

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24620015

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮の新たなメカニズムの解明：体内時計の乱れは筋肉をも壊してしまうのか？

研究課題名(英文) Investigating potential relationship between circadian clock and skeletal muscle atrophy.

研究代表者

中尾 玲子 (Nakao, Reiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：20582696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計と筋萎縮の関与を調べるために、筋萎縮モデルマウス(坐骨神経切除マウス)における時計遺伝子発現の日内リズムを解析した。坐骨神経を切除した骨格筋においても時計遺伝子は日周発現したが、概日リズムのパラメーター(位相、振幅、発現量)は対照肢と比較して異常が見られた。また、これらのパラメーターの変動の様子は各遺伝子によって異なっていた。筋萎縮の進行に伴い発現リズムが乱れた時計遺伝子が多かったことから、骨格筋の量・機能の維持が「筋時計」の日内リズムの維持に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of unilateral sciatic denervation on the expression of circadian clock genes in the gastrocnemius muscles of mice. Expression levels of most clock genes such as Bmal1, Per1, Rora, Nr1d1 and Dbp were reduced in accordance with the extent of muscle atrophy, although circadian Per2 expression was significantly augmented. The circadian expression of Bmal1 and Dbp was phase advanced in denervated muscle. The mRNA expression of Clock was significantly increased in denervated muscle and it was not affected by atrophic progression. Sciatic denervation did not affect the expression of these genes in the contralateral muscle, suggesting that humoral changes were not involved in denervation-induced muscle clock disruption. Our findings revealed that sciatic denervation disrupts the circadian expression of clock genes either directly or indirectly via muscle atrophy in the gastrocnemius muscles of mice in a gene-specific manner.

研究分野：栄養学、時間生物学

キーワード：筋萎縮 概日リズム 時計遺伝子 末梢時計

1. 研究開始当初の背景

宇宙飛行士は、微小重力環境下に長期間曝されると筋活動の低下により骨格筋が萎縮することが知られている。短期間の宇宙飛行でさえ、ふくらはぎの筋量減少率は1日あたり約0.8%にもなり、寝たきり状態の筋量減少率と比べて約2倍の早さで萎縮が進行する。この筋萎縮は特に抗重力筋であるヒラメ筋に著しく、速筋化も生じ(Jiang et al. J Appl Physiol. 1992, Musacchia et al. J Appl Physiol. 1992)、筋量だけでなく筋の質も変化する。筋肉の萎縮は、筋細胞の増殖因子への応答性の低下と、筋タンパク質分解の増加が原因と考えられているが、メカニズムの全貌や、筋萎縮の有効な予防法、治療法はまだ不明なままである。我々は、萎縮した筋肉において、増殖因子IGF-1のシグナル伝達分子であるIRS-1がユビキチンリガーゼ(分解すべきタンパク質にユビキチン分子を付加する酵素)Cbl-bの働きによって分解されることが筋萎縮の原因の1つであること、Cbl-b阻害ペプチドが筋萎縮を改善できることを報告したが、筋萎縮を完全には治療できず(Nakao et al. Mol Cell Biol. 2009)、より効率的な筋萎縮改善法の開発が必要であると考えた。

地球上のほとんど全ての生物には体内時計が存在し、活動(睡眠覚醒)リズムのみならず、体温、血圧、糖・脂質代謝や薬物代謝などの様々な生理機能の概日リズム(サーカディアンリズム)を制御している。時計遺伝子は、体内時計の分子機構を構成する遺伝子群であり、体内時計の中核である脳の視交叉上核だけでなく、末梢組織にも発現する。近年、筋肉にもその発現が報告された(McCarthy et al. Physiol Genomics. 2007)が、末梢組織が持つ体内時計に関して研究が進んでいるのは主に肝臓についてであり、筋肉の体内時計については報告が少ない。過去の報告では、時計分子CLOCK/BMAL1は筋分化促進因子であるMyoDと結合すること(Andrews et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)、*Bmal1* 遺伝子欠損マウスはサルコペニア様の症状(加齢による筋肉減少)を示すこと(Kondratov et al. Genes Dev. 2006)など、時計分子が筋肉の機能維持に関与する可能性があるデータが示されている。しかし、時計分子が筋機能の維持にどのような役割を担うのか、また、筋肥大や筋萎縮が時計分子の日周発現に影響を及ぼすのか、体内時計と筋萎縮を結びつける分子メカニズムについて詳細は全く不明である。

