

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23998

研究課題名（和文）不動化による筋萎縮の制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism of immobilization-induced muscle atrophy

研究代表者

平田 悠（HIRATA, Yu）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70846352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：不動化による筋萎縮の分子機構について解析した。転写因子KLF15は不動化性筋萎縮における重要な制御因子であり、KLF15の上流で転写因子C/EBP および が関与することを明らかとした。また、KLF15の下流で機能する標的因子を網羅的に探索し、マウスおよびヒトで不動化時に共通して増加する液性因子を同定した。不動化ではC/EBP-KLF15経路の活性化を通じて筋萎縮が促進されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは加齢に伴う筋量減少と身体活動能力の低下に特徴付けられる病態であり、超高齢社会を迎えたわが国における健康寿命短縮の重要な原因である。身体活動の低下や不動化はサルコペニアの発症要因であるが、不動化による筋萎縮のメカニズムは明らかではない。本研究では、不動化性筋萎縮においてC/EBP-KLF15経路が重要な役割を担うことを明らかとした。本研究結果は筋萎縮抑制薬の開発に資する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the molecular mechanism of skeletal muscle atrophy due to immobilization. Transcription factor KLF15 is an important regulator in immobilization-induced muscle atrophy. It was revealed that transcription factor C/EBP and are involved upstream of KLF15. We have also searched for target factors that function downstream of KLF15, and identified a humoral factor that increased both in mice and human during immobilization. These results suggest that immobilization induces muscle atrophy via a C/EBP-KLF15 axis.

研究分野：糖尿病代謝学

キーワード：骨格筋 不動化性筋萎縮 KLF15

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命短縮の重要な要因であるが、その発症の分子機構の詳細は明らかではなく、現在、有効な治療薬はない。既知の候補分子を標的とした創薬戦略が失敗していることを踏まえても、新たな観点から筋量制御に対する理解や創薬標的の探索が重要なことは明らかである。

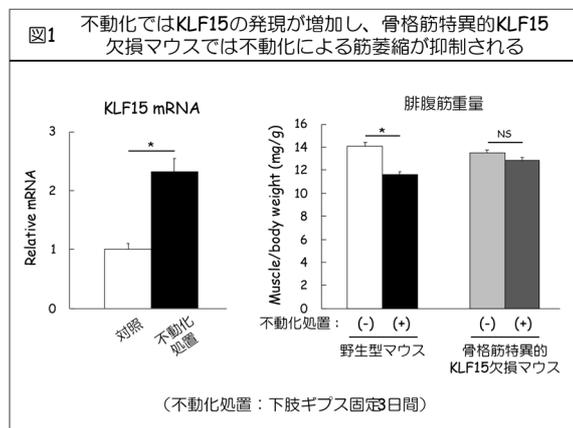
糖尿病はサルコペニアの重要な促進要因であるが、糖尿病が筋量減少や筋力低下を促す機構は十分に明らかではなかった。代表者はこれまでに糖尿病による筋萎縮の分子機構について解析し、糖尿病モデルマウスの骨格筋では、高血糖によってユビキチンリガーゼ VWP1 の発現が低下することにより、転写因子 KLF15 のユビキチン化とプロテアソーム依存性のタンパク分解が抑制され、その結果として KLF15 が過剰蓄積し、アミノ酸異化やタンパク分解に関わる遺伝子の発現増加を介して骨格筋の萎縮が促進されるという新規なメカニズムを明らかとした (JCI Insight. 2019;4(4):e124952)。

身体活動低下や不動化もサルコペニアの重要な促進要因であるが、身体活動低下や不動化が筋量減少を促すメカニズムの詳細は明らかでない。従来、不動化による筋量減少は、運動による筋量増加シグナルの減弱という観点から解析されてきた。しかし、運動による筋量増加は数週から数ヶ月かけて認められるのに対し、不動化による筋量減少は数日から数週で生じるという時間軸の違いを考慮しても、運動による筋量増加機構とは独立した「不動化固有の筋減少シグナル」が存在する可能性は高い。

2. 研究の目的

代表者は、下肢ギプス固定による不動化モデルマウスの骨格筋では KLF15 の遺伝子発現が増加し、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスでは不動化による筋萎縮が顕著に抑制されることを見出した (図1)。すなわち、KLF15 は不動化性筋萎縮の重要な制御因子と考えられる。

そこで本研究では、「不動化固有の筋減少シグナルの本態」を明らかとするため、不動化性筋萎縮における KLF15 の上流の発現制御機構および下流の標的因子について解析することを目的とする。



3. 研究の方法

不動化による筋萎縮における KLF15 の発現制御機構の解明

代表者は、不動化モデルマウスの骨格筋では KLF15 とともに、転写因子 C/EBP および C/EBP の発現が増加することを見出した。そこで本研究では、不動化性筋萎縮における KLF15 の上流の制御因子としての C/EBP および C/EBP の役割について検討する。

不動化による筋萎縮における KLF15 の新規な標的因子の探索

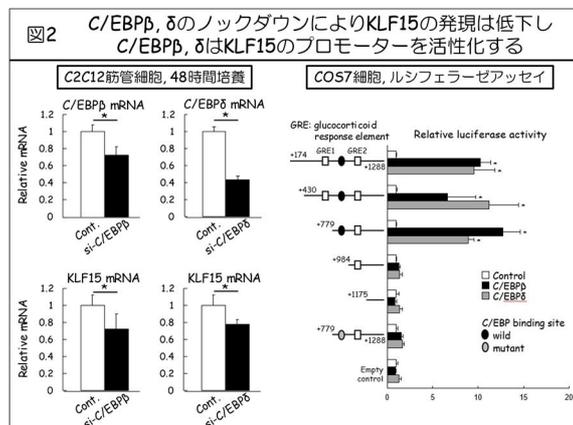
代表者は、骨折治療によるギプス固定で骨格筋の萎縮をきたした患者の骨格筋生検試料を解析した結果、KLF15 と筋萎縮関連遺伝子の発現量に強い相関があることを見出した。そこで本研究では、マウス DNA マイクロアレイ解析およびヒト骨格筋生検試料を用いて、マウスとヒトに共通する KLF15 の新規な標的因子を探索する。

4. 研究成果

不動化による筋萎縮における KLF15 の発現制御機構の解明

C2C12 筋管細胞において、siRNA により C/EBP または をノックダウンすると、KLF15 の遺伝子発現が低下したことから、C/EBP および が KLF15 の発現調節に関わることが示唆された。(図2左)。

次に、in silico 解析により、KLF15 のプロモーター領域には、C/EBP の結合配列が GRE (glucocorticoid response element) 2カ所に挟まれる形で存在することが明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイにおいて、KLF15 のプロモーター活性は、C/EBP の結合配列を有する場合には C/EBP および によって増加するが、結合配列の欠損体や変異体では増加



しないことを確認した(図2右)。

C/EBP $\beta$ -floxマウスと骨格筋特異的Cre過剰発現(MLC1f-Cre)マウスとの交配、さらに全身性C/EBP $\beta$ 欠損マウスとの交配により、全身性C/EBP $\beta$ 欠損かつ骨格筋特異的C/EBP $\beta$ 欠損マウスを作成した。

このマウスの定常状態における表現型について解析したところ、対照の野生型マウスと比較して体重や骨格筋重量などに差は認められなかった。

次に、このマウスにギプス固定による不動化処置を行ったところ、野生型マウスでは不動化によって腓腹筋やヒラメ筋重量が10~15%減少したが、全身性C/EBP $\beta$ 欠損かつ骨格筋特異的C/EBP $\beta$ 欠損マウスでは不動化による減量減少が有意に抑制された(図3)。

以上の結果より、C/EBP $\beta$ および $\delta$ は不動化性筋萎縮におけるKLF15の上流の制御因子として重要な役割を担うことが明らかとなった。

### 不動化による筋萎縮におけるKLF15の新規な標的因子の探索

KLF15の下流で機能する因子を探索するため、野生型マウスおよび骨格筋特異的KLF15欠損マウスの、それぞれ不動化処置有りまたは無し(4群)で、骨格筋におけるDNAマイクロアレイ解析を行った。

特に、液性因子や分泌因子は、不動化による筋萎縮に対する新規な薬剤標的となり得るため、そのような因子に絞って複数の候補遺伝子を抽出した。

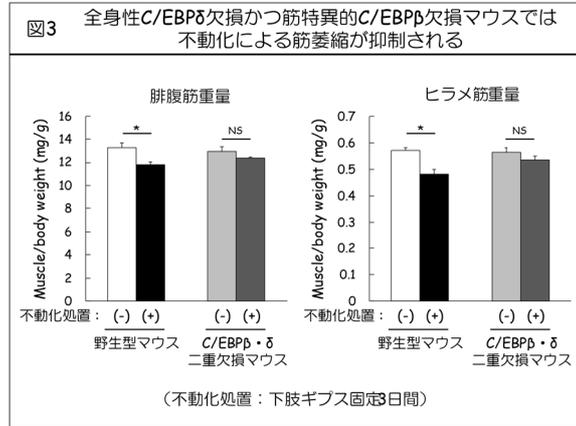
代表者はこれまでに、骨折治療によるギプス固定で骨格筋の萎縮をきたした患者の骨格筋生検試料を解析した結果、KLF15の発現量とC/EBP $\beta$ および $\delta$ 、既知の筋萎縮関連遺伝子の発現量に強い相関があることを見出している(図4)。

