細胞モデルで糖尿病性筋萎縮の特徴を再現できたことは、今後の筋萎縮研究の有用なモデルとして意義は大きい。また、萎縮を誘導する分子はセリンプロテアーゼによって萎縮活性が増加するタンパク質性分子であることが明らかになった。今後、さらに研究をすすめ、萎縮を誘導する血中の分子を同定することで、糖尿病性筋萎縮の原因解明および治療薬開発に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：Diabetes induces significant muscle atrophy via an unknown mechanism. We found that the myotubes treated with diabetic mice serum weakened muscle contractile force, indicating that some factors in the diabetic serum induce muscle atrophy. To investigate the biochemical properties of the factors in diabetic serum that induce muscle atrophy, myotubes were administered by the heat-treated diabetic serum and measured the contractile force. As a result, the heat-treated diabetic serum lost the ability to induce muscle atrophy. To determine whether the target molecules in the diabetic serum that induce muscle atrophy are protein, the serum was treated by protease K, a serine protease. Unexpectedly, the diabetes serum treated by the protease further enhanced muscle atrophy compared to untreated diabetes serum. These results suggest that the factors in the diabetes serum that induce muscle atrophy are proteins whose activity is enhanced by serine proteases.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：skeletal muscle contraction muscle atrophy diabetes

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋量や筋力の減少(筋萎縮)は、様々な疾病の罹患率や要介護状態の割合を増加させることで、医療・介護費の増加を招いており、大きな社会問題となっている。筋萎縮の原因の1つに糖尿病がある。糖尿病になると筋萎縮が生じるリスクは健康な人の3倍以上になる。しかし、その原因はいまだ分かっておらず、糖尿病患者とその予備軍が2000万人以上いる日本では、その原因究明は喫緊の課題である。

糖尿病性筋萎縮では、一般に知られている加齢や不活動を原因とする筋萎縮と特徴が異なっている。加齢や不活動による筋萎縮では通常、筋量(重量や面積)の低下に始まり、筋力(収縮力)低下が続く。一方、糖尿病性筋萎縮では、「筋力」低下が優先して起こることが特徴であり、他の筋萎縮とは別の機序が存在すると考えられる。筋力低下が優先する原因を検証するためには、筋細胞を用いたシンプルな系で「筋力」を指標として原因を探索する必要がある。しかし、これまで筋細胞で「筋力」を測定することは難しいとされてきた。申請者はこれまでの研究で、マウス初代培養細胞から分化させた筋細胞をシリコン製の柔らかい足場に培養し、電気刺激により筋細胞が収縮する時に足場に生じるシワを定量することで筋細胞の筋力を測定することに成功しており、筋細胞の「筋力」を指標とした筋力低下の原因の探索ができるようになった。糖尿病による筋力低下の原因としてまず注目したのが血液中の因子である。がんなどの疾病による筋萎縮には血液中の液性因子が関与すること、また糖尿病では血液中のプロファイルが大きく変化することから、糖尿病血液中の因子が筋力低下を誘導すると考えられた。予備検証で、糖尿病マウスの血清を正常マウス由来の筋細胞に処理したところ、有意な筋力低下が生じたことから、糖尿病マウスの血清には筋萎縮を誘導する何らかの分子が増加していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病の血液中に増加する筋力低下を促す新規分子を同定することを目的とした。血液には、アルブミンやグロブリンを代表とする多量のタンパク質、核酸やアミノ酸、脂肪酸、各代謝産物など複数の分子が含まれており、分子同定は簡単ではない。そこで、目的分子の性質を明らかにし、ある程度分子を絞った後に、タンパク質の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1)マウスの血清採取：糖尿病モデルマウスとして8-20週齢のKK-Ay/TaJclマウス、対照群に同週齢のC57BL/6マウスの眼窩静脈から血液を採取し、7,000 Xg、2分間の遠心分離により血清を得た。血清はそのまま処理することなく細胞に投与する、または以下の3つの処理、(1)限外ろ過法により、100 kDa以上、50-100 kDa、30-50 kDa、30 kDa以下の4つの画分に分離、(2)マウス血清を細胞培養培地で10倍希釈したのち、95℃、20分間の加熱処理、(3)Proteinase Kと反応させ血清タンパク質を分解、を行い実験に用いた。

