

令和元年6月1日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08599

研究課題名(和文)筋萎縮、筋繊維化、脂肪化病態を制御するTGF-ファミリーの解析

研究課題名(英文) Analysis of TGF-beta family regulating muscle atrophy, fibrosis and fatty degeneration

研究代表者

土田 邦博 (Tsuchida, Kunihiro)

藤田医科大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30281091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイオジェニンと共に発現誘導されるマイオジェニンのプロモーター由来の長鎖非翻訳RNAを発見した。TGF-刺激での発現制御が確認された。RNAトラップ法と質量分析装置解析を駆使して、会合分子としてDEAD boxタンパク質を同定し、マイオジェニンの活性化機構を明らかにした。核酸阻害で筋萎縮緩和効果を証明した。RNA-seq法を用いて、筋萎縮阻害効果を有するBMP/GDFファミリーの発現誘導を示した。ヒト骨格筋由来間葉系幹細胞の培養系でドラッグリポジショニングの手法でスクリーニングし、脂肪化抑制薬と骨化抑制薬を同定した。飲水投与で効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は、生体最重量組織であるが、病態では、筋萎縮、異性脂肪化、骨化が見られ、生活の質の低下につながる。超高齢化社会を迎えた本邦では、サルコペニアが重要な疾患概念として認知されている。マイオジェニンは、胎生期の骨格筋で発現され筋形成を担うが、神経損傷時にも発現誘導される重要な転写因子である。本研究の成果から、新規長鎖非翻訳RNAによるマイオジェニンの新たな制御機構が明らかとなり、筋萎縮緩和に応用可能であることが解析され、社会的な意義は大きい。独自に開発した培養系による既存薬のスクリーニングで、異性脂肪化と骨化抑制役候補を見出し、生体でも効果があることを示したことは波及効果が大きい。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel antisense lncRNA derived from myogenin promoter. It is expressed with myogenin during muscle differentiation and is found essential for myogenesis. Using RNA pulldown and comprehensive proteomic analyses, DEAD-box protein, Ddx17, was identified as one of the lncRNA interacting proteins. By in vivo electroporation, knockdown of the lncRNA was effective to ameliorate neurogenic muscle atrophy. BMP/GDF family member was found upregulated during recovery from muscle atrophy by lncRNA knockdown. By using sophisticated differentiation culture system of mesenchymal stem cells from human skeletal muscle and drug screening, anti-histamine drugs were identified as inhibitors of ectopic fat generation and ectopic bone formation in skeletal muscle both in vitro and in vivo.

研究分野：医化学、病態医化学、細胞生物学、非翻訳RNA、ナノメディシン

キーワード：筋萎縮 筋分化制御 異所性脂肪 TGF-ファミリー マイオジェニン 長鎖非翻訳RNA 間葉系幹細胞
ドラッグリポジショニング

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、インスリンの主たる作用臓器であり、インスリン抵抗性改善薬の創薬標的である。しかしながら、骨格筋組織に存在する細胞を直接標的とする治療法は多くないのが現状であった。骨格筋由来のマイオカイン分泌因子であるマイオスタチンやアクチビンなどのTGF- β ファミリーが筋萎縮を誘導することが解析されてきた。マイオスタチン阻害抗体薬が開発され、筋萎縮抑制効果が検討されている。マイオスタチンとは逆に、TGF- β ファミリーのサブファミリーのGDF5(BMP14)、GDF6(BMP13)に筋肥大促進作用があることが解析されてきた。

筋萎縮は、加齢、神経遮断、悪液質、薬剤等によって誘発される。特に、超高齢者社会を迎えた日本では65歳以上の人口が25%に達しており、サルコペニア(加齢性筋肉減少症)が重要な疾患概念となっている。脳梗塞後の神経遮断による筋萎縮予防と治療、異所性骨化も重要課題である。また、筋萎縮に伴い、骨格筋内に脂肪細胞が出現し脂肪変性をきたすことが知られている。筋機能を損ない、身体活動の低下につながる要因となる。遺伝性および非遺伝性の筋萎縮に筋肥大療法が医学応用される可能性が議論されている。一方、骨格筋に存在する体性幹細胞として、筋芽細胞の起源となる筋衛星細胞の解析が進んでいたが、我々が発見した骨格筋間質に存在する間葉系幹細胞(Nature Cell Biol 12, 2010)は、筋衛星細胞とは異なり筋分化能は低いものの、脂肪細胞に分化しやすく、また、骨芽細胞や繊維芽細胞にも分化するユニークな細胞であった。筋衛星細胞の筋分化を補助する作用も有している。欧米では、fibrogenic progenitor (FAP)細胞とも呼ばれている。

骨格筋には異所性骨化が生じることが知られている。難病である進行性骨化性線維異形成症(FOP)(指定難病272)は、幼少時より全身の骨格筋や周囲の腱、靭帯などが徐々に骨化し、四肢の関節の可動域範囲が狭くなり、背中が変形し運動能が損なわれる疾患である。脳卒中や筋外傷、関節置換手術後、透析患者においても、異所性骨化が生じる。この元になる細胞は、我々が見出した、筋内に存在する間葉系幹細胞である。

2. 研究の目的

転写因子のマイオジェニン β は、MyoDの下流で作用し、筋分化後期に重要な役割を演じている筋分化制御転写因子の一つである。神経切断時にも、マイオジェニンは発現誘導され、筋タンパク質の分解と筋萎縮誘導に関与する。本研究では、マイオジェニンの転写誘導機構の解析から新規の長鎖非翻訳RNAを同定しその作用機序解明を行った。

申請者グループが発見した筋内で脂肪化・骨化を担う幹細胞の解析システムを用いる事で病態の治療法探索の基盤的研究を行った。特にヒト純化初代骨格筋培養細胞システムを用いたドラッグリポジショニングによる脂肪変性の抑制剤と骨化の抑制剤の探索に重点をおいた研究遂行を目的とした。既存薬のスクリーニングであるドラッグリポジショニング法により薬剤候補を網羅的に探索する研究に相当する。加齢性筋萎縮に関しては、筋萎縮誘導モデルの開発と治療法探索を目的とした。筋内間葉幹細胞が筋繊維の維持に作用する知見を進展させ、マウスモデルで、筋内間葉幹細胞を破壊させる実験系を構築し、筋萎縮誘導効果を検討した。

3. 研究の方法

マイオジェニン遺伝子のプロモーター領域を詳しく解析し、PCR、RACE法で、アンチセンス方向に発現する新規の長鎖非翻訳RNA(lncRNA)を同定した。培養細胞や組織形成過程での発現変化を定量PCRで検定した。lncRNAをBrUで標識し、骨格筋核抽出液と混合し、抗体でpull downし精製後、LC/MS/MS法で、会合分子を同定した。DEAD-boxタンパク質など複数の分子が同定されたため、ウェスタン、ChIP、ChIRP法で会合様式やゲノムとの結合を評価した。坐骨神経切除モデルで筋萎縮が生じるが、その系で、lncRNAを核酸で阻害し、筋萎縮の緩和を組織像と横断面積の計測で評価した。

正常ヒト筋由来の骨格筋組織から、セルソーターと低酸素培養法を用いて、筋衛星細胞と間葉系細胞系譜に分化する幹細胞を分離し高品質で純化して培養する技術を有している。PDGF受容体

抗体を間葉系細胞の純化に用いた。間葉系幹細胞は、筋分化への寄与は低いが、培養条件に応じて、骨芽細胞、脂肪細胞に分化する。96ウェルでの培養系で、既存薬ライブラリーから300種類以上の薬剤をスクリーニングした。脂肪分化培地で脂肪分化させる過程で薬剤を添加し、筋の脂肪化の抑制剤候補を探索した。第一世代の抗ヒスタミン薬が同定され、濃度依存性や細胞生存への影響を調べた。さらに、骨分化培地で骨芽細胞に分化させる過程で薬剤を添加し、骨化抑制剤候補薬を同定した。BMP経路との相関関係を検討した。生体での作用を検討するため、筋肉内脂肪化モデル、筋近傍異所性骨化モデルを構築し、飲水投与での阻害効果を検討した。

4. 研究成果

筋発生過程では、HLH型の転写因子である、MyoD、マイオジェニンなどのMyoDファミリーが、絶妙のタイミングで発現誘導され、筋衛星細胞からの増殖、分化、融合、筋線維形成過程を経て骨格筋の形成に関与している。神経遮断、筋損傷時の筋萎縮時においては、マイオジェニンの発現誘導、ユビキチンタンパク質分解系の活性化により筋量の減少が観察される。マイオジェニンのプロモーター領域から発現する新規長鎖非翻訳RNA核酸を発見した。当該lncRNAは胎児筋発生時