そこで、前述のマウスDNAマイクロアレイ解析で抽出された遺伝子のなかで、ヒト骨格筋生検試料において筋萎縮関連遺伝子と強い相関を示す遺伝子へとさらに絞り込みを行うことで、マウスおよびヒトで不動化時に共通して発現が増加する液性因子を同定した。

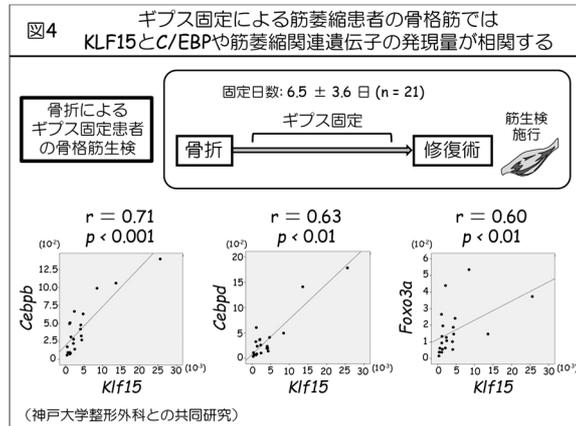
この液性因子に対する中和抗体をマウスへ投与することにより、loss-of-functionの実験を行った。対照(IgG投与)群では不動化処置によってヒラメ筋重量が減少したが、中和抗体投与群では不動化による減量減少が有意に抑制された。

また、対照群では不動化によってアミノ酸異化や筋萎縮関連遺伝子の発現が増加したが、中和抗体投与群では不動化に伴うこれらの遺伝子発現の増加が抑制された(図5)。

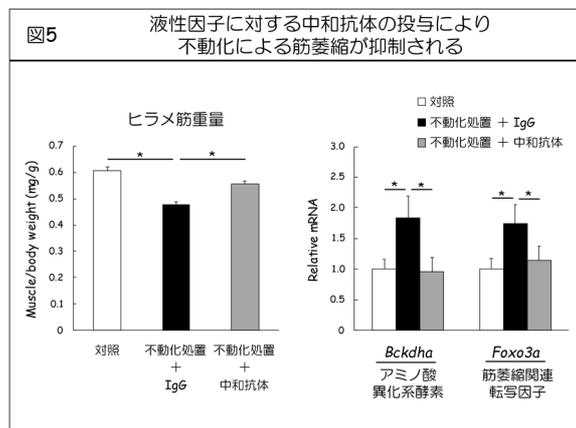
以上の結果より、新規に同定したKLF15の標的因子は不動化性筋萎縮において重要な役割を担うことが明らかとなった。また、この液性因子は筋萎縮抑制薬の治療標的になり得る可能性が示唆された。



(不動化処置: 下肢ギプス固定3日間)



(神戸大学整形外科との共同研究)



以上、この液性因子は筋萎縮抑制薬の治療標的になり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小川渉
2. 発表標題 高血糖および不働化における筋量制御のメカニズム
3. 学会等名 第41回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不働化はCa <sup>2+</sup> シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不働化はCa <sup>2+</sup> シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不働化はCa <sup>2+</sup> シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不動態はCa <sup>2+</sup> シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Hirata, Kazuhiro Nomura, Shiki Okamoto, Yasuhiko Minokoshi, Tomoaki Fukui, Keisuke Oe, Takahiro Niikura, Ryosuke Kuroda, Tetsuya Hosooka, Wataru Ogawa
2. 発表標題 Role of KLF15 in regulation of skeletal muscle mass
3. 学会等名 IDF Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小林憲太、岡本土毅、箕越靖彦、今村道博、武田伸一、小田崇弘、福井友章、大江啓介、新倉隆宏、黒田良祐、細岡哲也、小川渉
2. 発表標題 骨格筋量制御におけるKLF15の機能の解析
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
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

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
---------	---------