

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：30110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560369

研究課題名(和文)冬眠動物はなぜ寝たきりにならないのか? -骨格筋萎縮耐性獲得の分子基盤の解明-

研究課題名(英文)Regulation of protein metabolism and muscle mass in hibernating bears: an attractive model of muscle atrophy resistance.

研究代表者

宮崎 充功(MIYAZAKI, Mitsunori)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授

研究者番号：20632467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「冬眠」を長期間の寝たきり状態と仮定して、冬眠動物(ツキノワグマ)がどのような仕組みを利用して骨格筋量を維持しているのか、筋肉細胞の中のタンパク質や遺伝子の働きに注目して解析しました。その結果、骨格筋量の維持に影響を与える因子のうち、筋タンパク質合成を促進する命令系統が冬眠後の筋肉で活性化されていることや、筋肉が大きくなり過ぎないようにリミッターの役割をしている遺伝子の働きが冬眠中に抑えられていること、などがわかりました。

研究成果の概要(英文)：Hibernating mammals including bears experience prolonged periods of torpor and starvation during winter survival for up to 5-6 months. Though physical inactivity and malnutrition generally lead to profound loss of muscle mass and metabolic dysfunction in human, hibernating bears show limited muscle atrophy and can successfully maintain locomotive function following hibernation. In this study, we identified that protein synthesis rate and oxidative metabolism would be enhanced in skeletal muscle of hibernating bear (Japanese black bear) through modulating intracellular signal transduction (up-regulation of mTOR-dependent signaling and down-regulation of myostatin), which then lead to limited loss of muscle mass and maintenance of physical performance.

研究分野：運動生理学

キーワード：冬眠 ツキノワグマ 骨格筋 廃用性筋萎縮 バイオインフォマティクス 寝たきり

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトの身体には約 400 種類の筋肉(骨格筋)があり、成人の場合、華奢な身体つきの方でも体重の約 3 割程度、ガッチリした体型の方では体重の 5 割以上の重量を占めている。骨格筋は、ヒトの身体の中で最も大きな内臓器である。また骨格筋には、使えば使うほど強く/大きくなり(使用性筋肥大)、一方で使わないでいると、どんどん小さく/弱くなっていく(廃用性筋萎縮)という特性がある。前者は筋骨隆々のスポーツ選手やボディビルダー、後者は怪我や病気などで寝たきりになってしまった患者さんなどが良い例であろう。無重力状態で数ヶ月を過ごす宇宙飛行士の筋力が低下してしまうのも、この「廃用性筋萎縮」が大きく関連している。

骨格筋の役割で最も大切な機能は、“力を発揮する”ことに他ならない。身体中の骨格筋が発揮する力(全身の筋力)を維持するためには、全身の骨格筋量を保つことが非常に重要になってくる。

2. 研究の目的

クマ類をはじめとする冬眠性哺乳類にとって、「冬眠」は食物不足や環境温低下といった過酷な冬期環境を生き抜くための生存戦略である。驚くべきことに、冬眠という 5-6 カ月におよぶ身体不活動状態(いわゆる寝たきり状態)を経験するのにも関わらず、冬眠動物の骨格筋量は冬眠期間の前後で大きな変化を示唆ない。ヒトの場合、寝たきり状態に陥ると、骨格筋量や筋力は 1 日あたり 0.5-1.0%の割合で減少していくと推定されている。一方で冬眠動物の場合、筋肉量や筋力は冬眠期間の前後で全く変化しないか(リスの場合、Andres-Mateos et al., EMBO Mol Med 2013) または若干の減少は認められるがヒトに比較して非常に軽微である(クマの場合、Harlow et al., Nature 2001) という特徴を示す。一方で、たとえ冬眠動物(クマ)であっても、冬眠していない活動期に筋肉の働きを制限すると、骨格筋量が大きく減少することが示されている(Lin et al., J Exp Biol 2012)。つまり冬眠動物が有する「長期間寝たままでも筋肉が弱らない/弱りにくい」という仕組みは、リスやクマなど特定の生物種のみが有する生命機能ではなく、冬眠期間に誘導される何らかの生理学的応答の結果もたらされると推察される。この仕組みを解明することで、ヒトの寝たきり防止や効果的なりハビリテーション手法の開発に繋がっていきたいと考え、研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、「冬眠」を長期間の寝たきり状態と仮定して、冬眠動物(ツキノワグマ)がどのような仕組みを利用して骨格筋量を維持しているのか、筋肉細胞の中のタンパク