や初代筋培養細胞分化時にマイオジェニンと共に発現誘導される。マイオジェニンの発現誘導に必須であることが示された。TGF- β ファミリー/Smad系がその発現に関与していた。免疫沈降によるRNAトラップとLC/MS/MS解析を駆使して、結合分子を探索した。クロマチン免疫沈降法(ChIP)を駆使して、MyoDのコファクターでRNA結合タンパク質のDEAD boxタンパク質Ddx17が同定された。新規lncRNAのマイオジェニンの転写活性化に重要であることを示した。当該lncRNAがDdx17とヒストンアセチル化酵素PCAFとの会合を制御するという機構が解析された。マウスの骨格筋に損傷を最小限に抑えながら、障害核酸を遺伝子導入する条件を決定した。そして、坐骨神経切断時の筋萎縮過程で、新規lncRNAのノックダウン核酸を導入すると、筋萎縮が緩和されることを見出した。その系で、RNA-seq法を用いて、筋肥大効果のあるBMP/GDFファミリーの発現とそのシグナル伝達の増強が観察されることを示した。

正常ヒト筋由来の骨格筋組織から、セルソーターと低酸素培養法を用いて、筋衛星細胞と間葉系細胞系譜に分化する幹細胞を高品質で純化して培養する技術を有している。その系で、筋衛星細胞はCD56陽性細胞として純化し、市販のヒト細胞よりも筋分化が顕著に見られる。ミオシン重鎖の染色と染色イメージングで定量し、筋分化を定量可能な系を構築した。一方、間葉系幹細胞はPDGF受容体抗体を純化に用いた。間葉系幹細胞から脂肪細胞、骨芽細胞分化を定量してスクリーニングする手法を開発した。この系で、FDAで認可された既存薬ライブラリーから300種類以上の薬剤候補をスクリーニングした。筋の脂肪化の抑制剤候補と骨化抑制剤候補薬を同定した。脂肪化抑制薬としては、第一世代抗ヒスタミン薬が有力な候補であることがわかり、*in vivo*でも、飲水投与においても、脂肪化抑制が確認された。また、マウスの系譜追跡実験により、PDGF受容体陽性細胞から脂肪変性が生じることを示した。骨分化障害薬剤候補も同定した。異所性骨化誘導モデルを構築した。その系で骨化の抑制が観察された。

筋内の間葉系幹細胞を枯渇させるモデルを構築し、表現型を解析した。サルコペニアと類似した筋萎縮、体重減少、筋線維タイプの変化などを観察した。筋萎縮の原因となる分泌因子を探索し、候補因子を同定した。

最後に、細胞間コミュニケーションを担う分泌型膜小胞であるエクソソームへのタンパク質送達についての解析を進捗させた。ユビキチンドメインを有する機能未知のUBL3分子を同定した。筋芽細胞を含め多くの細胞から発現が見られた。ユビキチンとは異なる翻訳後修飾活性を有すること、その活性がUBL3と標的タンパク質のエクソソームへの分泌に重要であることを見出し報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

A. Uezumi, T. Kasai, K. Tsuchida. Identification, isolation, and characterization of mesenchymal progenitors in mouse and human skeletal muscle. *Skeletal Muscle Regeneration in the Mouse*, Springer Methods in Molecular Biology series 1460, 241-253(2016)

K. Tsuchida, K. Hitachi, M. Nakatani, A. Uezumi, H. Ageta. The role of myostatin and related factors in muscle hypertrophy and atrophy. In *Myostatin: Structure, Role in Muscle Development and Health Implications*, Nova Publishers (Dolores Christensen Eds.), Chapter 1. pp1-14 2nd Quarter(2016)

A. Uezumi, M. Nakatani, M. Ikemoto-Uezumi, N. Yamamoto, M. Morita, A. Yamaguchi, H. Yamada, T. Kasai, S. Masuda, A. Narita, Y. Miyagoe-Suzuki, S.-I. Takeda, S. Fukuda, I. Nishino, K. Tsuchida. Cell surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports* 7(2), 263-278(2016)

K. Hitachi, K. Tsuchida. Myostatin-deficiency in mice increases global gene expression at the Dlk1-Dio3 locus in the skeletal muscle. *Oncotarget* 8, 5943-5953(2017)

J. Hino, M. Nakatani, Y. Arai, K. Tsuchida, M. Shirai, M. Miyazato, K. Kangawa. Overexpression of bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) in adipose tissues protects against high-fat diet induced obesity with alteration of energy expenditure. *Int. J. Obesity* 41(4), 483-488(2017)

T. Kuroiwa, H. Ageta, D. Ikeda, M. Morita, K. Tsuchida, H. Yamada. Serum level of PRDX6 is elevated in osteoarthritis patients 3 months after surgery. *Clinics in Surgery* 2, 1378(2017)

A. Hashiguchi, K. Hitachi, W. Zhu, J. Tian, K. Tsuchida, S. Komatsu. Mung bean (*Vigna radiata* (L.)) coat extract modulates macrophage functions to enhance antigen presentation: a proteomic study. *J. Proteomics* 161, 26-37(2017)

