

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：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700706

研究課題名(和文)筋サテライト細胞の増殖・分化機構とその破綻によるサルコペニア発症の分子機序の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of sarcopenia development by impairment of satellite cell functions

研究代表者

黒坂 光寿(KUROSAKA, Mitsutoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：40553970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、サルコペニアによって誘導される生理活性物質が骨格筋の幹細胞である筋衛星(サテライト)細胞の諸機能に及ぼす影響をin vivoおよびin vitroで検討した。その結果、サルコペニア発症に関わる様々な生理活性物質の分泌の引き金となるTRPV1チャネルの活性化が、筋サテライト細胞の増殖には影響を及ぼさなかったが、インターロイキン-4を介して、筋サテライト細胞の融合および筋再生を調節している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the sarcopenia-induced physiological active substance on satellite cell function in vitro and in vivo. The results demonstrated that activation of TRPV1 by CAP did not change myoblast proliferation, whereas it regulates myoblast fusion through interleukin-4 (IL-4).

研究分野：筋生理学

キーワード：骨格筋 筋サテライト細胞 筋再生

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い筋肉量は減少する。特に筋肉量の低下が顕著な場合、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と呼ばれている。サルコペニアは、単に筋肉量を減少させるだけでなく、転倒事故を引き起こしやすくなったり、基礎代謝量の低下によって、メタボリックシンドロームを引き起こす可能性がある。

サルコペニア発症の原因として、加齢に伴い骨格筋特異的な幹細胞である筋衛星（サテライト）細胞の数や増殖能の低下によって、筋肥大や筋再生が正常に行われなくなることが考えられている。通常、筋サテライト細胞は静止状態にあるが、運動や外傷等の刺激によって至適な数まで増殖・分化し、互いに融合したり既存の筋細胞に融合して、筋管細胞を形成し、最終的に収縮機能を持つ筋線維を形成することで、筋を肥大させたり、修復させたりする。しかし、高齢期の筋サテライト細胞では、そのような厳密に制御されている一連の増殖・分化機構が正常に行われていない可能性が示唆されている。その原因のひとつとして、我々は、サルコペニアによって変化する生理活性物質に着目し、特に interleukin(IL)-6 が筋サテライト細胞の諸機能を調整しうることを培養実験系で明らかにしている。しかしながら、いくつかのサルコペニアによって上昇する生理活性物質の筋サテライト細胞に対する詳細なメカニズムおよび高齢期における役割については明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、筋サテライト細胞の諸機能に影響を及ぼすサルコペニアに関連する生理活性物質（interleukin(IL)-6 など）に着目し、その機序（JAK2/STAT3 シグナル経路など）を *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

平成 24 年度

初年度は、筋損傷・再生過程における我々が標的とする分子の挙動を明らかにすることを目的とした。C57BL/6J 雄性マウス（11 週齢、n=23）を用いた。両脚の前脛骨筋に筋損傷を誘発する cardiotoxin(CTX)もしくはコントロールとして PBS (0D; n=4)を直接投与し、2(2D; n=5)、5(5D; n=4)、7(7D; n=5)、12日(12D; n=5)後にそれぞれマウスの前頸骨筋を摘出し、一般的な病理所見をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、筋サテライト細胞(Pax7)や筋分化マーカー(myogenin)の局在や増殖シグナル経路(JAK2/STAT3 経路)の下流遺伝子のタンパク質発現量を免疫組織化学染色法によって評価した。

平成 25 年度

平成 25 年度は、様々な細胞種において、JAK2/STAT3 シグナル経路のリガンドであ

る IL-6 の分泌の調節に関わると報告されている分子、TRPV1 チャンネル(TRPV1)に着目した。TRPV1 は、非選択性の陽イオンチャンネルであり、熱刺激によって活性化する特徴を持っている。しかしながら、筋サテライト細胞における役割については明ではない。

C57BL/6J 雄性マウス(約 10 週齢、n=10)の下肢骨格筋より、筋サテライト細胞を単離して培養を行った。TRPV1 のアゴニストであるカプサイシン(CAP) (1 μ M)で増殖培地中(GM)および分化培地中(DM)にて 24 および 48 時間刺激し、増殖能、筋管細胞数を評価した。また、筋サテライト細胞の特異的な転写因子群の遺伝子発現量を QRT-PCR 法によって、タンパク質の局在と発現量は、免疫蛍光染色法およびウェスタンブロット法によって評価した。

平成 26 年度

10 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスの両脚下肢骨格筋より、筋サテライト細胞を単離した。リポフェクション法による siRNA の導入によって、TRPV1 の遺伝子発現量をノックダウンした。また、*in vivo* において、マウスの前脛骨筋に筋損傷を誘発する cardiotoxin (CTX)を直接投与し、その後、損傷 5 日後まで TRPV1 のアゴニストである CAP もしくは PBS を連続して投与した。それぞれのマウスから 5 日(5D)および 10 日(10D)後に前頸骨筋を摘出し、面積、核数および筋サテライト細胞数を評価した。