質や遺伝子の働きに注目して解析を試みた。阿仁クマ牧場(秋田県北秋田市)にて飼養されているツキノワグマを対象として、以下の 2 つのタイムポイントにおいて生体組織サンプル(骨格筋、脂肪および肝臓)を採取し、生化学/分子生物学的な解析に用いた。

(1) 冬眠前後における比較

冬眠前: 11月下旬

冬眠後: 4月上旬

冬眠前後の同一個体から組織サンプル採取を行うことで、冬眠に伴う生理・生化学的变化を解析した。

(2) 活動期および冬眠期における比較

活動期: 6月-7月

冬眠期: 1月-2月

同一個体から活動期および冬眠期に組織サンプル採取を行うことで、身体活動レベルおよび季節変動に伴う生理・生化学的变化を解析した。

生体組織サンプルの採取は全て麻酔下にて行い、その後の解析に用いた。ツキノワグマへの麻酔/外科的処置は、全て獣医師の資格を有する共同研究者(北海道大学、坪田敏男先生/下鶴倫人先生)の管理下において施行している。

【次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析】

採取した骨格筋サンプルから全 RNA を抽出した後、cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いた全転写産物の網羅的発現解析(トランスクリプトーム解析)を行った。同一個体から採取した骨格筋サンプルにおける網羅的遺伝子発現解析およびその季節変動比較を行うことで、特に冬眠中に活性化される(もしくは抑制される)冬眠誘導性遺伝子の探索を行った。

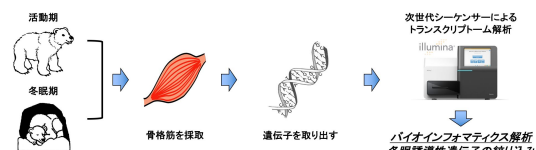


図 1 冬眠誘導性遺伝子の探索方法

4. 研究成果

(1) 冬眠中のクマ骨格筋量の維持機構

冬眠前後で採取したツキノワグマ骨格筋サンプルの筋線維サイズを比較したところ、冬眠後において 2 割程度の筋肉量の減少は認められるもの、ヒト骨格筋萎縮の推定減少量に比較して非常に少ないことがわかった。つまり冬眠中のクマ骨格筋では、不活動状態が持続するのにも関わらず、筋肉量を維持する仕組みがあることが確認された。

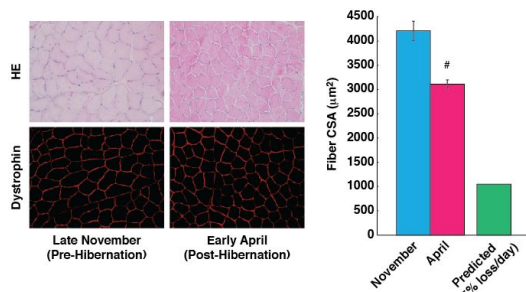


図2 冬眠前後の骨格筋線維サイズの変化

また本研究における解析の結果、骨格筋量の維持に影響を与える因子のうち、いくつか特徴的な変化を示しているものがわかってきました。1) 筋タンパク質合成を促進する作用を持つ mTOR と呼ばれる因子を介した命令系統が、冬眠後の骨格筋において活性化されていること、2) 筋肉量を負に制御する myostatin という遺伝子(普段は筋肉が大きくなり過ぎないようにリミッターの役割をしている)の働きが抑えられていること、などである。またこれ以外にも、細胞内でのエネルギー産生工場の役割をするミトコンドリア関連遺伝子の作用が強くなっていることも確認されました。これらは、活動期には筋肉量を制限しているリミッター(myostatin 遺伝子)の働きを冬眠に伴って解除し、また筋のタンパク質合成が高まりやすい状況に変えることで、長期の不活動で骨格筋が痩せてしまうことを防いでいるのではないかと推察できる。

(2) 冬眠誘導性遺伝子の探索と機能解析

上記の研究結果から、冬眠中において骨格筋量を維持する仕組みの一部が明らかになった。しかしながら、どのような適応変化を利用して筋肉量維持を達成しているのか、その制御機構の詳細は依然不明である。この課題を解明するため、「ツキノワグマ骨格筋の全ての遺伝子を読み取り、その中から冬眠中にだけ特別に作用しているものを探し出す」という分析を行った。バイオインフォマティクス手法を応用した解析の結果、特に骨格筋においては、合計 234 遺伝子が有意に発現変動(119 遺伝子が冬眠に伴い発現上昇、115 遺伝子が冬眠に伴い発現低下)を示すことが明らかとなった。現在は、この候補遺伝子のうち筋肉量の変化に影響を与えることが予想されるものを絞り込み、その機能解析を進めているところである。