C. Kimura, H. Ageta, H. Yamaguchi, T. Kuroiwa, D. Ikeda, M. Morita, K. Hayakawa, K. Tsuchida, H. Yamada. A comprehensive proteomics analysis of blood sera from patients of osteoarthritis.-Comparative study before and after total joint replacement surgery - *J. Orthopedic Research Therapy JORT*-131 (2017)

H. Sakai, S. Fukuda, M. Nakamura A. Uezumi, Y.-t. Noguchi, T. Sato, M. Morita,

H. Yamada, K. Tsuchida, S. Tajbakhsh, S.-i. Fukada. Notch ligands regulate the muscle stem-like state ex vivo but are not sufficient for retaining regenerative capacity. *PLoS ONE* 12(5), e0177516 (2017)

T. Kasai, M. Nakatani, N. Ishiguro, K. Ohno, N. Yamamoto, M. Morita, H. Yamada, K. Tsuchida, A. Uezumi. Promethazine hydrochloride inhibits ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 187(12), 2627-2634(2017)

X. Li, S. Rehman, H. Yamaguchi, K. Hitachi, K. Tsuchida, T. Yamaguchi, Y. Sunohara, H. Matsumoto, S. Komatsu. Proteomic analysis of the effect of plant-derived smoke on soybean during recovery from flooding stress. *J. Proteomics* 181, 238-248(2018)

K. Tsuchida, M. Nakatani, K. Hitachi. Therapeutic strategies against muscular dystrophy and related atrophic disorders. *J. Translational Science* 5(5), 1-3(2018)

H. Ageta, N. Ageta-Ishihara, K. Hitachi, O. Karayel, T. Onouchi, H. Yamaguchi, T. Kahyo, K. Hatanaka, K. Ikegami, Y. Yoshioka, K. Nakamura, N. Kosaka, M. Nakatani, A. Uezumi, T. Ide, Y. Tsutsumi, H. Sugimura, M. Kinoshita, T. Ochiya, M. Mann, M. Setou, K. Tsuchida. UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nature Communications* 9, 3936(2018)

K. Hitachi, M. Nakatani, A. Takasaki, Y. Ouchi, A. Uezumi, H. Ageta, H. Inagaki, H. Kurahashi, K. Tsuchida. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. *EMBO Reports* e47468 (2019)

K. Tsuchida. Evaluation of clinical outcomes of pancreatic cancer patients using circulating nucleic acids. *Translational. Gastroenterol. Hepatology* 4, 2 (2019)

H.M. Jhanzab, A. Razzaq, Y. Bibi, F. Yasmeen, H. Yamaguchi, K. Hitachi, K. Tsuchida, S. Komatsu. Proteomic analysis of the effect of inorganic and organic chemicals on silver nanoparticles in wheat. *International J. Molecular Sciences* 20(4), 825 (2019)

T. Nagaoka, M. Furuse, T. Ohtsuka, K. Tsuchida, M. Kishi. Vangl2 interaction plays a role in the proteasomal degradation of Prickle2. *Scientific Reports* 9, 2912 (2019)

M. Aslam, S.u. Rehman, A. Khatoon, M. Jamil, H. Yamaguchi, K. Hitachi, K. Tsuchida, X. Li, Y. Sunohara, H. Matsumoto, S. Komatsu. Molecular responses of maize shoot to plant derived smoke solution. *International J. Molecular Sciences* 20, 1319 (2019)

K. Hitachi, M. Nakatani, K. Tsuchida. Long non-coding RNA Myoparr regulates GDF5 expression in denervated mouse skeletal muscle. *Non-coding RNA* 5(2), 33 (2019)

M. Ikemoto Uezumi, A. Uezumi, L. Zhang, H. Zhou, N. Hashimoto, K. Okamura, Y. Matsui, K. Tsukazaki, T. Hosoyama, M. Nakatani, M. Morita, H. Yamada, K. Tsuchida, S.I. Fukada. Cachexia, Sarcopenia and Muscle, rapid communication. *Clinical Reports* 2 (1), e00081 (2019)

〔学会発表〕(計 15 件)

上田洋司、華表友暁、畠中謙、吉岡祐亮、小坂展慶、常陸圭介、落谷孝広、瀬藤光利、土田邦博. 新規翻訳後修飾因子 UBL3 は、エクソソームへのタンパク輸送を制御する、第 8 回日本 RNAi 研究会・第 3 回日本細胞外小胞学会、広島、8 月 31 日 (2016)

