

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19694

研究課題名（和文）骨格筋p62はmitophagy制御を介して肥満関連性サルコペニアを抑制するか？

研究課題名（英文）p62 in muscles inhibits obesity-related sarcopenia through a control of mitophagy

研究代表者

正田 純一（Shoda, Junichi）

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：90241827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：サルコペニア肥満は生命予後が不良であるため、肥満者における骨格筋の維持は重要な課題である。本研究では、過食肥満を基盤に、筋脂肪化を生じる全身性p62遺伝子欠失マウスをベースに、筋細胞にのみp62を発現する筋特異的p62遺伝子レスキューマウスを新たに作製し、筋p62の機能を検証した。筋p62は、肥満誘導下で骨格筋量と筋力の維持に寄与しており、肥満関連性サルコペニアに対して防御的に機能することが示唆された。また、p62による骨格筋量の維持は、肥満誘導性の耐糖能異常やインスリン抵抗性の改善に寄与することが判明した。筋のp62は肥満者の骨格筋を維持する上で重要な標的分子となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニア肥満は、予後不良の疾病病態であるが、日常臨床の現場においてその対策は十分に機能しているとは言いがたい。本研究では、筋のp62が肥満の病態下で、体組成には影響せず、骨格筋量・筋力の維持、インスリン抵抗性に対して防御的に機能することを見出した。これらの結果は、肥満者に対する筋p62を標的とした新たなサルコペニア予防・治療法の構築につながる可能性があり、大きな発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：A maintenance of skeletal muscles in obese subjects is an important issue because of poor survival outcome of sarcopenic obesity. In this study, we aimed to determine the effects of muscle p62 on skeletal muscle mass and muscle strength. We generated muscle-specific p62 gene rescue mice (p62-mRes), which express p62 only in muscle and were derived from p62-knock out mice (p62KIKI) using the cre/loxp system. p62KIKI and p62-mRes mice were fed an HFD for 20 weeks. HFD-feeding caused severe obesity in both p62KIKI and p62-mRes mice, but there was no effect of muscle p62 on body mass. Limb skeletal muscle mass, grip strength, and the cross-sectional area of muscle fibers were higher in p62-mRes mice than in p62KIKI. The glucose tolerance and insulin sensitivity of the p62-mRes mice were also superior. The maintenance of skeletal muscle mass and function induced by p62 in muscle reduces insulin resistance in obese mice and protects against steatohepatitis via a muscle-liver axis.

研究分野：健康応用科学

キーワード：肥満 サルコペニア サルコペニア肥満 p62 mitophagy autophagy 運動療法

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満にサルコペニア (骨格筋量減少+筋力低下) を随伴したサルコペニア肥満は生命予後が不良であり、肥満者における骨格筋の維持は重要な医療課題である。肥満関連性のサルコペニアは、臓器連関により非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や NASH-肝発癌のリスク因子であり、肥満の肝関連死のリスクを増大させる。

(2) 代表者らが実施した臨床研究では、肥満者は非肥満者に比して、若年、中年、高齢の各年齢層において膝進展筋力の低下と筋萎縮を反映する筋細胞外脂肪の増加が認められた (*J Gastroenterol* 2018; *Sci Rep* 2019)。肥満は加齢とは独立したサルコペニアのリスク因子であることが推測された。

(3) サルコペニアの形成には、機能不全に陥ったミトコンドリアの分解機構である mitophagy 障害が関与する可能性がある。サルコペニアの病態下において、mitophagy の過程で分解される基質の p62 が蓄積することが確認されており、mitophagy の障害が推測される。

(4) 代表者らが作製した全身性 p62 遺伝子欠失 (p62-KO) マウスは、過食肥満とヒトメタボリック症候群に類似した表現型を呈す。さらに、高脂肪食の摂餌により骨格筋重量と筋力の低下、筋線維萎縮と周囲脂肪化を示す肥満関連性サルコペニアの形成に至る。p62-KO マウスにおけるサルコペニアの形成は、加齢には依存していないことよりヒト肥満者の病態と酷似していた。以上より、骨格筋における p62 が肥満関連性サルコペニアに対する抑制因子として機能している可能性がある。

