

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K01735

研究課題名(和文)サルコペニアの予防をめざす：加齢による筋タイプ II 線維の萎縮防止の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular study on the age-related muscle atrophy

研究代表者

山路 純子(田代純子)(Tashiro-Yamaji, Junko)

関西福祉科学大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：40340559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアは加齢性に見られる筋萎縮症であり、高齢者の生活活動強度の低下など要介護状態につながる原因の1つである。本研究では、筋萎縮症、特に加齢性筋萎縮症(サルコペニア)の予防と治療の基礎の確立を目的とし、骨格筋の構成線維発現やこれらに関わる骨格筋由来因子の発現調節を調べた。ミオシン重鎖クラスIのmRNA発現増加にはカルシニューリン活性化や骨格筋由来因子の関与が示唆された。一方、ミオシン重鎖クラスIIアイソフォームにおいては骨格筋由来因子による発現調節が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が発展する事により、社会、医学、自然科学に以下のような影響がもたらされると考えられる。1. 速筋の増加因子の同定：遅筋に比べ速筋(タイプII線維)を増加させる事は容易ではなく未だ明らかではないため、因子の解明により、筋萎縮を効果的な回復に寄与しうる。2. 身体能力が低下した高齢者のADL改善や要介護人口の減少：最も治療や予防を必要とする、身体能力が低下した高齢者において、負担がより軽い状態で筋の量や機能の改善、要介護人口の減少などの社会福祉に貢献しうる。3. サルコペニアの進行の抑制・回復の促進：従来の運動負荷ではハビリテーションが困難な患者に対する新しい治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is age-related skeletal muscle atrophy and it causes significant decline in activities of daily living (ADL) in elderly people. In this study, we investigated the molecular regulation of types in skeletal muscle fibers and of myokines in murine myocytes to establish the basis for the prevention of age-related muscular atrophy. Our results are shown below:

(1) The expression of myosin heavy chain class I was upregulated by the activation of calcineurin or the application of myokines. (2) That of myosin heavy chain class II isoform was enhanced by the application of myokine.

研究分野：分子生物学、免疫学、生理学

キーワード：筋萎縮 サルコペニア 骨格筋 分子生物学 ミオシン重鎖アイソフォーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本は世界一の超高齢化社会に突入し、高齢者(65歳以上)は人口の4人に1人を占め(平成26年版高齢社会白書、内閣府)、その内、要介護者は540万人を超えている。高齢者が介護を必要とせず、より質の高い生活を送り健康寿命を長く保つためには、その1つに骨格筋の量や機能を維持し、サルコペニア(加齢性筋萎縮症)を早期に予防することが重要であると考えられている。

筋の不動(長期臥床等)が続くと廃用性筋萎縮を生じ骨格筋量が低下するが、このとき主に萎縮する筋線維はタイプI線維である。一方、老化に伴い徐々に骨格筋量が減少していく加齢性筋萎縮症(サルコペニア)では、タイプII線維が顕著に萎縮することが知られている。

本研究は、高齢者が要介護となる原因の1つである筋萎縮症、特に加齢性筋萎縮症(サルコペニア)の予防と治療の基礎の確立を目的とし、速筋の萎縮に顕著に見られることが知られる事から、骨格筋の構成線維発現やこれらに関わる筋由来因子の発現の調節を明らかにする。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、サルコペニアの有効な予防や治療方策の基礎の確立であり、以下のよう
にあげられる。

(1) サルコペニアにおいて、萎縮が顕著な骨格筋タイプII線維(ミオシン重鎖クラスIIアイソフォーム)に注目し、骨格筋線維の発現の分子機構に対する筋関連サイトカインのインターロイキン・カルシニューリン等のシグナルの関わりを明らかにする。

(2) 上記を通じて、サルコペニアの筋萎縮予防に利用が容易、且つ治療や防止へ応用が有効な機能性因子を分子生物学的手法により同定する。

3. 研究の方法

(1) C2C12筋芽細胞の骨格筋分化(筋管形成)において、C2C12筋芽細胞の筋管形成誘導開始時に、カルシニューリン活性化剤(多価陽イオンなど)や骨格筋由来因子(マイオカイン)、これらの阻害剤(サイクロスポリン、抗体など)の存在下に培養した後、Total RNAを抽出し逆転写して得られたcDNAに対し、リアルタイムPCRを用いてミオシン重鎖クラスIIアイソフォームのmRNA発現量を検討した。