(3) 今後の研究の展開

これまでの解析から、冬眠中に骨格筋量を維持する仕組みの一部が明らかになってきた。しかし、なぜ冬眠するクマがそのまま寝たきりにならずに済むのか、その根本的な仕組みは依然として未解明のままである。これまでヒト骨格筋の廃用性萎縮を緩和するための方策として、薬剤投与(抗炎症剤など)

やホルモン補充療法(テストステロンなど)、栄養サプリメント、温熱や筋伸張を応用した物理療法など、非常に多くの方法が検討されてきたにも関わらず、効果的な介入方法は現在まで開発されていない。骨格筋量を効率的に維持するための唯一の方法は、レジスタンストレーニングを中心とした筋力訓練/身体運動のみである。しかしながら、傷害や疾病の加療のために安静を必要とする患者や、身体機能(もしくは精神機能)レベルの低い虚弱状態の高齢者などに対し、一定強度以上の身体運動を負荷することはできない。つまり、高強度の身体運動を必要とせず、なおかつ全ての対象者に応用可能な骨格筋量の回復/維持方法を開発することは、基礎疾患や障害からの身体機能回復を効率化させるだけでなく、健康寿命の促進やQOLの向上、さらには増加の一途を辿る医療費/介護費の削減といった社会的課題の解決にも大いに貢献することが出来る。

本研究課題では、冬眠動物(ツキノワグマ)における骨格筋萎縮耐性獲得の分子基盤探索に関する研究について詳細な解析を行ってきた。冬眠動物に存在する骨格筋萎縮耐性ともいえる生体機構の一端を明らかにし、ヒトの身体機能低下を防止する新たな治療戦略を開発することは、超高齢化社会を現実を迎えている我が国の社会的要請に対しても高く貢献するものである。この研究をさらに推進することで、将来的には、ヒトの寝たきり防止や効果的なリハビリテーション手法の開発に繋がる知見が得られることが期待される。

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 3 件)

- (1) Mitsunori Miyazaki and Tohru Takemasa, TSC2/Rheb signaling mediates ERK-dependent regulation of mTORC1 activity in C2C12, FEBS Open Bio, 2017 Mar;7(3):424-33. 査読あり
DOI: 10.1002/2211-5463.12195.
- (2) 宮崎充功、冬眠中のクマはなぜ寝たきりにならないのか?、BEARS JAPAN、2016、16 巻、26-27、査読なし

[学会発表](計 15 件)

- (1) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Regulation of protein metabolism and muscle mass in hibernating bears: an attractive model of muscle atrophy resistance. 24th International Conference on Bear Research and Management, "Symposium:

- Bear Physiology with Implications for Humans", Anchorage, AL, USA, June 2016
- (2) Michito Shimozuru, Mitsunori Miyazaki and Toshio Tsubota, Changes in energy metabolism in hibernating black bears: an analysis of gene expression and metabolites in liver and skeletal muscle. 24th International Conference on Bear Research and Management, "Symposium: Bear Physiology with Implications for Humans", Anchorage, AL, USA, June 2016
 - (3) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Hibernating bear muscle shows slow-fiber shifting and mitochondrial biogenesis despite prolonged physical inactivity. Cell Symposia: Exercise Metabolism, Amsterdam, The Netherlands, July 2015
 - (4) Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru and Toshio Tsubota, Altered signaling pathway governing protein metabolism in skeletal muscle of the Japanese black bear during hibernation. Experimental Biology 2015, Boston, MA, USA, March 2015
 - (5) **宮崎充功**、骨格筋量を保持するための新奇ストラテジー探索、第69回日本体力医学会大会、長崎大学、長崎市、2014年9月、シンポジウム招待講演

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/mitsunori-miyazakiphd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 充功 (MIYAZAKI MITSUNORI)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授

研究者番号：20632467

(2) 連携研究者

坪田 敏男 (TSUBOTA TOSHIO)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：10207441

下鶴 倫人 (SHIMOZURU MICHITO)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：50507168