マウス初代培養細胞は、長趾伸筋由来のサテライト細胞から得た<sup>1</sup>。細胞は2wellチャンパーに $3 \times 10^4$  cellsで播種し、24時間培養した後、分化誘導した。分化3日目に終濃度5%になるように上記血清を添加し、分化5日目で収縮力の測定を行った。測定後、細胞は回収して、各種タンパク質の発現はウェスタンブロッティングにて測定した。

細胞の収縮力測定は以下のように実施した。初代培養細胞はシリコン製基板に播種し5日間分化させた後、電気刺激(20 mA、20 msec duration、980 msec intervals、1 Hz)を与え収縮させた。収縮力の指標は、収縮によりシリコン基板に生じた3回分のシワの長さの総量を測定して算出した(Force index)<sup>2</sup>。

## 4. 研究成果

(1)糖尿病マウス由来の血清による筋細胞の収縮力低下：予備検証で得られていた、糖尿病マウスの血清が筋収縮力の低下を引き起こすかを、個体数を増やして検証した。その結果、糖尿病マウス血清を処理した細胞の収縮力は有意に低下することが明らかとなった(図1)。収縮力以外の指標として細胞幅も測定した。糖尿病マウス血清処理により細胞幅は減少する傾向が観察されたものの、細胞のどの位置を選択するかによる実験者の主観が含まれることや、選択する細胞によって幅が大きく違うことから、有意な差ではなかった。以降は細胞の収縮力のみを指標として検証した。糖尿病性筋萎縮ではミオシン重鎖(Myosin Heavy Chain I; MyHC)を発現する遅筋線維の割合が優先的に減少することが知られている。糖尿病マウスの血清を処理した筋細胞におけるMyHCの発現量をウェスタンブロッティングにて測定したところ、MyHC発現量は有意に減少しており、

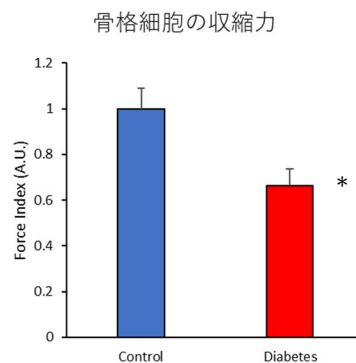


図1 糖尿病マウス血清を投与した骨格筋細胞の収縮力  
健康(control)または糖尿病(Diabetes)マウスから採取した血清を終濃度5%で添加して電気刺激を与えた時の収縮力を測定した(N=4, P<0.05)。

糖尿病マウスの血清を処理した筋細胞の萎縮は生体で起きる糖尿病の筋萎縮を再現できていると考えられた。

(2)筋萎縮を誘導する因子の分子量の推定：野生型及び糖尿病マウスの血液成分である血清を抽出し、限外ろ過法により、100 kDa 以上、50-100 kDa、30-50 kDa、30kDa 以下の4つの画分に分離し、それぞれを細胞に添加して筋収縮力を測定した。しかし、いずれの画分においても収縮力の低下は観察されなかった。そこで、これらの血清を電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分子量毎に分離されたかの検証を行ったところ、ほとんどの分子が100 kDa 以上の画分にとどまっており、血清が正確に分離できていないことが判明した。生体試料である血清には複数の分子が含まれているため、フィルターに目詰まりしたのが原因だと考えられる。以上の結果から、限外ろ過の分離能力では血清中の目的分子の推定は難しいことが明らかになった。