(5) 本研究では、肥満関連性サルコペニアの抑制因子としての機能が推測される筋 p62 に着目し、肥満誘導下でその機能を検証する。本研究の遂行により、肥満関連性サルコペニアの抑止における筋 p62 の役割が明らかになれば、増加の一途を辿る肥満者の健康の維持・増進に向けて、p62 を標的とした新たな予防・治療法の構築につながる可能性があり、大きな発展が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、肥満関連性サルコペニアにおける筋 p62 の役割を検証した。また、p62 を介した骨格筋の維持が肝病変に及ぼす影響についても検証を行った。

### 3. 研究の方法

骨格筋における p62 の機能を検証するため、p62-KO マウスをベースに、筋細胞にのみ p62 を発現する筋細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウスを新たに作製した (図 1)。p62-KO マウス、p62-筋レスキューマウスに 60%高脂肪シヨ糖食を 20 週間摂餌させ、高度肥満を誘導した。サルコペニア病変 (四肢の骨格筋重量と筋力、筋線維横断面積)、筋ミトコンドリア含有量と機能、耐糖能・インスリン抵抗性、肝病変について比較解析を行った。

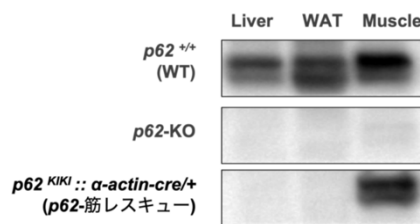


図 1 : p62 Western blotting 画像

### 4. 研究成果

(1) 筋細胞への p62 遺伝子レスキューは、Western blotting により確認した。またその発現レベルは、野生型マウスと同等であった。高脂肪食の摂餌により、両マウス共に高度の肥満が誘導されたが、筋 p62 の発現による体重の変化は認められなかった。一方、p62-筋レスキューマウスでは、p62-KO マウスと比較して、四肢の骨格筋重量 (大腿四頭筋、前脛骨筋、ヒラメ筋) が高値であり、握力も増加していた (図 2)。また、Laminin 2α および slow-myosin heavy chain 抗体を用いた免疫

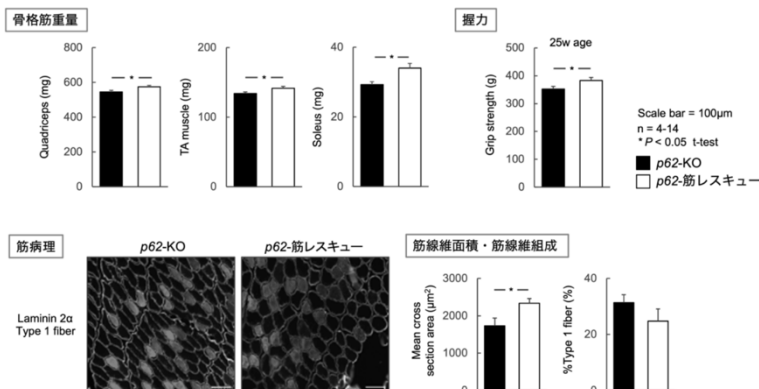


図 2 : 骨格筋重量, 筋力, 筋横断面積の変化

染色において、*p62*-筋レスキューマウスでは、筋線維横断面積が増加していた(図2)。一方、予想に反して Type 1 線維の割合は変化せず、ミトコンドリア含有量や活性、および関連因子の遺伝子発現に明らかな変化は認められなかった(図3)。これに関しては、筋の *p62* は肥満の病態下でサルコペニアの形成を抑制することが示唆された。

(2) 耐糖能およびインスリン抵抗性をグルコースまたはインスリン負荷試験 (GTT/ITT) にて、評価した。21 週齢時点の GTT では両群に変化は認められなかったものの、22 週齢時点の ITT において、*p62*-筋レスキューマウスでは、インスリン投与後の血糖値、曲線下面積の低下が認められた。筋 *p62* による骨格筋量・筋力の維持は、肥満が誘導するインスリン抵抗性を改善することが明らかになった。

(3) 高脂肪食の摂餌下で、*p62* による骨格筋量・筋力の増加、インスリン抵抗性の改善に寄与するメカニズムを探索するため、筋組織における Western blotting 解析を行った。*p62*-筋レスキューマウスでは、筋タンパク合成の正の制御因子である mTOR のリン酸化が増強されていた(図4)。また、骨格筋の糖取り込みや mTOR 活性化に關与する AKT のリン酸化も増加する傾向を示し、骨格筋の糖輸送担体 GLUT4 の発現も *p62*-筋レスキューマウスで増加していた(図4)。以上より、*p62* は骨格筋の mTOR 活性化、GLUT4 発現増強を介して肥満の病態下において、骨格筋重量・筋力の維持、インスリン抵抗性の改善に寄与している可能性が示唆された。

