

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560338

研究課題名(和文) 生体恒常性維持における骨格筋の新たな役割

研究課題名(英文) Roles of skeletal muscle in whole body homeostasis

研究代表者

小野 悠介 (ONO, Yusuke)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師

研究者番号：60601119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体恒常性維持における骨格筋の機能について調べた。恒常性破綻モデルとして、がん細胞移植によりがんカヘキシアを誘導したマウスを用いて、筋由来分泌因子の変化に着目し、骨格筋の量あるいは質的变化と生体恒常性との関連を探った。がんカヘキシア状態にあるマウスの萎縮筋において、全身の代謝制御に関わる因子が低下していた。続いて、 $\mu$ -クリスタリン(Crym)遺伝子欠損マウスを用いて、Crym機能阻害が筋可塑性と生体恒常性に与える影響について調べた。Crymの主要な発現組織は骨格筋であることを確認した。Crym欠損マウスは、運動機能が亢進し、さらに全身性の代謝ストレス負荷に対して抵抗性が見られた。

研究成果の概要(英文)：We examined roles of skeletal muscle in whole body homeostasis using mouse models including cancer cachexia. Cancer cachexia was induced by injection of C26 mouse colon cancer cells. Several genes involved in regulating lipid metabolism in the body were abnormally expressed in atrophic muscles in the cancer cachexia model. We next investigated the function of  $\mu$ -Crystallin (Crym) in skeletal muscle as well as whole body homeostasis. Crym was preferentially expressed in skeletal muscle. Crym-knockout mice exhibited an increase in grip strength and high intensity running ability. Genetic inactivation of Crym also improved high-fat-diet-induced metabolic abnormalities in vivo. These results indicate that the alteration in quality and mass of muscles potentially influences whole body homeostasis.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 生体恒常性 がんカヘキシア 筋萎縮 筋可塑性 筋由来分泌因子

### 1. 研究開始当初の背景

身体活動の増加により、生活習慣病、認知症、がんの発症リスクを減らすことから、運動は、様々な臓器において全身的効能をもたらすことは周知の事実となった。しかし、その作用機序は極めて複雑であり、不明な点が多い。近年の疫学データから、骨格筋量と健康寿命には正の相関があることが示された。つまり、骨格筋自体が、生体恒常性の制御に何らかの影響をもっている可能性が考えられる。実際、そのことを裏付ける知見がある。がん細胞移植によるがんカヘキシアを誘導したマウスにおいて、筋萎縮促進因子であるマイオスタチンが血液中に増加する。興味深いことに、このマイオスタチンを阻害すると、がん細胞の増殖を抑制することはないが、カヘキシアによる筋萎縮を抑制するのみならず、寿命まで延びる。このことは、がんによる筋量の減少あるいは骨格筋の質的変容が、生体恒常性維持システムを破綻させる要因になりうることを示唆している。

### 2. 研究の目的

骨格筋の可塑性を制御する仕組み、および生体恒常性を制御するメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

研究 1. 骨格筋の劇的な萎縮を伴い生体恒常性が破綻する動物モデルとして、マウスへのがん細胞移植によりがんカヘキシアを誘導した。8 週齢の BALB/c マウスの皮下に、マウス大腸癌細胞株 Colon26 (C26) を注射し、3-4 週間後に解剖した。腫瘍重量、精巢上体脂肪重量、筋重量を測定した。腓腹筋から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析用にサンプルを調製した。網羅的解析で変動がみられた興味深い分泌因子の遺伝子発現については定量 PCR で確認を行った。

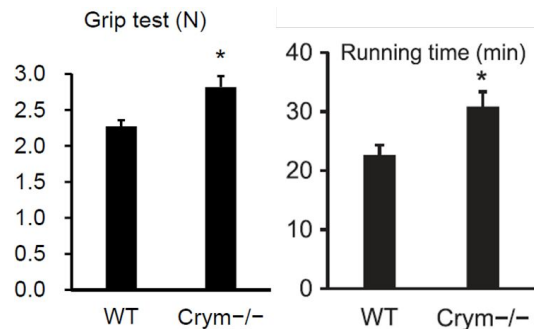
研究 2.  $\mu$ -クリスタリン(Crym) は、ケチミンレダクターゼ活性をもち、抗酸化作用のあるケチミンを不活性化作用をもつ。骨格筋は Crym の主要な発現組織であるが、その役割は不明であった。本研究では、Crym 遺伝子欠損マウスを用いて、筋可塑性と生体恒常性に与える影響について調べた。トレッドミル走や握力テストなどを用いた運動機能評価を行った。骨格筋の組織学的解析を行った。生体恒常性に与える影響については、全身の代謝に着目し、高脂肪食負荷による代謝ストレス後の体組成や耐糖能テスト等で評価した。

