

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25702041

研究課題名(和文) マイオペニア(筋肉減弱症)を防止する包括的介入戦略の開発

研究課題名(英文) Identification and development of therapeutic strategy for treatment of skeletal muscle loss and weakness "MYOPENIA"

研究代表者

宮崎 充功(Miyazaki, Mitsunori)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授

研究者番号：20632467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ガンやエイズ、慢性消耗性疾患の患者における不良予後の指標として知られるマイオペニア(骨格筋減弱症)の発症要因を解明し、最終的には骨格筋量/体脂肪量減少を特徴とした全身的な身体機能低下を防止する介入戦略の開発を目指して研究が行われた。主な研究成果として、以下の3点について詳細な研究成果があげられた。1)骨格筋量を制御する細胞内情報伝達系の解明、2)筋肉弱화를誘導する遺伝子群の網羅的解析、3)筋肉弱化を防ぐための身体運動介入効果とその仕組み

研究成果の概要(英文)：This research project was conducted to identify and develop therapeutic strategies for treatment of skeletal muscle loss and weakness termed as "MYOPENIA". Myopenia is generally developed under several physiological and pathological conditions including aging, hypomobility and wasting diseases such as AIDS/COPD/cancer.

Main achievements of this research project were summarized as follows. 1) Identification of intracellular signaling mechanisms regulating skeletal muscle size. 2) Comprehensive data analyses of gene expression in skeletal muscle under myopenic condition. 3) Development of the therapeutic interventions for myopenia using whole-body exercise.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動生理学 骨格筋 悪液質 マイオペニア 細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌や COPD を含む原発性疾患や糖尿病などの代謝障害を原因として二次的に誘発される筋力および筋量の減少を総称して、マイオペニア（筋肉減弱症）という概念が提唱されている (Fearon et al. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2011)。マイオペニアは、広義には不可逆性の筋変性（筋ジストロフィーなど）や虚弱 (frailty)、加齢性の筋量低下（サルコペニア）なども含み、共通する特徴的な病態として骨格筋量の顕著な低下を呈する全身的な代謝障害症候群の総称とされている。

骨格筋は終末分化した多核細胞の集団であり、骨格筋量の増加（筋肥大）や減少（筋萎縮）といった組織全体の量的変化は、個々の筋線維の大きさが変化したことを意味する。この筋線維サイズの変化は、細胞内におけるタンパク質の合成および分解の出納バランスによって規定される。つまり骨格筋量の増加（または減少）とは「骨格筋細胞内のタンパク質合成量がタンパク質分解量を上回った（下回った）状態」と定義することができる。

骨格筋量の低下を誘導する分子メカニズムとしては、E3 ユビキチンリガーゼである Atrogin1 や MuRF1 を中心とするユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解機構が最も良く知られている。しかしながら、オートファジーやアポトーシス、カルパイン系といったその他のタンパク質分解経路も存在し、これらが骨格筋細胞におけるタンパク質分解にどのように関与するのか、その詳細は未だ明らかでない。またガンや COPD、慢性炎症性疾患などその他の臓器における病変が、どのようなメカニズムを介して骨格筋タンパク質の分解を惹起するのか現在まで全く解明されておらず、その抑制方法もわかっていない。

## 2. 研究の目的

マイオペニアは、筋タンパク質の代謝制御異常に起因した負のエネルギー・タンパク質バランスを特徴とする。しかしその発生機序はほとんど解明されておらず、また原発性疾患の病態によってその発症や進行状況も大きな影響を受ける。惹起されたタンパク質異化バランスを是正するための介入戦略として、筋タンパク質合成系を賦活させるべきか、それともタンパク質分解系を抑制するべきか（または両者を同時に調節するべきか）その制御メカニズムを含めて解明されていない。

これまでの先行研究から、全身の骨格筋量の維持へ向けた最も有効な介入方法として「適切な身体運動レベルの維持」が挙げられるが、その作用機序や予防効果もほとんど検討されていない。

そこで本研究においては、次の3つのテー

マを解明するべき課題として設定した。

- (1) タンパク質合成の促進を介した骨格筋肥大制御機構の解明と筋萎縮耐性の獲得
- (2) マイオペニアを誘発する全身性および局所因子の探索とその機能解析
- (3) 身体運動による筋タンパク質代謝制御を基軸とした包括的マイオペニア予防戦略の開発

## 3. 研究の方法

上記の研究課題について解析を進めるために採用した研究方法について、その概略を以下に述べる。

- (1) 骨格筋タンパク質代謝を制御する細胞内情報伝達機構の解析

この検討課題においては、タンパク質合成系制御の中心的役割を果たす mTOR 系情報伝達機構の解析のため、マウス由来骨格筋細胞である C2C12 を使用した。また mTOR の上流因子である Akt1 の遺伝子ノックアウト (KO) モデルを用い、筋収縮活動量の変化に伴う mTOR 活性の制御機構について検討を行った。