日野純、中谷直史、荒井勇二、土田邦博、宮里幹也、寒川賢治. BMP-3b 過剰発現マウスの脂肪肝抑制作用、第 89 回日本生化学会大会、仙台、9 月 25-27 日(2016)

黒岩宇、上田洋司、土田邦博、山田治基. 変形性関節症の新規バイオマーカー解析、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、10 月 13-14 日(2016)

笠井健広、上住聡芳、土田邦博 他. プロメタジンは骨格筋異所性骨化を抑制する、名古屋、第 4 回若手筋学会、11 月 14-15 日(2016)

常陸圭介、高崎昭彦、土田邦博. *Myogenin* 遺伝子のプロモーター領域に由来する新規 lncRNA は、ホストである *myogenin* 遺伝子の活性化に必要である、第 4 回若手筋学会、名古屋、11 月 14-15 日(2016)

常陸圭介、土田邦博 他. RNA 結合タンパク質を介した新規 lncRNA による骨格筋細胞の分化制御機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2016)、横浜、11 月 30-12 月 2 日(2016)

笠井健広、上住聡芳、石黒直樹、大野欽司、山田治基、土田邦博. Promethazine hydrochloride は骨格筋の脂肪化を抑制する、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、3 月 7-9 日(2017)

T. Kasai, A. Uezumi, M. Nakatani, K. Ohno, K. Tsuchida et al., Promethazine hydrochloride inhibits ectopic fat formation in skeletal muscle, ORS (Orthopaedic Research Society) 2017 Annual Meeting, San Diego, CA, USA, March 19-22 (2017)

土田邦博. サルコペニアの治療法開発の現状、第 38 回日本肥満学会シンポジウム 10(招待)、大阪、10 月 7-8 日(2017)

上田洋司、落谷孝広、瀬藤光利、土田邦博 他. 新規翻訳後修飾因子 UBL3 によるエク

ソソームへのタンパク質輸送機構、第 10 回日本 RNAi 研究会・第 5 回日本細胞外小胞学会、
広島、8 月 29-31 日 (2018)

中谷直史、土田邦博。ヒト骨格筋由来細胞を用いた分子スクリーニング、第 39 回日本肥満学会、神戸、10 月 7-8 日 (2018)

K. Tsuchida. Characterization of Small Extracellular Vesicles, Exosomes, as a Novel Drug Delivery Vehicle for Proteins. BIT 's 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (invited), Fukuoka, Japan, October 6-7 (2018)

K. Hitachi, K. Tsuchida. Promoter-associated long non-coding RNA, *Myoparr*, is a novel regulator of skeletal muscle cell differentiation and skeletal muscle atrophy. RNA Biology CSH Asia, Suzhou, China, Oct 29-Nov. 2 (2018)

常陸圭介、土田邦博。転写調節領域から発現する新規長鎖非コード RNA *Myoparr* を介した新たな筋分化制御機構の解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017、フォーラム 4F09、神戸、12 月 6-9 日 (2018)

T. Kusano, M. Nakatani, A. Uezumi, T. Seki, K. Ohno, H. Yamada, K. Tsuchida. Drug X inhibits heterotopic ossification by suppression of BMP2-Smad1/5/8 signaling, ORS (Orthopaedic Research Society) 2019 Annual Meeting, Austin, TX, USA, Feb 2-5 (2019)

〔図書〕(計 4 件)

常陸圭介, 中谷直史, 上住聡芳, 土田邦博。マイオスタチンによる骨格筋量調節 サルコペニア The Lipid 特集企画 メディカルレビュー社 27(1), 23-28 (2016)

土田邦博, 上住聡芳。老化制御と疾患-エイジング研究の進歩-、日本臨床特集号「老化制御と疾患 -エイジング研究の進歩-」III。老化制御と疾患 老化とサルコペニア 74(9), 1554-1559 (2016)

土田邦博。Loco Cure 先端医学社 特集タイトル：サルコペニアとロコモ クリニカルクエスチョン サルコペニアの薬剤開発状況, 2(3), 242-243(2016)

土田邦博, 中谷直史, 常陸圭介。サルコペニアの臨床研究、老年医学(上)日本臨床増刊号 pp579-583 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/>

6. 研究組織

研究分担者氏名：中谷 直史

ローマ字氏名：NAKATANI, Masashi

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：総合医科学研究所・難病治療学研究部門

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 00421264

研究分担者氏名 : 常陸 圭介

ローマ字氏名 : HITACHI, Keisuke

所属研究機関名 : 藤田医科大学

部局名 : 総合医科学研究所・難病治療学研究部門

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁): 10508469

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。