### 4. 研究成果

研究 1 の結果：C26 を移植後、3 週間で体重減少および精巢上体脂肪の萎縮を確認することができ、がんカヘキシアモデルを確立した。骨格筋の筋重量を測定したところ、腓腹筋などの下肢の速筋では有意な筋萎縮を確

認した。一方、頭部筋である咀嚼筋は萎縮が見られなかった。筋萎縮関連遺伝子として知られるユビキチンリガーゼの MuRF1 や Atrogin-1 を調べたところ、C26 移植により腓腹筋では増加したが、頭部筋では変化しなかった。続いて、萎縮が認められた腓腹筋を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。興味深いものを 2 つ挙げると、抗肥満作用をもつレプチン遺伝子や、抗糖尿病作用のあるアディポネクチンの発現が、萎縮筋で低下していた。いずれの因子も脂肪組織を中心に骨格筋以外からも分泌されるが、生体の 40% を占める骨格筋における発現低下は、全身性に影響を及ぼす可能性は十分考えられる。また、今回の探索研究で、機能未知の分泌因子もいくつか候補としてあがった。今後、培養細胞や動物個体レベルで、このような因子を含めて詳細に解析していくことで、生体恒常性の維持に重要な骨格筋由来因子を同定していく予定である。

研究 2 の結果：Crym 欠損マウスは野生型と比較して、組織重量には変化がなかった。握力テストで筋力を評価すると、Crym 欠損マウスは増強していた。さらにトレッドミルによる高強度の走運動を負荷したところ、野生型マウスと比べて高いパフォーマンスを示した(下図, Seko *et al.*, *FASEB J* 2015)。前脛骨筋の筋横断切片で筋線維タイプを調べたところ、Type IIb 速筋線維が肥大していた。以上の結果から、Crym は骨格筋の機能に対して抑制的に働いている可能性が示唆され



た。続いて、Crym 欠損マウスに、長期の高脂肪食を摂取させ、全身性に代謝ストレスを負荷した。野生型に比べ、Crym 欠損マウスは代謝ストレスに対して抵抗性を示した。この結果は、骨格筋で発現する Crym は、生体恒常性に影響を与えることを示している。

現時点で、Crym 欠損マウスにおける運動機能の増強や全身代謝改善作用のメカニズムは不明である。おそらく、Crym が負に制御しているケチミン産生が欠損マウスで解除され、ケチミンが血中へ分泌亢進した結果、体内の抗酸化能が改善したことが関与したのではないかと推測している。培養実験において、我々はケチミンが強力な抗酸化能を発揮することを確認している。今後、Crym 欠損マウスの血中および筋中ケチミン濃度を測定する。ケチミン投与により運動能が実際

に改善するのか，さらに生体恒常性に影響を与えるのかについても，今後の検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Kitajima Y and **Ono Y\***. Estrogens maintain skeletal muscle and satellite cell functions. *J Endocrinol* 2016 Apr 5. pii: JOE-15-0476. [Epub ahead of print]\***Corresponding author**.
2. Kitajima Y, Ogawa S and **Ono Y\***. Visualizing the functional heterogeneity in muscle stem cells. *Methods Mol Biol* 2016 Apr 7. [Epub ahead of print] \***Corresponding author**.
3. Seko D, Ogawa S, Li TS, Taimura A, **Ono Y\***,  $\mu$ -Crystallin controls muscle function through thyroid hormone action. *FASEB Journal*. 2015 Dec 30, 1733–1740. \***Corresponding author**.
4. Masuda S, Hisamatsu T, Seko S, Urata Y, Goto S, Li TS, **Ono Y\***. Time- and dose-dependent effects of total-body ionising radiation on muscle stem cells. *Physiological Reports*, 3 (4), 2015, e12377. \***Corresponding author**.
5. Fujita R, Seko S, **Ono Y\***. Scribble dictates orderly stem cell fate. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, No.22.18738-9. Editorial. \***Corresponding author**.
6. **Ono Y\***, Urata Y, Goto S, Nakagawa S, Humbert PO, Li TS, Zammit PS. Muscle stem cell fate is controlled by the cell polarity protein Scrib. *Cell Reports*, 2015 Feb 24;10(7):1135-48.\***Corresponding author**.
7. **Ono Y\***. Satellite cell heterogeneity and hierarchy in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med*, 3(2): 229-234, 2014. Review Article. \***Corresponding author**.

