

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19726

研究課題名（和文）糖の受容体を介した新たな筋萎縮機構の解明

研究課題名（英文）Novel mechanism of muscle atrophy mediated by glucose receptors

研究代表者

古市 泰郎（Furuichi, Yasuro）

東京都立大学・人間健康科学研究科・助教

研究者番号：40733035

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）：申請者はこれまで骨格筋の新規萎縮因子を探索した結果、骨格筋では機能未知の受容体が萎縮とともに増加していることを明らかにした。その分子機能を明らかにするために、マウス骨格筋から単離した筋幹細胞を培養し、siRNAを用いて受容体の発現を抑制したところ、細胞の増殖が促進し、この受容体は筋細胞の増殖能力を負に制御することを見出した。同じ実験系で、遺伝子発現の網羅的な発現解析および代謝物の一斉定量解析を行い、受容体によって制御される細胞増殖の情報伝達機構を解明した。骨格筋以外の組織ではこの受容体は炎症反応を惹起することが知られていたが、筋細胞増殖ではそれとは異なる新規経路が関わっていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や不活動による骨格筋の萎縮は、運動能力を低下させて生活の質を落とすだけでなく、種々の疾患を誘因するため、筋萎縮の原因を解明し、具体的な対抗策を講じることが求められている。筋幹細胞の増殖力を低下させる受容体の発見とその機能解析は、筋萎縮の新たな機序の解明につながる。特に受容体の場合は、拮抗する化合物が発見されれば、運動を模倣するような新薬や食品化合物の発見に結びつき、その波及効果は大きい。本研究では、筋萎縮を誘導する受容体の作用機序の一端を明らかにし、健康や医療に応用される可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We searched for new factors associated with skeletal muscle atrophy and discovered that there is an increase in receptors of unknown function during this process. To better understand the molecular function of these receptors, we performed experiments using mouse skeletal muscle stem cells, where we inhibited the expression of receptors using siRNA. The results showed that cell proliferation was promoted and that these receptors had a negative effect on the proliferative ability of muscle cells. We also performed comprehensive gene expression analysis and simultaneous quantitative analysis of metabolites in the same experimental system to elucidate the signaling mechanism of cell proliferation regulated by the receptor. Although the receptor was previously known to induce inflammatory responses in other tissues, our research revealed a novel pathway involved in myocyte proliferation that is distinct from the previously known pathway.

研究分野：運動生化学

キーワード：筋萎縮 筋再生 受容体 代謝変化 筋芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入した我が国にとって、健康寿命の延伸は喫緊の課題である。高齢者が要介護状態に陥る原因に、加齢にともなう骨格筋の萎縮（サルコペニア）があげられる。筋の萎縮は、運動能力を低下させて生活の質を落とすだけでなく、種々の疾患を誘因するため、筋萎縮の原因を解明し、具体的な対抗策を講じることが求められている。

申請者はこれまで、筋量の維持に重要な骨格筋の幹細胞（骨格筋の「もと」となる未熟な細胞）は、高濃度のグルコース（糖）環境では増殖能力が低下することを見出した。また、独自に筋萎縮の原因因子を探索した結果、筋幹細胞には糖の受容体が発現し、それが糖濃度を感知して筋萎縮を誘導する働きを持つという手がかりをつかんでいる。一方で、血糖値が高くなる疾患である糖尿病に罹患すると原因不明の筋萎縮が生じる。その機序は明らかにされていないが、以上の申請者の新知見を考慮すると、高血糖に反応して細胞炎症を引き起こす糖受容体が、糖尿病性筋萎縮に関与している可能性が推察される。