近年、時間栄養学、時間薬理学など、体内時計を利用して疾患を予防・改善するための研究が行われている。筋肉を肥大させるための筋タンパク質合成に成長ホルモンの作用が必要であると言われているが、成長ホルモンの分泌を促進する因子の1つに睡眠がある。ヒトの場合、成長ホルモンの分泌量が最大になるのは睡眠中の深夜2~3時になる時刻依

存性がある。生体を持つ概日リズムを利用すれば、筋の同化作用を効率的に誘導し、筋萎縮を改善できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

時計分子が筋機能の維持にどのような役割を担うのか、また、筋肥大や筋萎縮が時計遺伝子の日周発現に影響を及ぼすのかを明らかにすること、体内時計を利用した筋萎縮の改善について筋萎縮モデルを用いて検討すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1)筋萎縮が時計遺伝子の日周発現にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、筋萎縮モデルである坐骨神経切除マウスを用いた。マウスの左肢の坐骨神経を切除し、右肢には偽手術を行った。対照として、処置を行わないマウスを用いた。坐骨神経切除から0, 3, 7, 9, 11, 14日後の2時刻、また7, 28日後の6時刻マウスを解剖し、摘出した腓腹筋における時計遺伝子発現の日内リズムを解析した。

(2)骨格筋の時計遺伝子発現に対する筋肥大(運動)の関与を調べるために、回転かごの付いたケージで自由に4週間輪回し運動をさせた運動群と、回転かごのない飼育ケージで飼育した対照群で、腓腹筋における時計遺伝子発現の日内リズムを比較した。

(3)生体リズムを利用した筋萎縮改善の可能性について検討するために、グルココルチコイド投与による筋萎縮モデルを用いた。合成グルココルチコイド剤は抗炎症・免疫抑制作用を持つ薬剤として使用されるが、慢性的な高濃度の投与は筋萎縮の副作用を引き起こすことが知られている。一方、副腎からのグルココルチコイドホルモンの分泌には、活動期直前にピークを示す日内変動が存在する。そこで、マウスに合成グルココルチコイド(デキサメタゾン、10mg/kg BW)を1日1回、朝(内在性グルココルチコイドが低値になる時刻)または夕方(内在性グルココルチコイドが高値になる時刻)に10日間腹腔内投与した。10日目の投与3時間後にマウスを解剖し、腓腹筋重量、筋萎縮遺伝子発現量を比較した。

4. 研究成果

(1)坐骨神経を切除しても、深部体温、血中コルチコステロン、肝臓における時計遺伝子発現の日内リズムは対照群と差がなく、個体の日内リズムは維持されていた。坐骨神経を切除した肢の腓腹筋において、*Bmal1*, *Per1*, *Rora*, *Nr1d1*, *Dbp1* の発現量は筋萎縮の進行に伴って減少、*Per2* 発現量は増大した。*Bmal1*, *Dbp* 遺伝子発現リズムの位相は、萎縮が進むにつれて前進した。*Clock* 遺伝子の発現は、坐骨神経切除3日後から有意に増大し、28日後も同程度に発現誘導されていた。これらの

時計遺伝子発現の日内リズムの変動は偽手術肢では見られなかったことから、液性因子の作用によるものではないと推測された。筋萎縮、及び除神経は、各時計遺伝子に特異的な機構を介して、骨格筋時計遺伝子発現の日内リズムを攪乱することがわかった。筋萎縮の進行に伴い発現リズムが乱れた時計遺伝子が多かったことから、骨格筋の量・機能の維持が「筋時計」の日内リズムの維持に重要であると考えられる。

(2) 運動群において、深部体温、摂餌行動(朝食)、血中コルチコステロン量の日内リズムが早まり、朝型になっていることがわかった。このとき、骨格筋における時計遺伝子 *Per2*, *Nr1d1* 遺伝子の発現リズムも、発現量のピークとなる時刻が前進し、振幅が増大することが確認された。以上の結果から、習慣的な運動によって骨格筋の機能が向上すると、「筋時計」はメリハリのついた朝型になる可能性が示唆された。

(3) デキサメタゾンによる免疫抑制効果の指標である、脾臓重量の減少には投与時刻の影響は認められなかった。デキサメタゾン投与による筋萎縮遺伝子 *MAFbx* の発現誘導や筋重量の減少については、朝の投与でその影響が大きく見られた。これらの結果から、筋肉の合成グルココルチコイドに対する感受性には時刻依存性があり、投与時刻を工夫する(内在性グルココルチコイドのリズムに合わせた投与)ことで合成グルココルチコイド投与による筋萎縮の副作用を軽減させることが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- (1) Nakao R, Yamamoto S, Horikawa K, Yasumoto Y, Nikawa T, Mukai C, Oishi K. Atypical expression of circadian clock genes in denervated mouse skeletal muscle. *Chronobiol Int.* 2015;32(4):486-96. 査読有
DOI: 10.3109/07420528.2014.1003350.
- (2) Yasumoto Y, Nakao R, Oishi K. Free access to a running-wheel advances the phase of behavioral and physiological circadian rhythms and peripheral molecular clocks in mice. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116476. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0116476. eCollection 2015.
- (3) Nakao R, Yamamoto S, Yasumoto Y, Kadota K, Oishi K. Impact of denervation-induced muscle atrophy on housekeeping gene expression in mice. *Muscle Nerve.* 2015;51(2):276-81. 査読有

DOI: 10.1002/mus.24310

- (4) Nakao R, Yamamoto S, Yasumoto Y, Oishi K. Dosing schedule-dependent attenuation of dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Chronobiol Int.* 2014;31(4):506-14. 査読有
DOI: 10.3109/07420528.2013.872654

[学会発表](計6件)

- (1) Nakao R, Yamamoto S, Horikawa K, Yasumoto Y, Nikawa T, Mukai C, Oishi K. Atypical expression of circadian clock genes in denervated mouse skeletal muscle. 第20回日本時間生物学会学術大会、2014年11月9日、九州大学(福岡)
- (2) 中尾玲子、山本幸織、安本佑輝、大石勝隆、デキサメタゾン誘導性の筋萎縮に対する投与時刻の影響、第69回日本体力医学会大会、2014年9月20日、長崎大学(長崎)
- (3) 中尾玲子、山本幸織、安本佑輝、大石勝隆、デキサメタゾン誘導性の筋萎縮に対する投与時刻の影響、第68回日本栄養食糧学会大会、2014年5月31日、酪農学園大学(北海道)
- (4) 中尾玲子、山本幸織、大石勝隆、デキサメタゾン誘導性の筋萎縮に対する投与時刻の影響、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際会議場(兵庫)
- (5) 中尾玲子、山本幸織、大石勝隆、デキサメタゾン誘導性の筋萎縮に対する投与時刻の影響、第19回日本時間生物学会学術大会、2013年11月9日、近畿大学(大阪)
- (6) 中尾玲子、二川健、向井千秋、大石勝隆、廃用性筋萎縮モデルマウスを用いた筋タンパク質分解の概日リズム、第67回日本栄養食糧学会大会、2013年5月25日、名古屋大学(愛知)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
中尾 玲子 (NAKAO, Reiko)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員
研究者番号: 20582696
- (2) 研究分担者
該当無し
- (3) 連携研究者
大石 勝隆 (OISHI, Katsutaka)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号: 50338688

宮崎 歴 (MIYAZAKI, Koyomi)
国立研究開発法人 産業技術総合研究
所・バイオメディカル研究部門・研究グル
ープ長
研究者番号：70358125

榛葉 繁紀 (SHIMBA, Shigeki)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号：20287668