(3)筋萎縮を誘導する因子の熱耐性の検証：筋萎縮の誘導因子の熱耐性を検討するため、マウスの血清を95℃で20分間加熱処理し、骨格筋細胞に添加して3日間培養後、収縮力を測定した。その結果、加熱した糖尿病マウスの血清では、無処理の糖尿病マウスの血清によって誘導される収縮力の低下が起きず、野生型マウスと同程度に収縮した。この結果から、筋萎縮の誘導因子は熱に弱い分子、おそらくタンパク質性の分子であることが示された。その一方で、加熱によりタンパク質以外の分子が失活した可能性や、あるいは変性したタンパク質と凝集体を形成して沈殿したため、作用が消失した可能性も考えられた。

(4)糖尿病血清のプロテアーゼ処理による筋萎縮への影響：筋萎縮を誘導する分子がタンパク質であるならば、タンパク質分解酵素で処理することによりその活性が消失すると考えられる。そこで、プロテアーゼKで処理した血清を細胞に添加し、筋萎縮誘導活性が消失するかを検証した。その結果、予想に反して、プロテアーゼ処理した血清では萎縮活性がさらに強くなった(図2a)。血清がプロテアーゼで分解されているかをSDS-PAGEで分離し染色したところ、分解は完全ではなく、部分的分解が観察された(図2b)。本研究で用いたプロテアーゼはセリンプロテアーゼで、血液中にはセリンプロテアーゼによってタンパク質の一部が分解されることで、活性が促進される分子が多数報告されている。糖尿病血清をプロテアーゼ処理することで、萎縮を誘導する分子の一部が分解され、萎縮誘導の活性がさらに促進したのではないかと考えられた。

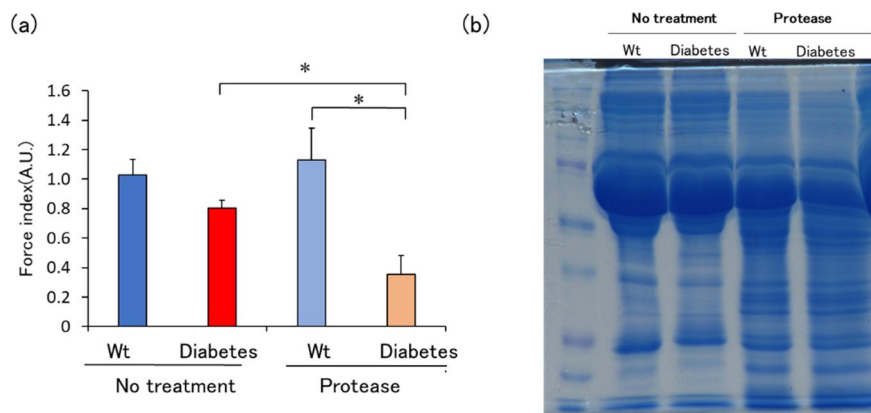


図2 プロテアーゼ処理した血清による筋収縮力への影響

(a) Protease 処理した血清を初代培養細胞に処理したときの細胞の収縮力(N=6-8, \*; P<0.05)  
(b) プロテアーゼ処理した血清を SDS-PAGE で泳動

以上の結果から、糖尿病血清に含まれる筋萎縮を誘導する分子は、セリンプロテアーゼによって活性が促進するタンパク質性の分子であることが明らかとなった。本研究の成果をもとに、糖尿病マウスの血清に含まれる萎縮因子を同定することで、糖尿病性筋萎縮の予防や治療法の開発につながることを期待できる。