運動は、たとえ低強度でも、血糖値を低下させる効果がある。したがって、不活動（運動不足）によって高血糖状態が続くと筋が萎縮し、逆に、運動で血糖値が低下すると筋萎縮は防止されるという仮説が立てられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋に発現する糖受容体が、高血糖に反応して筋萎縮を誘導する新規因子であることを証明することである。さらに、「運動が筋萎縮を予防できるのは、血糖降下によって筋萎縮のスイッチ（糖受容体）が解除されるため」という仮説を検証し、これまでに無い新しい筋萎縮予防の方策を確立する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における糖受容体の発現抑制の検討

マウスの骨格筋（長指伸筋）から筋線維を単離し、酵素処理によって筋幹細胞を播種した。高グルコース培地（最終濃度 19 mM）と低グルコース培地（最終濃度 2 mM）をそれぞれ調製し、グルコース濃度の異なる条件で培養した。糖受容体に特異的な siRNA をリポフェクション法（Lipofectamine3000）によって細胞に導入し、受容体の発現を抑制した。増殖マーカーである EdU を取り込ませて、EdU 陽性細胞数を測定した。また、細胞から RNA とタンパク質を抽出し、受容体や増殖マーカー、また炎症反応に関わる分子の発現量をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングによって測定した。

(2) 糖濃度および受容体発現による遺伝子発現および代謝物の網羅的解析

上記の方法で培養した筋芽細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行った（DNA チップ研究所に委託）。DAVID 等のパスウェイ解析ツールを用いて、糖濃度や受容体の有無による細胞内伝達機構の変化を抽出した。また、細胞から代謝物を抽出し、メタボローム解析を行った（ヒューマンメタボロームに委託）。

(3) 生体内における受容体作用の解析

野生型マウスと糖尿病モデルマウス（KK-Ay）の片脚の前脛骨筋に Cardiotoxin を注射し、筋損傷を誘発させた。損傷 5 日目に前脛骨筋を摘出し、タンパク質を抽出した。ウエスタンブロッティングによって受容体の発現量を比較した。また、受容体が筋再生に及ぼす影響を明らかにするため、筋再生中のマウス骨格筋に siRNA を導入した。

4. 研究成果

(1) 受容体の発現抑制による細胞増殖の変化

マウス長指伸筋由来の筋芽細胞を培養 6 日目に継代し、リポフェクション法によって受容体の siRNA を Transfection した。siRNA は配列の異なる 3 種類を用意し、同時に比較した。Transfection してから 24 時間後に RNA を抽出して受容体の mRNA 量を測定したところ、いずれの siRNA も受容体の発現量を 50-70%程度抑制していたが、siRNA-2 が最も発現抑制効果が高かったため、以降の実験は siRNA-2 を使用した。同じサンプルで増殖マーカーである Ki67 の mRNA 発現量を測定したところ、受容体の発現抑制によって Ki67 は増加していた。また、同じく増殖マーカーとして用いられている PCNA (proliferating cell nuclear antigen) のタンパク質発

現量をウエスタンブロッティングで定量し、PCNA も受容体の発現抑制によって増加したことを確認した。さらに、EdU 陽性細胞数を測定し、全細胞数 (DAPI による定量) に対する割合を算出した。その結果、EdU 陽性細胞数の割合は受容体の発現によって低下したことから、受容体は筋芽細胞の増殖を抑制する因子であることが示唆された。

(2) 受容体が細胞増殖を制御する機序の解析

筋細胞以外では、その受容体はカベオラを構成するタンパク質を介して情報伝達を起こし、細胞炎症を惹起することが示唆されている。その鍵タンパク質のリン酸化をウエスタンブロッティングで定量したが、受容体の発現抑制による変化は認められなかった。したがって、筋芽細胞による受容体を介した細胞増殖の変化は、既知のパスウェイではないことが示唆された。そこで、受容体を発現抑制した細胞とスクランブル siRNA を導入した細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行った。現在、そのデータを解析し、受容体が制御する情報伝達機構を同定する予定である。

一方で、筋芽細胞の増殖変化の機序を探るために、糖濃度の違いによる RNA シーケンスとメタボローム解析を行った。高濃度のグルコースによって亢進した経路の中には、炎症反応に関わるインターロイキン系、ケモカイン系が同定された。また、グルコースだけでなくモノカルボン酸などの代謝物の輸送体が発現増強されていることが明らかになった。また、メタボローム解析の結果、解糖系や酸化系リン酸化経路には顕著な変化が認められなかったものの、ATP や ADP が低濃度の条件で増加していることが分かった。さらに、グルタミン代謝経路が糖濃度によって変化していることが示唆された。以上の結果は、糖濃度が筋芽細胞の増殖を制御する新たな機序を示唆し、受容体の発現抑制による遺伝子発現の変化とあわせてその詳細な解析を進めている。

(3) 生体内における受容体発現抑制の影響

野生型と KK-Ay マウスで前脛骨筋における受容体の発現量を比較したところ、安静状態では KK-Ay の受容体の発現量が有意に増加していた。筋損傷後 5 日目の前脛骨筋では、損傷させていない安静脚に比べて受容体の発現量が有意に増加したが、KK-Ay マウスではその増加量が抑制される傾向にあった。

続いて、生体内で受容体の発現抑制が筋芽細胞の増殖を促進するかを検証するため、筋再生中のマウス骨格筋に siRNA を導入した。筋損傷誘導薬を前脛骨筋に注射し、24 時間後にアテロコラーゲンをを用いて siRNA-2 を注射した。注射後 3 日、8 日、12 日後に筋を回収して、増殖マーカーを定量したところ、いずれの条件でも siRNA 導入による変化は認められなかった。ただし、受容体の発現量が siRNA によって明確には低下していなかったため、siRNA 導入の条件を見直す必要がある。遺伝子導入による発現増加の実験モデルへの切り替えも含めて、今後解析方法を検討しながら解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mita Yoshitaka, Ito Miyuki, Yamada Mio, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko, Furuichi Yasuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of chronic muscle contraction on expression of contractile and metabolic proteins in mouse primary cultured myotubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.11.51	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 Goto-Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Kimura Keisuke, Mori Tsukasa, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging reveals local metabolic changes in skeletal muscle due to chronic training	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac037	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 Takakura Hisashi, Yamada Tatsuya, Furuichi Yasuro, Hashimoto Takeshi, Iwase Satoshi, Jue Thomas, Masuda Kazumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Muscle immobilization delays abrupt change in myoglobin saturation at onset of muscle contraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 87 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.11.87	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 Furuichi Yasuro, Goto-Inoue Naoko, Uchida Saki, Masuda Shun, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 9
2. 論文標題 Stable isotope-labeled carnitine reveals its rapid transport into muscle cells and acetylation during contraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e15281 ~ e15281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e15281	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 Hamaguchi Hiroki, Dohi Kitora, Sakai Takaomi, Taoka Masato, Isobe Toshiaki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 639
2. 論文標題 PDGF-B secreted from skeletal muscle enhances myoblast proliferation and myotube maturation via activation of the PDGFR signaling cascade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.085	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 Hamaguchi Hiroki, Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of a system evaluating the contractile force of electrically stimulated myotubes from wrinkles formed on elastic substrate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17548-7	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 Mita Yoshitaka, Zhu Haonan, Furuichi Yasuro, Hamaguchi Hiroki, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 12
2. 論文標題 R-spondin3 is a myokine that differentiates myoblasts to type I fibres	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16640-2	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4件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古市泰郎, 三田佳貴, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋の「質」を制御するマイオカイン
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 筋幹細胞の増殖におけるグルコースの意義
3. 学会等名 日本筋学会第7回学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 身体活動・運動が骨格筋量を維持する機序 糖代謝との関係に注目して
3. 学会等名 第174回日本体力医学会関東地方会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市泰郎, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 糖濃度が筋幹細胞の増殖能力に与える影響
3. 学会等名 第77回日本体力医学会医学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------