- (2) マイオペニア誘導因子の探索

本研究では、「何らかの理由により全身の筋肉量が減少する」という幅広い疾患概念を含むマイオペニアについて検討する上で、特に全身性の代謝障害症候群として知られるガン性悪液質（カケキシア）を実験モデルの一つとして採用した。CD2F1 系マウス（雄性、8 週齢）に対してマウス大腸癌由来細胞株 colon-26 (C26) の皮下移植を行い、実験的癌性カケキシア誘発モデルを作成する。C26 細胞は血清および抗生物質を含んだ増殖培地（10%FBS in RPMI-1640）にて培養を行った後、1 個体あたり  $1 \times 10^6$  個の C26 細胞をマウス腹壁部へと皮下移植する。この実験モデルの場合、C26 細胞移植後 3-4 週間で体重減少や筋量/筋力低下が観察される。

- (3) マイオペニア発症予防のための全身的な身体運動介入

マウスに対する運動介入にはランニングホイールを用いた自発走運動を採用し、C26 細胞移植後の飼育期間（4 週間）に自発走運動を促すことで、身体運動介入の効果を検証した。

## 4. 研究成果

- (1) Akt/mTOR 経路の活性化によるタンパク質代謝機構の活性化が、骨格筋肥大には重要である

タンパク質合成系制御には mTOR 系経路を介した刺激入力系が重要な役割を果たすが、その制御機構の詳細は依然不明であった。この問題に対し、特に mTOR の上流因子の機能解析を行ったところ、PKC/TSC2/Rheb を介し

たシグナル入力に特に重要な働きを果たすことが明らかとなった(Miyazaki et al. FEBS Open Bio 2017)。また mTOR の上流因子の一つである Akt1 の関与について KO マウスを用いた検討を行ったところ、これまで重要であると捉えられていた Akt1 の存在については、mTOR の活性化 / タンパク質合成促進という点からは必須な入力系ではなく、むしろ筋衛星細胞の活性化による筋再生能維持に關与することが解明された。(図1)

Sample Collection: 14days following CTX Injection  
Intramuscular injection into Tibialis Anterior

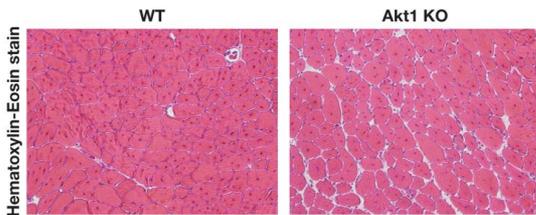
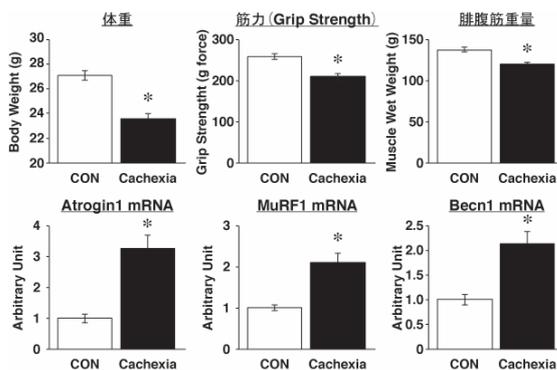


図1 Akt1 機能欠損による骨格筋再生能低下

(2) マイオペニア誘導因子の探索

筋タンパク質の分解を誘導する分子機構として、選択的タンパク質分解系のユビキチン・プロテアソーム系、および非選択的バルク分解系であるオートファジー系の関与が示唆されている。マイオペニアの実験モデルとして採用したマウス大腸ガン由来細胞株(C26)の移植実験から、癌性悪液質に伴う骨格筋萎縮では、E3 ユビキチンリガーゼである Atrogin1 や MuRF1、オートファジー関連遺伝子 Becn1 の遺伝子発現が顕著に誘導されることから、ユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー系の両者の関与が認められた。(図2)



CD2F1系マウスへ大腸癌由来細胞株C26を皮下移植し、癌性カケキシアを誘発した。移植後28日目には、体重、筋重量および発揮筋力の有意な低下が認められ、またユビキチン・プロテアソーム系の指標となるAtrogin1およびMuRF1、オートファジー関連遺伝子Becn1の遺伝子発現量の増加が観察された。(Miyazaki et al., Unpublished Observation)

図2 癌性悪液質発症に伴うタンパク質分解系の骨格筋内遺伝子発現の変化

さらに、マイオペニアを実験的に誘導した状態においては、通常であれば筋萎縮に対して抑制効果が認められる身体運動刺激や栄養療法といった介入を行っても、期待される効果がほとんどあげられないことも明らかとなった。(図3)

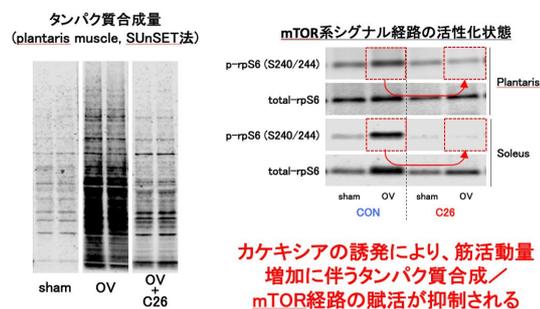


図3 癌性悪液質の発症下ではタンパク質合成能の促進不全が発生する

以上の結果から、マイオペニアが誘発された状態とは、タンパク質合成能の低下 / 分解能の促進といった変化だけでなく、崩れたタンパク質代謝バランスの是正を阻害する何らかの因子が存在することが明らかとなった。さらにこの課題を解明すべく、マイオペニアを誘導する全身性 / 局所性因子を探索するため、血清より回収したタンパク質サンプルのプロテオミクス解析、および骨格筋より回収した RNA サンプルのトランスクリプトーム解析を行い、現在は6つにまで絞り込んだ候補遺伝子(未発表データ)の機能解析を進めている段階である。

(3) マイオペニア発症予防のための戦略開発

上記の解析結果から、マイオペニアに対する有効な介入戦略としては、筋肉量の減少が発生する前の段階から予防的な介入を行うべきであることが示唆された。この点について検討するため、癌性悪液質発症モデルマウスに対して、C26 細胞移植直後からの全身性の運動介入を行った。その結果、腫瘍細胞の増殖(癌の進行)度合いに変化は認められなかったものの、骨格筋量および脂肪量減少(悪液質の発症)が有意に抑制された(Miyazaki et al., 未発表データ)。この運動介入効果の作用機序については、タンパク質代謝バランスの変化、および Pax7 や MyoD1 を中心とする筋分化制御因子の関与を中心に解析を進めている。

(4) 今後の研究の展開

骨格筋量低下を特徴とした体重減少は、癌やエイズ、慢性消耗性疾患の患者における不良予後の指標として知られる。また加齢や不活動によっても骨格筋量の減少が惹起されるため、生涯に渡って骨格筋量を維持する介入戦略の開発は、マイオペニアを呈する患者の臨床転帰不良や QOL (Quality of Life) 低下を防止するために必須の課題といえる。本研究課題の成果を基にさらに研究を進展させ、疾患や身体運動レベルの変化が骨格筋タンパク質代謝の制御・維持機構におよぼす影響を理解することで、マイオペニアを防止する新たな介入戦略の開発や、効果的なりハビ

リレーションプログラムの考案へと繋がる基礎的知見の得られることが強く期待されるところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4件)

- (1) Mitsunori Miyazaki and Tohru Takemasa, TSC2/Rheb signaling mediates ERK-dependent regulation of mTORC1 activity in C2C12, FEBS Open Bio, 2017 Mar;7(3):424-33. 査読あり  
DOI: 10.1002/2211-5463.12195.
- (2) 宮崎充功, 冬眠中のクマはなぜ寝たきりにならないのか?, BEARS JAPAN, 2016, 16巻, 26-27, 査読なし
- (3) Mitsunori Miyazaki, Growth factor-dependent and independent regulation of skeletal muscle mass -Is IGF-1 necessary for skeletal muscle hypertrophy?-, Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 2013 Jan;2(1):101-106. 査読あり  
DOI:<http://doi.org/10.7600/jpfsm.2.101>

〔学会発表〕(計 21件)

- (1) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Regulation of protein metabolism and muscle mass in hibernating bears: an attractive model of muscle atrophy resistance. 24th International Conference on Bear Research and Management, "Symposium: Bear Physiology with Implications for Humans", Anchorage, AL, USA, June 2016
- (2) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Hibernating bear muscle shows slow-fiber shifting and mitochondrial biogenesis despite prolonged physical inactivity. Cell Symposia: Exercise Metabolism, Amsterdam, The Netherlands, July 2015
- (3) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Altered signaling pathway governing protein metabolism in skeletal muscle of the Japanese black bear during hibernation. Experimental Biology 2015, Boston, MA, USA, March 2015
- (4) Mitsunori Miyazaki, MEK/ERK-dependent regulation of mTOR activity is mediated through TSC2/Rheb signaling in C2C12 myoblasts. 7th Cachexia Conference, Kobe, Japan, December 2013

- (5) Mitsunori Miyazaki, PKC-dependent regulation of mTOR activity is mediated through TSC2/Rheb signaling in C2C12 myoblasts. IUPS 2013, Birmingham, UK, July 2013
- (6) 宮崎充功, 骨格筋量を保持するための新奇ストラテジー探索、第69回日本体力医学会大会、長崎大学(長崎県・長崎市)、2014年9月、シンポジウム招待講演

〔図書〕(計 1件)

Mitsunori Miyazaki, Cellular mechanisms regulating protein metabolism in skeletal muscle cell -Age-associated alteration of intracellular signaling governing protein synthesis and degradation-, Basic Biology and Current Understanding of Skeletal Muscle, Editor: Kunihiro Sakuma, Nova Biomedical, New York, USA, 2013, 21-52

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/mitsunori-miyazakiphd/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮崎 充功 (MIYAZAKI MITSUNORI)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授

研究者番号: 20632467