4. 研究成果

平成 24 年度

Pax7 のタンパク質発現量は、5D が 0D と比較して有意に増加した。また、筋分化マーカーである Myogenin のタンパク質発現量は、2D および 5D が 0D と比較して有意に増加した。筋サテライト細胞の増殖に必須である CyclinD1 タンパク質発現量は、2D が 0D と比較して有意に増加した。また、細胞周期の抑制因子である p27 タンパク質発現量は、5D および 7D が 0D と比較して有意に増加した。さらに、JAK2/STAT3 シグナル経路を負に制御する SOCS3 タンパク質発現量は、5D および 7D が 0D と比較して有意に増加した。これらの結果より、

初年度は、筋損傷・再生過程における組織の変化の過程やそれともなうタンパク質発現の変化および JAK2/STAT3 シグナル経路の動態を明

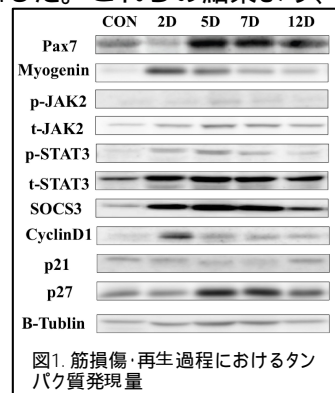


図1. 筋損傷・再生過程におけるタンパク質発現量

らかにすることができ、最終年度(平成 26 年度)のための in vitro の実験系を確立することができた。

平成 25 年度

増殖培地中において、CAP (1 μ M) 処置を行ったところ、核数および BrdU 陽性細胞数に差はなかったが、筋管細胞数が CON 群より 1 μ M (CAP) 群で有意に多かった。また、Pax7 陰性 / MyoD 陽性細胞数および Myogenin 陽性 / MyoD 陽性細胞数が CON 群より CAP 群で有意に多かった。分化培地中において、筋管細胞当たりの核数が CON 群より CAP 群で有意に多かった。また、TRPV1 の発現抑制は、筋管細胞当たりの核数を有意に減少させた。しかしながら、予想に反して、カプサイシン処置による TRPV1 の活性化は、IL-6 の著しい増加を引き起こさなかった。一方で、筋サテライト細胞融合に重要である IL-4、また IL-4 シグナルの標的遺伝子である IL-4 レセプターや細胞接着分子 VCAM-1 遺伝子発現量を有意に増加させた。高齢期では、十分な増殖が行われずに早期に融合が生じること、また、高齢期で血中の IL-4 の分泌が減少することが報告されている示唆されていることから、IL-4 もまた、サルコペニアにおいて重要な生理活性物質と考えられる。この結果より、TRPV1-IL-4 シグナル経路に着目し、検討することとした。

平成 26 年度

TRPV1 のアゴニストである CAP 刺激は筋サテライト細胞の分化マーカー (MyoD や Myogenin) や筋芽細胞の融合に重要である IL-4 の遺伝子発現を有意に増加させた。また、TRPV1 の抑制が筋サテライト細胞の融合を阻害し、外因性の IL-4 によって回復することを明らかにした。一方で、CAP 刺激によるタンパク合成系のシグナルの活性化は観察されなかった。さらに、再生筋においては、中心核を持つ細胞の面積お

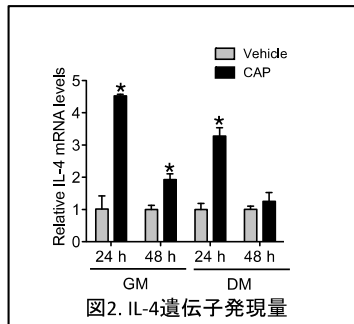


図2. IL-4遺伝子発現量

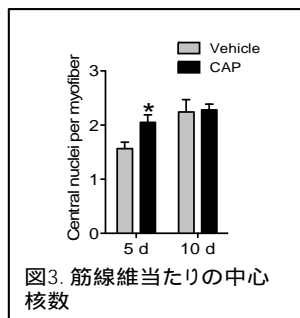


図3. 筋線維当たりの中心核数

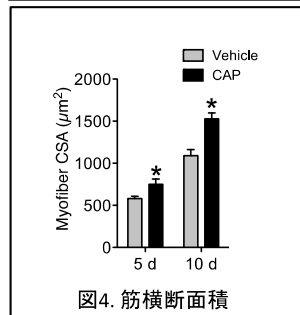


図4. 筋横断面積

よび融合している核数が CAP 刺激によって有意に増加した。しかしながら、筋サテライト細胞数には影響を及ぼさなかった。

今後は、これら成果に基づいて、高齢動物における筋サテライト細胞で検討し、in vivo へと応用していく予定である。

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)