[学会発表](計15件)

1. Daiki Seko, Tsubasa Hisamatsu, Ryo Fujita, Kiyoshi Yoshioka, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tao-Sheng Li, Akihiro Taimura and **Yusuke Ono**. Role of a FSHD-associated protein  $\mu$ -Crystallin in skeletal muscle. 20th WMS Congress, Brighton, London. U.K. 22 Oct 2015.(ポスター)
2. Kiyoshi Yoshioka, Daiki Seko, Ryo Fujita,

Tsubasa Hisamatsu, Shizuka Ogawa, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tao-Sheng Li, **Yusuke Ono**. The cell polarity protein Scrib dictates muscle stem cell fate. The 13th Protein Island Matsuyama International Symposium. Ehime, Matsuyama, Japan, 25 Sep 2015.

3. **小野悠介**「細胞極性因子による筋サテライト細胞の運命決定制御」第1回日本筋学会，東京都小平市，2015年8月8日。
4. **Yusuke Ono**, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tao-Sheng Li. The cell polarity protein Scrib controls muscle stem cell fate. ISSCR2015 Älvsjö, Sweden. 26 Jun 2015.
5. 瀬古大暉，増田慎也，久松翼，**小野悠介**「クリスタリン $\mu$ ノックアウトマウスの骨格筋機能解析」第3回骨格筋生物学研究会，宮城県仙台市，2015年3月7日。
6. 久松翼，瀬古大暉，増田慎也，**小野悠介**「がんカヘキシア筋萎縮に関連する遺伝子の網羅的発現解析」第3回骨格筋生物学研究会，宮城県仙台市，2015年3月7日。
7. **小野悠介**，増田慎也，久松翼，瀬古大暉，浦田芳重，後藤信治，李桃生「細胞極性因子 Scrib による筋サテライト細胞の運命決定制御」第69回日本体力医学会，長崎県長崎市，2014年9月19日。
8. 瀬古大暉，久松翼，増田慎也，北島百合子，田井村明博，**小野悠介**「骨格筋におけるクリスタリン $\mu$ の機能解析」第69回日本体力医学会，長崎県長崎市，2014年9月19日。
9. **Yusuke Ono**, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Shunsuke Nakagawa, Patrick Humbert, Tao-Sheng Li, and Peter Zammit. The tumour suppressor Scrib plays a crucial role in maintenance of proliferative state in muscle stem cells. 2014 FASEB Science Research Conferences “Lipids and Lipid Regulated Kinases in Cancer”, Steamboat Springs, Colorado (USA), 29 Jul 2014.
10. **Yusuke Ono**, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Shunsuke Nakagawa, Patrick Humbert, Tao-Sheng Li, and Peter Zammit. The cell polarity protein Scrib is a novel regulator of myogenic progression in muscle satellite cells. 2014 FASEB Science Research Conferences “Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells”, Steamboat Springs, Colorado (USA), 24 Jul 2014.
11. **小野悠介**「骨筋可塑性の分子制御」第22

回日本運動生理学会基調講演，岡山県倉敷市，2014年7月19日。

12. **小野悠介**「骨格筋糖代謝と Notch シグナリング」，2014年度日本農芸化学学会シンポジウム，神奈川県川崎市，2014年3月30日。
13. **小野悠介**「骨格筋可塑性を制御する分子基盤」第91回日本生理学会大会シンポジウム，鹿児島県鹿児島市，2014年3月18日。
14. **Yusuke Ono**, Shinya Masuda, Yuriko Kitajima, Yoshishige Urata, Shinji Goto and Tao-Sheng Li. The tumour suppressor Scrib is a novel mediator of TNF-alpha signalling in muscle stem cells. 7th International Conference of the Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders, Kobe, Japan 10 Dec 2013.
15. **Yusuke Ono**, “Molecular and cellular mechanisms underlying muscle regeneration and aging” Asian Association of Aging Research. Seoul, Korea, 8 Nov 2013.

〔図書〕(計2件)

1. 瀬古大暉，小川静香，**小野悠介** サテライト細胞と細胞極性．**基礎老化研究** 巻：40 (1) 19-25, 2016.
2. **小野悠介** 再生医療で用いられる細胞種の培養～骨格筋幹細胞～「再生医療事業の課題解決のための手引書(分担執筆)」**技術情報協会出版** 第3節 3 p177-180, 2013年.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称

発明者：

権利者：

種類：

番号：出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 悠介 (ONO, Yusuke)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師

研究者番号：60601119