(2) 上記目的(2)に関連し、天然化合物を用いたミオシン重鎖アイソフォーム(特にクラスIIアイソフォーム)の発現増加因子と分子メカニズムを解析するために、ミオシン重鎖増加因子の受容体や下流のシグナル分子に作用する天然化合物が、どのようにミオシン重鎖アイソフォームmRNAの発現増に作用するかを検討する。天然化合物には、シグナル活性化が報告される天然生理活性因子を用いる。C2C12筋芽細胞の筋管形成誘導開始時に、各種天然化合物を添加し培養後、Taqmanプローブを用いた定量PCR法を用いてミオシン重鎖クラスIIアイソフォームのmRNA発現量を検討した。

(3) 生体内(in vivo)において(2)を検討するため、加齢マウス(野生型マウス、老化促進モデルSAMマウス)を用いてミオシン重鎖アイソフォームの増加因子の分子機構を解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究において、速筋や遅筋を構成する骨格筋線維の発現と、カルシニューリンや骨格筋由来因子のIL-6等のシグナル伝達との関係に注目し、骨格筋萎縮の研究を検討した。遅筋を構成する骨格筋線維に多く存在するミオシン重鎖クラスImRNAの発現を調べたところ、分化誘導後の骨格筋細胞の培養液にカルシニューリン活性化剤の多価陽イオンを添加すると、発現レベ

ルの有意な上昇が認められた。また、IL-6 を培養液に外部投与すると、有意なミオシン重鎖クラス I mRNA の発現上昇が同様に見られた。両群にカルシニューリン阻害剤であるサイクロスポリン A を添加すると、ミオシン重鎖クラス I の mRNA 発現量増加に対する抑制効果が認められた。これらより、ミオシン重鎖クラス I の mRNA 発現増加にカルシニューリン活性化やマイオカイン の関与が示唆された。

(2)骨格筋より分泌される IL-6 においては、カルシニューリン活性化剤の多価添加において有意な mRNA 発現の上昇が認められた。この群にカルシニューリン阻害剤であるサイクロスポリン A を添加すると、この発現に対し抑制が有意に認められた。さらに、カルシニューリン活性化剤の多価陽イオン存在下に骨格筋細胞上の IL-6 受容体を阻害すると、IL-6 mRNA 発現の抑制が有意に認められた。これらより、分化誘導後の骨格筋細胞においてカルシニューリンシグナル活性化や IL-6 は、骨格筋由来 IL-6 の mRNA 発現上昇の機序に関わる事が示唆された。

(3) さらに ミオシン重鎖クラス I の mRNA 発現機序とカルシニューリンシグナルやマイオカインの関わりを調べるために、カルシニューリン活性化剤の多価陽イオン添存在下に骨格筋細胞上の IL-6 受容体を阻害すると、ミオシン重鎖クラス I の mRNA 発現が有意に抑制された。

(4)次に速筋を構成する骨格筋線維に多く存在するミオシン重鎖クラス II_b mRNA 発現について、分化誘導後の骨格筋細胞の培養液にカルシニューリン活性化剤の多価陽イオンを添加し調べたところ、有意な差が観察されなかった。同様に培養液に IL-6 を添加すると発現上昇が見られた。この IL-6 添加群に対し骨格筋細胞上の IL-6 受容体を阻害すると、ミオシン重鎖クラス II_b mRNA 発現の抑制が有意に認められた。この結果より、カルシニューリンシグナル活性化による IL-6 の mRNA 発現上昇の機序が、ミオシン重鎖クラス II アイソフォームの 1 つの発現に関わる可能性が示唆された。

(5) 上記目的(2)に関連し、天然化合物(食品由来因子)の検討のため、カフェオイルキナ酸や不飽和脂肪酸に注目し、速筋や遅筋を構成する骨格筋線維の発現調節を検討した。カフェオイルキナ酸投与後において、未投与群に比べミオシン重鎖クラス I mRNA 発現に有意な上昇がみられ、カフェオイルキナ酸とカルシニューリン阻害剤のサイクロスポリン A の同時投与群では、有意な抑制が見られた。これらは、不飽和脂肪酸(リノール酸など)においても、骨格筋細胞株や老化マウスを用いた解析においても同様の作用が認められた。

(6) 一方、ミオシン重鎖クラス II アイソフォームに対するカフェオイルキナ酸や不飽和脂肪酸による作用を調べたところ、速筋線維を構成するミオシン重鎖クラス II_bにおいて、mRNA 発現に有意な上昇がみられたが、この作用に対し IL-6 受容体の阻害が有効であった。このことから、ミオシン重鎖クラス II_b mRNA 発現の上昇作用は、骨格筋細胞の IL-6 発現による可能性が観察された。これらより、カフェオイルキナ酸や不飽和脂肪酸のミオシン重鎖への発現上昇作用は、クラス I においてはカルシニューリンシグナルによる機序が、クラス II_bにおいてはカルシニューリンシグナルにより誘導された骨格筋由来 IL-6 発現による機序が示唆された。