## 引用文献

- 1.Furuichi, Y. *et al.* Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions. *Front Cell Dev Biol* **9**, 640399 (2021).
- 2.Hamaguchi, H. *et al.* Establishment of a system evaluating the contractile force of electrically stimulated myotubes from wrinkles formed on elastic substrate. *Sci. Rep.* **12**, 13818 (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Furuichi Yasuro, Goto-Inoue Naoko, Uchida Saki, Masuda Shun, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.                      | 4. 巻<br>9                     |
| 2. 論文標題<br>Stable isotope-labeled carnitine reveals its rapid transport into muscle cells and acetylation during contraction | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Heliyon  | 6. 最初と最後の頁<br>e15281 ~ e15281 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.heliyon.2023.e15281  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hamaguchi Hiroki, Dohi Kitora, Sakai Takaomi, Taoka Masato, Isobe Toshiaki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko | 4. 巻<br>639             |
| 2. 論文標題<br>PDGF-B secreted from skeletal muscle enhances myoblast proliferation and myotube maturation via activation of the PDGFR signaling cascade                       | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>169 ~ 175 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2022.11.085   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hamaguchi Hiroki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko                                    | 4. 巻<br>12          |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a system evaluating the contractile force of electrically stimulated myotubes from wrinkles formed on elastic substrate | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>13818 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-022-17548-7  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Mita Yoshitaka, Zhu Haonan, Furuichi Yasuro, Hamaguchi Hiroki, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L. | 4. 巻<br>12          |
| 2. 論文標題<br>R-spondin3 is a myokine that differentiates myoblasts to type I fibres                         | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>13020 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-022-16640-2  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤井宣晴, 眞鍋康子, 古市泰郎.         |
| 2. 発表標題<br>骨格筋の分泌と再生機能に関するナイト・サイエンス. |
| 3. 学会等名<br>第27回バイオメカニズム・シンポジウム.      |
| 4. 発表年<br>2022年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤井宣晴, 三田佳貴, 瀧口裕貴, 古市泰郎, 眞鍋康子    |
| 2. 発表標題<br>マイオカインが決定する骨格筋機能.               |
| 3. 学会等名<br>第6回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会. (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三田佳貴, 伊藤美由紀, 山田美緒, 藤井宣晴, 眞鍋康子, 古市泰郎   |
| 2. 発表標題<br>継続的な筋収縮が筋管細胞の収縮および代謝関連タンパク質の発現におよぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>第77回日本体力医学会医学会大会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古谷綾菜, 古市泰郎, 眞鍋康子, 藤井宣晴            |
| 2. 発表標題<br>骨格筋における Musashi2 が筋量と筋線維タイプに及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>第77回日本体力医学会医学会大会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>濱口裕貴, 土肥希虎, 坂井貴臣, 田岡万悟, 磯辺俊明, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴, 眞鍋康子 |
| 2. 発表標題<br>筋芽細胞の増殖と筋管細胞の肥大を促進する新たなマイオカインの機能解析                        |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三田佳貴, 朱浩男, 古市泰郎, 濱口裕貴, 眞鍋康子, 藤井宣晴                  |
| 2. 発表標題<br>遅筋線維特異的なマイオカインR-spondin3が骨格筋前駆細胞を遅筋線維へ分化誘導する機構について |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会                                       |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasuko Manabe, Hiroki Hamaguchi, Kanako Iijima, Tsubasa S. Matsui, Shinji Deguchi, Yasuro Furuichi, Nobuharu L. Fujii  |
| 2. 発表標題<br>A valuable tool for measuring skeletal muscle cell contraction force based on the micro-wrinkles on silicone substrate |
| 3. 学会等名<br>The 22nd International Congress of Nutrition (ICN) Tokyo (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                     |   |               |
|-------------------------------------|---|---------------|
| 産業財産権の名称<br>FOXO1阻害剤及び筋萎縮の抑制・改善用組成物 | 発明者<br>三浦進司, 守田昭仁,<br>浅井章良, 亀井康富,<br>眞鍋康子, 出口真次 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2022-0017       | 出願年<br>2023年                                    | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------------------|---|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 田岡 万悟<br><br>(Taoka Masato)<br><br>(60271160) | 東京都立大学・理学研究科・准教授<br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |