

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：17K01487

研究課題名(和文) 加齢性筋萎縮症における筋衛星細胞の恒常性変化とNrf2/オートファジー系の関与

研究課題名(英文) Homeostatic changes in muscle satellite cells and involvement of Nrf2 / autophagy system in age-related myopathy

研究代表者

系数 万紀 (Itokazu, Maki)

近畿大学・大学病院・助教

研究者番号：90780015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、加齢性の筋減退である「サルコペニア」における組織恒常性の破綻を解明するため、筋衛星細胞に注目し、抗酸化マスター遺伝子であるNrf2、活性酸素、老化で低下するオートファジー(自食作用)と筋恒常性の関連の検討である。Nrf2の発現低下は、炎症や細胞老化に関わるmiRNA-155の発現を上昇させることを見出した。また、miRNA-155とオートファジーの関わりについては、筋芽細胞細胞株C2C12において、miRNA-155がミトコンドリア選択的オートファジーの阻害に関わることを発見した。以上より加齢性の筋減退はmiRNA-155の多面的な作用により惹起されるという研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは、高齢者におけるQOLの低下の主因とされるが、加齢性筋減退の機序は未だほとんどが解明されておらず、有効な予防的介入方法は少ない。

本研究では、加齢に伴う筋組織恒常性の破綻を解明するために、筋衛星細胞に注目し研究を行った。加齢性の筋減退はmiRNA-155の多面的な作用により惹起されるという研究成果を得ることができた。これら成果によりmiRNA-155の制御によるサルコペニアの予防や回復の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on muscle satellite cells in order to elucidate the breakdown of tissue homeostasis in "sarcopenia," which is age-related muscle decline. We have been studying the relationship between the antioxidant master gene Nrf2, reactive oxygen species, aging-decreased autophagy, and muscle homeostasis. It was found that decreased expression of Nrf2 increased the expression of miRNA-155, which is involved in inflammation and cell aging. Regarding the relationship between miRNA-155 and autophagy, we found that miRNA-155 is involved in the inhibition of mitochondrial selective autophagy in the myoblast cell line C2C12. From the above, we obtained research results that age-related muscle decline is caused by the multifaceted action of miRNA-155.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：サルコペニア 筋衛星細胞 Nrf2 miRNA-155

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)サルコペニアは加齢性の筋組織減退症である。筋組織の退行と脂肪による置換は筋力の減衰をまねき高齢者の活動性を低下させる直接の要因となる。生産年齢人口が急速に減少する我が国において、高齢者の積極的な社会参加は必須であり、これをサポートする治療法の確立は極めて優先性が高い課題である。加えて、サルコペニアに起因する寝たきり、嚥下障害、呼吸障害は介護負担の増大に直結するため、医療・福祉経済の観点からも喫緊の課題である。

(2)組織の恒常性(ホメオスタシス)は組織体細胞の代謝とともに、損傷時などにこれを補完する幹細胞によって維持されている。筋組織においては筋衛星細胞(Satellite cell、MuSCs)が筋細胞の補給源として機能し、組織量の維持にあっている。一方で、幹細胞機能は加齢により低下することが広く知られている。すなわち、幹細胞機能の維持・向上は抗老化を考える上での「鍵」である。筋組織においても、加齢によりMuSCsの数が減少することがすでに報告されている⁽¹⁾。その機序としては、活性酸素など⁽²⁾様々なストレスが分化誘導のシグナルとなり、幹細胞プールを減らすと考えられているが、詳細な機序は不明である。

2. 研究の目的

(1)申請者の仮説は、『活性酸素を始めとする老化関連ストレス(SASPs)がMuSCsのオートファジー、Keap1-Nrf2機構を介しその恒常性を変化させ、MuSCsの筋芽細胞への分化状態を変化させる。これにより幹細胞が枯渇し、中長期的な筋再生阻害によりサルコペニアに至る』というものであり、これを証明することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(1)in vitroにおいて老化関連因子がMuSCsの活性酸素を誘導し、Nrf2活性抑制を介してオートファジーを阻害することを明らかにする。具体的には、モデル細胞から筋芽細胞(MyoDを指標)への分化を観察する。この老化関連因子による休止期からの逸脱におけるNrf2の関与の有無を探る。さらに、オートファジー活性が老化関連因子で変動するかを検討する。また、オートファジー活性の阻害剤・活性剤によりNrf2、活性酸素の変動を検討するとともに、MuSCsの細胞周期などを観察する。

(2)in vivoにおいて老化、Nrf2の発現と筋再生の関係性を明らかにする。老化促進マウス(SAMP8)対照マウス(SAMR1)およびNrf2ノックアウトマウスにおいて、生体組織における筋肉量(マイクロCT)、組織変化、電子顕微鏡によるオートファゴソームの観察を行う。さらにCardiotoxin(CTX)による筋挫傷モデルにおいて、組織再生との関係性を明らかにする。

4. 研究成果

研究過程で、われわれは、少量の検体から抽出可能であり、発現量と組織障害の相関性を期待しやすいmiRNAについて筋障害性を観察することとした。miRNAは臨床、基礎医学研究分野で研究が進められており、新たなバイオマーカーとして注目されている。中でも加齢組織やさまざまな慢性炎症で発現が賦活化されると報告されているmiRNA-155に着目し、Nrf2の発現低下は、mRNA-155の発現を上昇させることを見出した。

(1)老齢マウスの筋衛星細胞(MuSCs)についての検討。

若齢マウスと老齢マウスのMuSCsをFACSで抽出した。miRNA-155は老齢マウスで有意に増加していた。分化マーカーは老齢マウスで有意に増加していた。

(2) miRNA-155 は高齢筋肉の MuSCs の活性化に与えるかを検討した。キュメート細胞を用いて miRNA-155 を強発現し筋分化マーカーを観察した。PCR でもウエスタンブロットでも筋分化マーカーはコントロールに比べ有意に増加していた(図1.)。

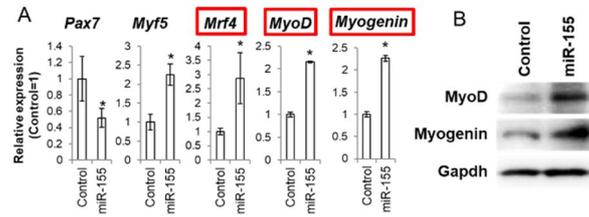


図1. Cumate誘導システムを用いたmiRNA-155発現誘導と筋分化マーカーの発現。

(3) miRNA-155 の発現とその役割を筋肉損傷のマウスモデルを用いて観察した。マウスの脛骨筋に筋損傷を作製し、一定期間を置いて脛骨筋を回収、MuSCs を FACS で抽出した。MuSCs の数は損傷後3日目まで増加し、9日目に正常レベルに戻った。miR-155 の発現は損傷後1日目に Sham (シャム) に対し 80~100 倍に上昇し、9日目まで徐々に低下した。損傷後3日目の MuSCs では未分化マーカーは有意に低下し、分化マーカーは有意に上昇していた。

(4) 次に C/ebp に注目した。C/ebp は MuSCs の未分化状態を維持するための必須分子である、またマウス、ヒトにおいて miRNA-155 の直接の標的分子であることが報告されている⁽³⁾。(3)と同様の筋損傷マウスの MuSCs を観察した。C/ebp の発現は損傷後1日目で上昇し3日目から6日目まで有意に抑制された。損傷後2日目では C/ebp は過剰発現し、分化マーカーが抑制されていた。

結果(3).(4)より C/ebp は筋分化を阻害し、その発現は miRNA-155 によって抑制されることがわかった。

(5) miRNA-155 が損傷による筋分化に重要であるかどうか、miRNA-155 ノックアウト C2C12(筋芽細胞細胞株)を用いて検討した。CRISPR-Cas9 を用いて miRNA-155 ノックアウト C2C12 を作製し GFP で標識し、筋損傷マウスに移植した。ワイルドタイプと比べ、C/ebp と未分化マーカーは上昇し、筋分化マーカーは低下していた(図2.)。筋損傷による筋分化は、miRNA-155 が C/ebp を介して起こると考えられた。

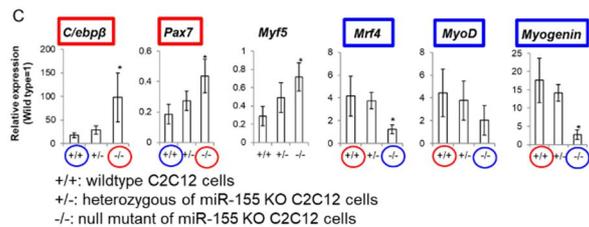


図2. miRNA-155 ノックアウト C2C12 を筋損傷マウスに移植後の C/ebp と筋未分化マーカー、筋分化マーカーの発現。

(6) 高齢筋組織で発現が低下するとされる Notch1 が miRNA-155 のリプレッサーとして作用するかを検討した。Notch1 フロックフロクマウスを用いて Notch1 のノックアウト細胞を作製した。IL-1 を添加し炎症の状態にすると Notch1 のノックアウト細胞で miRNA-155 の発現は有意に上昇した。クロマチン免疫沈降の結果からも、Notch1 は、miR-155 の宿主遺伝子のプロモーター領域に結合し、miRNA-155 の発現を抑制した。

上記(5)(6)より miRNA-155 は、C/ebp の抑制を介して筋分化を活性化することがわかった。高齢筋肉における miRNA-155 の発現増加の1つの理由は、Notch1 発現の減少であると考えられた。

miRNA-155 とオートファジーの関りについては、C2C12 において、miRNA-155 がミトコンドリア選択的オートファジーの阻害に関わることを発見した。以上のことから高齢性の筋減退は

miRNA-155 の多面的な作用により惹起されるという研究成果を得ることができた。組織、個体の老化における“幹細胞の老化”において、トリガーとなる分子、機序の解明は大きな課題である。特定の miRNA が幹細胞の自己複製の抑制や分化が活性化され幹細胞枯渇につながるということが報告されており本研究での miRNA-155 も今後、筋肉の老化についての機序の一部を担う分子である可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Blau HM, et al. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nat Med.* 2015; 21(8):854-62.
- 2) Ester S, et al. Myomir dysregulation and reactive oxygen species in aged human satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Apr 29;473(2):462-70.
- 3) Buck M, et al. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell.* 2001 Oct;8(4):807-16.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Onodera Yuta, Teramura Takeshi, Takehara Toshiyuki, Itokazu Maki, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji	4. 巻 13
2. 論文標題 Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 204860-204881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204860	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 系数万紀、小野寺勇太、竹原俊幸、寺村岳士、福田寛二
2. 発表標題 炎症関連miR-155はc/ebp の抑制を介して筋衛星細胞の分化を促進する
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019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	寺村 岳士 (Teramura Takeshi) (40460901)	近畿大学・大学病院・講師 (34419)	
研究分担者	福田 寛二 (Fukuda kanji) (50201744)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------