(7)高齢者や傷病者の身体能力回復のために行うリハビリテーションにおいて運動負荷を増加させると、瞬発力に関わる速筋より身体支持や持久力に関わる遅筋が増加する事が知られているが、それらの分子機構は未だ不明である。仮説の 1 つに、サルコペニアには運動神経と骨格筋の結合部である神経筋接合部の加齢変化の関与も示唆され、神経筋接合部においては、神経ペプチドの分泌が知られている。速筋や遅筋を構成する骨格筋線維の発現調節を知るために、これらの運動刺激関連神経ペプチドやそのシグナル下流因子の、ミオシン重鎖アイソフォームと IL-6 の mRNA 発現に対する作用を検討した。その結果、これらの神経ペプチドやそのシグ

ナル下流因子は、PKA シグナルによる調節を介し、ミオシン重鎖アイソフォームや IL-6 の発現への関与が示唆され、特に、ミオシン重鎖クラス I においては、カルシニューリンシグナル以外に mRNA 発現上昇作用を持つサブパスウェイを有する可能性が示唆された。このことから、これらの因子は、ミオシン重鎖クラス I や II アイソフォームの発現に関わるカルシニューリンシグナルなどの細胞内情報伝達機構への調節に関わる可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Yamaji, J. et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Modulating effects of unsaturated fatty acids on gene expression of myosin heavy chain class I and IIb in C2C12 myocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuromuscular Diseases	6. 最初と最後の頁 S287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JND-189001	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 Yamaji J et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Effect of calcineurin activation by organic acids on expression of interleukin-6 and myosin heavy chain class IIb mRNA levels in mouse myocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Muscle Res Cell Motil.	6. 最初と最後の頁 339-398.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-017-9490-8	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 Yamaji J et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Role of Interleukin-6 on upregulation of myosin heavy chain class IIb messenger RNA in mouse myocytes.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Neuromuscular Diseases	6. 最初と最後の頁 S210 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JND-160001	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 Yamaji J et al.	4. 巻 25(9-10)
2. 論文標題 Contribution of IL-6-dependent signalling mechanism to upregulation of MyHC IIb mRNA but not of MyHC IIa mRNA in mouse myocytes.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Neuromuscular Disorders	6. 最初と最後の頁 S309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nmd.2015.06.438	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yamaji, J. et al.
2. 発表標題 Modulating effects of unsaturated fatty acids on gene expression of myosin heavy chain class I and IIb in C2C12 myocytes
3. 学会等名 ICNMD2018 (15th International Congress on Neuromuscular Diseases 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaji, J. et al.
2. 発表標題 Essential role of calcineurin but not cAMP in mRNA expression of MyHC and IL-6 in murine myocytes
3. 学会等名 FAOPS2019 (第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会,神戸) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaji J et al.
2. 発表標題 Effect of calcineurin activation by organic acids on expression of interleukin-6 and myosin heavy chain class IIb mRNA levels in mouse myocytes
3. 学会等名 EMC2017 (46th European Muscle Conference) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本 奈緒、山路 純子他3名
2. 発表標題 マウス骨格筋におけるミオシン重鎖クラスIIb mRNA発現への不飽和脂肪酸の作用
3. 学会等名 保健医療学学会第8回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamaji J et al.
2. 発表標題 The effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on mRNA levels of myosin heavy chain class II (MyHC II) and interleukin (IL) -6 in mouse myocytes
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Yamaji et al.
2. 発表標題 The effect of interleukin (IL) -6 and long-chain unsaturated fatty acids on mRNA levels of myosin heavy chain class IIb (MyHC IIb) in murine myocytes.
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山路 純子 他
2. 発表標題 マウス骨格筋細胞におけるIL-6およびミオシン重鎖クラスI・IIのmRNA発現へのクロロゲン酸の作用
3. 学会等名 第7回総合福祉科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Junko Yamaji et al.
2. 発表標題 Role of Interleukin-6 on upregulation of myosin heavy chain class IIb messenger RNA in mouse myocytes
3. 学会等名 14th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yamaji J et al.
2. 発表標題 Role of unsaturated fatty acids on expression of myosin heavy chain type II b mRNA in mouse myocytes
3. 学会等名 第93回日本生理学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yamaji J et al.
2. 発表標題 Contribution of IL-6-dependent signaling mechanism to upregulation of MyHC b mRNA but not of MyHC a mRNA in mouse myocytes
3. 学会等名 20th International Congress of the World Muscle Society 2015 (WMS2015) (国際学会)
4. 発表年 2015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
研究分担者	宮崎 彩子 (Miyazaki Ayako) (20298772)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	廣島 玲子 (Hiroshima Reiko) (40404777)	関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授 (34431)	
研究分担者	森 禎章 (Mori Yoshiaki) (70268192)	関西福祉科学大学・保健医療学部・教授 (34431)	