(4) サルコペニア肥満は、非アルコール脂肪性肝炎のリスク因子である。そこで、*p62*-KO マウスと *p62*-筋レスキューマウスの肝病態を比較した。SAF score による肝組織の病理学的評価において、*p62*-筋レスキューマウスでは、*p62*-KO マウスと比較して、肝脂肪化および炎症のスコアが低値であった(図5)。SAF score による肝線維化の評価では、有意差は認められなかったものの、線維化を示す

Sirius-red 染色の陽性部の面積は、*p62*-筋レスキューマウスで低値を示した(図5)。以上より、筋 *p62* による骨格筋量・機能の維持は臓器連関を介して脂肪性肝炎の進展を抑制した。

(5) 筋 *p62* は、肥満の病態下で骨格筋量と筋力の増加、耐糖能異常・インスリン抵抗性の改善に寄与した。さらに、これらの骨格筋の変化は臓器連関を介して非アルコール性脂肪性肝炎の進展を抑制することが明らかになった。これらの結果は、肥満者の骨格筋量、機能を維持する上で *p62* が重要な標的分子となり得ることを示している。

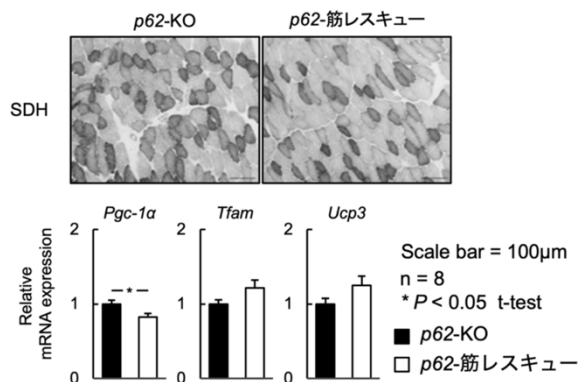


図3: 骨格筋のミトコンドリア含有量および活性の評価

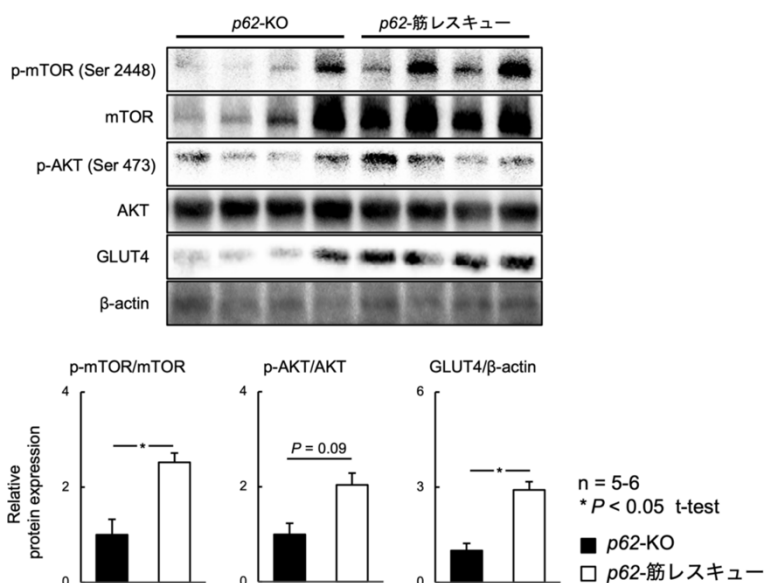


図4: 筋組織の Western blotting

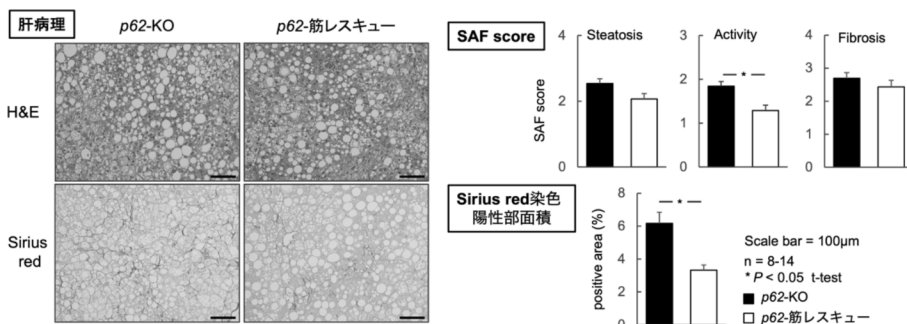


図5: 肝病理の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamanashi Y, Tanaka Y, Ogata Y, Toyoda Y, Oshida N, Okada K, Shoda J, Suzuki H	4. 巻 156
2. 論文標題 Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 exacerbates non-alcoholic fatty liver disease by re-absorbing specific biliary oxysterols.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113877	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 -

1. 著者名 Miura I, Okada K, Ishii A, Warabi E, Watahiki T, To K, Shimano H, Ariizumi S, Shoda J	4. 巻 13
2. 論文標題 p62/Sqstm1 rescue in muscle retards the progression of steatohepatitis in p62/Sqstm1-null mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 993995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.993995	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 -

1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Miura I, To K, Tanaka S, Warabi E, Kanno N, Yamagata K, Gotoh N, Suzuki H, Ariizumi S, Tsuchiya K, Nagasaki Y, Shoda J	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidative Self-Assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11101939	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 -

1. 著者名 Komine S, Miura I, Shoda J, Tokinoya K, Oh S, Miyashita N, Omori H	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of a sulforaphane supplement on muscle soreness and damage induced by eccentric exercise in young adults: A pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 15130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15130	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 -

1. 著者名 Yabe Y, Kim T, Oh S, Oshida N, Hasegawa N, Kamimaki T, Someya N, Shoda J.: Association of dietary habits and physical activity levels with non-alcoholic fatty liver disease with advanced liver fibrosis	4. 巻 18