Kurosaka M. and Machida S. Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK2/STAT-3 signalling pathway through cyclin D1 targeting. *Cell Proliferation*. 46: 365-373, 2013. 査読有

Ito T., Fujiya H., Goto K., Ogura Y., Kurosaka M., Yatabe K., Kishiro S., Yoshida A., Yoshioka H., Terauchi K., Beppu M., Funabashi T., Akema T., Musha H. Icing at early stage depresses skeletal muscle regeneration. *Journal of St. Marianna University*. 4: 61-67, 2013. 査読有

Kishiro S., Fujiya H., Goto K., Ogura Y., Kurosaka M., Yatabe K., Ito T., Yoshida A., Yoshioka H., Terauchi K., Beppu M., Funabashi T., Akema T., Musha H. Effects of STG harvest and BTB harvest on knee joint muscles-An immunohistochemical evaluation-. *Journal of St. Marianna University*. 4: 49-59, 2013. 査読有

Kurosaka M. and Machida S. Exercise and skeletal muscle regeneration. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*. 3: 537-540, 2012.

[学会発表](計 12 件)

黒坂光寿, 小倉裕司, 船橋利也, 明間立雄. TRPV1 チャンネルは骨格筋再生と筋サテライト細胞分化を調節する, 第 92 回日本生理学会, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県, 神戸市), 2015 年 3 月 22 日.

黒坂光寿, 小倉裕司, 船橋利也, 明間立雄. 筋サテライト細胞における TRPV1 チャンネルの役割とその機序の解明, 第 69 回日本体力医学会大会, 長崎大学(長崎県, 長崎市), 2014 年 9 月 19 日.

Yoshihara T., Kurosaka M., Kakigi R., Takamine Y., Machida S., Sugiura T., Naito H. Alterations In HDACs Expressions In Response To Endurance Training In Rat Plantaris Muscle. American College of Sports Medicine annual meeting, Indianapolis, USA, (May 2014).

木城智, 藤谷博人, 後藤勝正, 小倉裕司, **黒坂光寿**, 伊藤龍登, 谷田部かなか, 別府諸兄, 船橋利也, 明間立雄, 武者春樹. 半腱様筋・薄筋腱および膝蓋腱採取の膝関節周囲筋への影響, 第28回日本整形外科基礎学術集会, 幕張メッセ(千葉県, 美浜区), 2013年10月18日.

伊藤龍登, 藤谷博人, 後藤勝正, 小倉裕司, **黒坂光寿**, 木城智, 谷田部かなか, 別府諸兄, 船橋利也, 明間立雄, 武者春樹. 骨格筋損傷に対する冷却の影響~損傷後の冷却時期による検討~第28回日本整形外科基礎学術集会, 幕張メッセ,(千葉県, 美浜区) 2013年10月18日.

黒坂光寿, 小倉裕司, 船橋利也, 明間立雄. 筋サテライト細胞における温度依存性 TRP チャネルの発現と機能の検討, 第68回日本体力医学会大会, 日本教育会館(東京都, 千代田区), 2013年9月21日.

Kishiro S., Fujiya H., Goto K., Ogura Y., **Kurosaka M.**, Ito T., Yatabe T., Beppu M., Hunahashi T., Akema T., and Musya H. Effect of patellar tendon harvest on quadriceps femoris muscles. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, Toyohashi, Japan (June, 2013)

Kurosaka M., Ogura Y., Fujiya H., Kishiro S., Ito T., Funabashi T. and Akema T. The role of JAK2/STAT3 signaling pathway in immobilization-induced muscle atrophy. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, Toyohashi, Japan (June, 2013)

黒坂光寿, 小倉裕司, 船橋利也, 明間立雄. 筋損傷・再生過程における JAK2/STAT3 経路の役割. 第90回日本生理学会大会, タワーホール船堀(東京都, 江戸川区), 2013年3月29日.

黒坂光寿, 町田修一. 高濃度 IL-6 は JAK2/STAT3/SOCS3 系を介して筋サテライト細胞の増殖を負に制御する. 第67回日本体力医学会大会, 長良川国際会議場(岐阜県, 岐阜市), 2012年9月14日.

町田修一, **黒坂光寿**. 筋力トレーニング後の総合乳タンパク質摂取がスポーツ選手の筋肉量および脂肪量に及ぼす影響. 第20回日本運動生理学会, 筑波大学(茨城県, つくば市), 2012年7月28日.

Kurosaka M. and Machida S. Interleukin-6/JAK/STAT3-induced satellite cell proliferation is regulated through induction of Cyclin D1, Experimental Biology, SanDiego, USA, (May 2012).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.marianna-u.ac.jp/houjin/staff/univ/seiri.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
黒坂 光寿 (KUROSAKA, Mitsutoshi)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40553970

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: