

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03934

研究課題名(和文) ホルモンと糖鎖から迫る骨格筋組織の質的・量的制御のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of qualitative and quantitative control of skeletal muscle tissue approached by hormones and glycosaminoglycan

研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA, Yoshinao)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00337023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋修復過程での組織学的解析やコンドロイチン硫酸(CS)の合成・分解関連酵素の解析から、CSが筋芽細胞の分化制御、筋芽細胞の分化ステージへの円滑な移行を促す因子であると考えられた。また、低エストロゲン(E2)状態での筋修復過程での組織解析と筋量回復について、卵巣除去(OVX)マウス、遺伝子改変マウスを用いて解析した。低E2状態で筋損傷が惹起されると組織の回復は遅延するが、OVXマウスにE2を追加的に投与することで組織が回復しやすくなること、また、筋再生への関与はE2受容体Esr2がEsr1よりも高いことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモンと糖鎖に主眼をおき、筋組織の修復過程でのこれら因子の関与の解明と筋量の制御を試みた。損傷筋組織の回復には、女性ホルモン・エストロゲン(E2)が重要であり、その際、E2の受容体であるEsr2を介する機構が主に機能していると考えられた。また、組織学的解析や検索対象とした糖鎖(コンドロイチン硫酸(CS))の合成や分解に関連する酵素の解析から、CSの合成/分解関連酵素は、炎症時に多量に発現し、それらは、炎症性細胞によって産生されている可能性を示した。CSは体内で筋分化制御因子として機能しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Based on histological analysis in the muscle repair process and analysis of chondroitin sulfate (CS) synthesis/degradation-related enzymes, CS is a factor that promotes the regulation of myoblast differentiation and the smooth transition to the differentiation stage of myoblasts. In addition, the tissue analysis and muscle mass recovery in the muscle repair process in the low estrogen (E2) state were analyzed using ovariectomized (OVX) mice and gene-modified mice. Tissue recovery is delayed when muscle damage is induced in a low E2 state, but it is recovered by additional administration of E2 to OVX mice. And it is suggested that E2 receptor Esr2 is involved in muscle regeneration more than Esr1.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ホルモン 糖鎖 エストロゲン コンドロイチン硫酸 chst ヒアルロニダーゼ 筋芽細胞 再生

1. 研究開始当初の背景

過去の研究報告やこれまでの我々の研究成果を総合すると、筋組織の質的、量的制御をエストロゲンとコンドロイチン硫酸 (CS) が担っている可能性が十分に考えられた。すなわちエストロゲンが筋組織を構成する細胞を刺激して CS 産生を誘導し、CS が筋組織の持続的な発達や恒常性の維持に貢献している可能性である。しかし、筋組織に作用したエストロゲンがどのような種類の CS 産生を促し、また、いかなる機構で筋組織に作用しているのか未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲンと CS の筋分化および脂肪分化への影響を解析したうえで、エストロゲンと CS の機能を応用し、筋量回復 (制御) を試みることを目的とした。具体的には、以下の課題に取り組んだ。①筋芽細胞および脂肪細胞のエストロゲン (17beta-エストラジオール:E2) 刺激による CS 合成酵素の解析、②筋修復過程での CS 合成・分解酵素の発現動態の解析、③低 E2 状態での筋修復過程での組織解析と筋量回復の試み、である。

3. 研究の方法

(1) 筋芽細胞および脂肪細胞の E2 刺激による CS 合成関連酵素の発現解析

筋芽細胞 C2C12、脂肪細胞 3T3-L1 に 0.1~1,000nM の E2 を曝露し、分化誘導した状態で E2 受容体 (*Esr1*, *Esr2*) およびコンドロイチン硫酸合成関連酵素であるコンドロイチン硫酸基転換酵素 (Chst: *Chst12*, *Chst15*, *Chst3* および *Ust*) の各遺伝子発現について、リアルタイム PCR による相対定量解析を行った。

(2) 筋修復過程での CS 合成・分解酵素の発現動態の解析

マウスの前脛骨筋に 50%グリセロールで筋損傷を誘導して筋再生を人為的に誘導した組織を、経時的 (3 から 28 日目) に採取し、形態学的に解析した。加えて、損傷筋中の *Esr1*, *Esr2* およびコンドロイチン硫酸合成関連酵素であるコンドロイチン硫酸基転換酵素 (Chst: *Chst12*, *Chst15*, *Chst3* および *Ust*) および、CS 分解酵素である (ヒアルロニダーゼ: *Hyal1*, *Hyal2*) の発現をリアルタイム PCR 検索した。

(3) 低 E2 状態での筋修復過程での組織の解析と筋量回復の試み

野生型、*Esr1* ノックアウト (KO) マウスおよび、*Esr2*KO マウスの卵巣を摘出して、低 E2 状態のマウス (OVX マウス) 作成した。その後、前脛骨筋にカルディオトキシン (CTX) で筋損傷を誘導し、筋組織の形態計測を行うとともに、OVX マウスに E2 を腹腔内に投与し、筋線維径の回復、すなわち筋量の回復を試みた。

4. 研究成果

(1) 筋芽細胞および脂肪細胞の E2 刺激による CS 合成酵素の発現解析

C2C12 では、*Esr1* および *Esr2* は筋分化誘導下で E2 の濃度に応じて発現量は増加したが、濃度依存的ではなかった。*Chst3* は、分化誘導によってその発現がよって低下したが、E2 による影響ではなかった。他の Chst も E2 による影響はほとんど認められず E2 単独では C2C12 の Chst 群の発現に影響を及ぼさないと推測した。一方、3T3-L1 では分化誘導によって、検索した 4 つの Chst のうち、3 つで発現が抑制されたが、この抑制は E2 の有無にかかわらず惹起された。E2 単独では C2C12 および 3T3-L1 の Chst 群の発現に、*in vitro* レベルにおいて、影響を及ぼさないと推測した (図 1)。

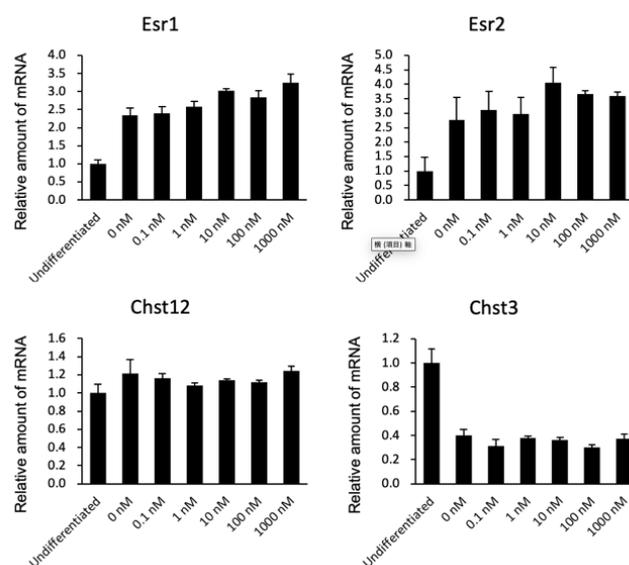


図1 筋芽細胞C2C12のE2刺激によるCS合成酵素の解析
Esr1, *Esr2*は、E2の濃度に応じて発現量は増加した。分化によって*Chst3*の発現は低下したが、E2による影響は認められなかった。他のChst (*Chst12*のみ掲載)も、E2による影響はほとんど認められなかった。

(2) 筋修復過程でのCS合成・分解酵素の発現動態の解析

損傷3日のマウスの前脛骨筋の組織では、ほとんどが損壊し、線維間には炎症性細胞の浸潤像を観察した。しかし、28日目には線維径は、損傷前と同レベルまで回復した(図2A)。

*Esr1*の発現は損傷筋では、観察期間を通して対照筋と比較して有意に高い値を示し、3日に発現量のピークに達した。*Esr2*の発現量も、期間を通して対照筋と比較して有意に高く、そのピークは7日であった。Chst群の発現は、種類によって発現ピークに違いはあるが、総じて筋損傷誘導後3日および7日で高値を示した。Chstの発現に同調するようにCS分解酵素(Hyal1およびHyal2)も3日に発現のピークを示したが、その後は対照筋と同レベルまで低下した(図2B)。3日の炎症部位を免疫組織化学的に検索したところ、多数のChst12、Hyal1陽性細胞を検出した。

ChstおよびHyal陽性細胞がいかなる細胞かは、解明の途中であるが、その分布や出現のパターン、細胞の形態の特徴などから、これらの陽性細胞は一部筋線維の可能性も残るが、炎症性細胞である可能性が高いと考えられる。CSは炎症性細胞の貪食機能やサイトカインの分泌能を向上させることから、Chst群の3日(炎症期)での高発現は、炎症性細胞の損傷部への遊走や損傷筋組織の除去の促進を反映しているのかもしれない。一方で、CSは筋芽細胞の分化を抑制することから、Hyalは、筋組織中の過剰なCSを低下させて、筋芽細胞の分化ステージへの円滑な移行を促している可能性が示唆された。

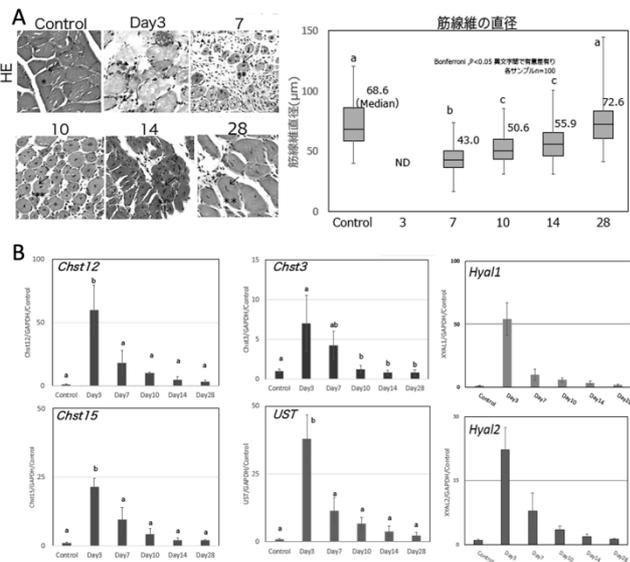


図2 筋修復過程での組織像と、CS合成・分解酵素の発現

A: 組織像を見ると、損傷3日では組織全体に損傷が惹起され、好中球やマクロファージと思われる細胞が多数いた。7日では、3日と同様に、好中球等が観察され、筋再生初期の特徴である中心核を持つ筋線維が観察された。10、14日では組織全体で中心核を有する筋線維が観察された。また、筋線維の直径(中央値)も、組織損傷後、日を追うごとに増加し、28日では、線維径は損傷前と有意差はなくなった。B: 検索したいずれの因子も、3日の発現が顕著であった。また、Chstの発現に同調するように、CS分解を担うヒアルロニダーゼ(Hyal)の発現も3日でピークに達した。

(3) 低E2状態での筋修復過程での組織の解析と筋量回復の試み

8週齢の野生型マウスにOVX処置をし、4週間かけて低E2状態のマウスを作成した。12週齢時にCTXを前脛骨筋(TA)中に投与し(OVX/CTX群)、その回復過程を14日間観察しOVX処置しなかった群(Intact/CTX群)と比較した(採取は16週齢)。その結果、筋線維径を指標にした筋組織の再生は、OVX/CTX群で遅延することが明らかとなった(図3A)。

続いて、OVX/CTX群に溶媒(DMSO)に融解させたE2を4日ごとに4週間にわたり腹腔内に投与をし(OVX/CTX/E2群)、筋線維の回復の程度を検討した。OVXマウスにE2を投与(OVX/E2群)すると、DMSOのみを投与した群(OVX/DMSO)と比較して有意差を認めなかったが、線維径は増加した。OVX/CTX/E2群の線維径は、E2を腹腔投与しなかったOVX/CTX/DMSO群より有意に大きかった(いずれもE2

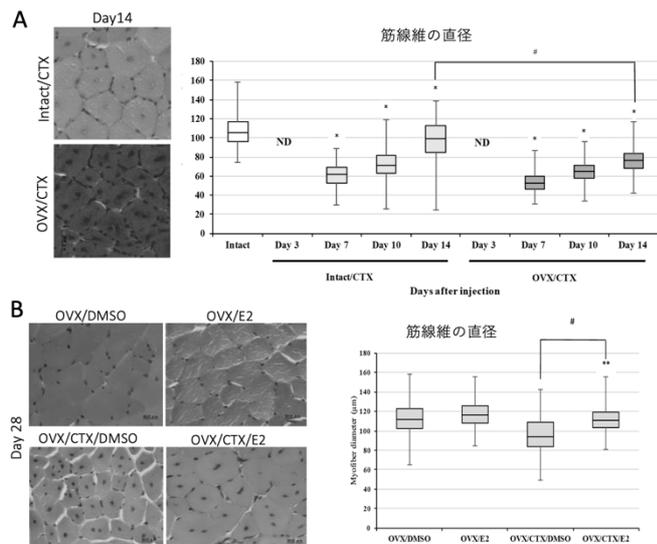


図3 低E2状態での筋修復過程での組織解析とその回復程度

A: CTXをTA中に投与し(OVX/CTX群)、その回復の様子を14日間観察した。OVX処置しなかった群(Intact/CTX群)と比較したと、再生される筋線維径は、OVX/CTX群で遅延した。B: OVX/CTX群にDMSOに融解させたE2を4週間腹腔内投与し、(OVX/CTX/E2群)、筋線維の回復の程度を検討した。OVXマウスにE2を投与(OVX/E2群)すると、DMSOのみを投与した群(OVX/DMSO)と比較して有意差を認めなかったが線維径は増加した。OVX/CTX/E2群の線維径は、E2を投与しなかったOVX/CTX/DMSO群より有意に大きかった(図3B)。

投与開始後 28 日目の比較)。ただし、筋線維の中心に核を有していたことから、線維の回復は完了していないと判断した (図 3B)。以上より、低 E2 状態下の筋組織に E2 を投与しただけでは筋線維の再生は促進されないが、CTX によっていったん筋線維が破壊されることで、線維の再生が促進される可能性が考えられた。

TA 中の Esr1 および Esr2 のタンパク量は、OVX 処置したものは Esr2 が Esr1 より高かった。その値は、OVX/CTX 群の処置後のどのタイムポイントでも、Esr2 が多いことが分かった。OVX 処置した EsrKO マウスの線維径は、Esr2KO が Esr1KO より有意に低い値を示した。加えて、これら EsrKO マウスに CTX 処理すると、Esr2KO マウスの筋線維径の回復は、Esr1KO と比較して大幅に遅延していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 MAHDY Mohamed A. A., WARITA Katsuhiko, HOSAKA Yoshinao Z. | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 Glycerol induces early fibrosis in regenerating rat skeletal muscle | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science | 6. 最初と最後の頁 1646 ~ 1649 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0328 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 MAHDY Mohamed A. A., WARITA Katsuhiko, HOSAKA Yoshinao Z. | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Neutralization of transforming growth factor (TGF)- 1 activity reduced fibrosis and enhanced regeneration of glycerol-injured rat muscle | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science | 6. 最初と最後の頁 168 ~ 171 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0446 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 保坂善真 |
| 2. 発表標題 コンドロイチン硫酸を通して明らかとなった筋管の形成 |
| 3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会シンポジウム「透けてきたSkeleton構造-骨格筋・結合組織の形態形成機構とその利用-」 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 保坂善真、鷲江壮太、ラッタナトライ=チャイヤシン、割田克彦 |
| 2. 発表標題 筋組織修復過程におけるコンドロイチン硫酸合成・分解関連酵素の発現とその機能 |
| 3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 鷲江壮太、割田克彦、保坂善真 |
| 2. 発表標題 筋再生過程でのコンドロイチン硫酸合成・分解酵素の動態 |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rattana-trai Chaiyasing, Katsuhiko Warita, Yoshinao Z. Hosaka |
| 2. 発表標題 Functional analysis of estrogen in the process of myogenesis and myoregeneration |
| 3. 学会等名 The 7th Asian Association of Veterinary Anatomists (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sota Washie, Katsuhiko Warita, Yoshinao Z. Hosaka |
| 2. 発表標題 analysis of dynamics of chondroitin sulfate-synthesis and -degrading enzymes during muscle regeneration |
| 3. 学会等名 The 7th Asian Association of Veterinary Anatomists (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuhei Ogura, Sota Washie, Rattana-trai Chaiyasing, Katsuhiko Warita, Yoshinao Z. Hosaka |
| 2. 発表標題 Creation of scaffold derived from muscle tissue and evaluation of its function |
| 3. 学会等名 The 7th Asian Association of Veterinary Anatomists (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 保坂善真、鷺江壮太、割田克彦 |
| 2. 発表標題 筋再生過程で特徴的なコンドロイチン硫酸合成および同分解酵素の発現と産生細胞の同定 |
| 3. 学会等名 第125回日本解剖学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rattana-trai Chaiyasing, Katsuhiko Warita, Yoshinao Z. Hosaka |
| 2. 発表標題 Comparative study of morphological change during myoregeneration in cardiotoxin-injured muscle |
| 3. 学会等名 第125回日本解剖学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 鳥取大学農学部ホームページ http://staff.muses.tottori-u.ac.jp |
|--|

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 | 割田 克彦 (WARITA Katsuhiko) (40452669) | 鳥取大学・農学部・准教授 (15101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 樋口 雅司 (HIGUCHI Masashi) (70614791) | 鳥取大学・農学部・講師 (15101) | |
| 研究 協力者 | 田村 純一 (TAMURA Jun-ichi) | 鳥取大学・農学部・教授 (15101) | |