2. 論文標題 Association of dietary habits and physical activity levels with non-alcoholic fatty liver disease with advanced liver fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res & Public Health	6. 最初と最後の頁 8918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18178918	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 -

1. 著者名 Okada K, Watahiki T, Horie M, Takayama T, Aida Y, To K, Shida T, Ishige K, Suzuki H, Nishiyama H, Shoda J	4. 巻 100
2. 論文標題 The prevalence and clinical implications of pancreatic fat accumulation identified during a medical check-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e27487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027487	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 -

1. 著者名 Miura I, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	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 -

1. 著者名 Oh S, Tsujimoto T, Kim B, Uchida F, Iizumi S, Isobe T, Sakae T, Tanaka K, Shoda J	4. 巻 3
2. 論文標題 Weight loss-independent benefits of exercise on liver steatosis and stiffness in Japanese men with NAFLD. JHEP Reports 3: 100253, 2021 (IF: 7.468). DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100253	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 100253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhepr.2021.100253	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のp62は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を抑制する.
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 綿引隆久, 陶経緯, 正田純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎に対する筋Nrf2の防御的役割
3. 学会等名 日本筋学会第8回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 浩介, 綿引 隆久, 正田 純一
2. 発表標題 p62およびNrf2遺伝子二重欠失マウスは, 腸内細菌叢の変化に関連したlipopolysaccharide増加により脂肪性肝炎を自然発症する
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陶 経緯, 綿引 隆久, 岡田 浩介, 石毛 和紀, 鈴木 英雄, 有泉 俊一, 山本 雅一, 正田 純一
2. 発表標題 NASH進行とNASH肝癌におけるautophagy調節因子p62の役割
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 征, 岡田 浩介, 石井 亜紀子, 正田 純一
2. 発表標題 骨格筋のp62は骨格筋機能を改善させ脂肪性肝炎の炎症・線維化を減弱する
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021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	鈴木 英雄 (Suzuki Hideo)  (00400672)	筑波大学・医学医療系・准教授  (12102)	
研究分担者	石井 亜紀子 (Ishii Akiko)  (10400681)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	
研究分担者	岡田 浩介 (Okada Kosuke)  (80757526)	筑波大学・医学医療系・准教授  (12102)	

	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
研究協力者	三浦 征 (Miura Ikuru)  (20982317)	福岡大学・スポーツ科学部・助教  (37111)	

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