

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月 6日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05364

研究課題名(和文) 骨格筋細胞における代謝変換誘導因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel factors influencing muscle fiber metabolism

研究代表者

本橋 紀夫 (Motohashi, Norio)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50532727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は肥大・萎縮をする可塑性と共に、筋線維タイプ(遅筋・速筋)変換能を有し、それらは関連すると考えられるが、詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では、全ての筋線維タイプを蛍光蛋白で識別できるマウス筋細胞を用いて、筋線維タイプ変換を惹き起こす生体内因子・薬剤を網羅的に探索した。その結果、*in vivo*及び*in vitro*で遅筋線維、或は速筋線維を誘導する因子を複数同定した。さらに遅筋化が進行する老齢マウスに対して速筋誘導因子を投与した結果、筋萎縮の予防・運動機能および筋代謝機能改善を認め、速筋誘導因子は加齢性筋萎縮を予防・改善効果がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle has plasticity between hypertrophy and atrophy under several circumstances, and is composed of two types of muscles, slow- and fast-twitch muscles. Muscle hypertrophy or atrophy is known to affect muscle fiber transition. However, it is unclear how muscle fiber type transitions are regulated. Using myotubes derived from MusColor mice, which allow distinguishing each muscle fiber type by fluorescence, we screened cytokines or growth factors to identify potential fiber type modulator, and found that several factors could influence fiber type transition. One of them could induce fast-to-slow type fiber transition both *in vitro* and *in vivo*. Additionally, administration of the factor that induces fast-type muscle against aged mice resulted in the improvement of muscle metabolism and functions, suggesting the possibilities that the factors obtained in this study may lead to clarify the mechanism of muscle fiber type transitions and provide new therapy for muscle atrophy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨格筋 筋線維タイプ 代謝 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

体重の約 40%を占める骨格筋は、可塑性を有し各種運動等によって肥大する一方、老化や各種病態・不活動によって萎縮する。骨格筋を構成する筋線維は遅筋と速筋から成り立ち、運動により可逆的な変化(遅筋・速筋)が誘導され、代謝変換(酸化系・解糖系)を伴う。例えばレジスタンストレーニングやドーピング薬β2-agonist 投与によって惹起される筋肥大では速筋が増加する一方で、持久性運動では遅筋が増加する。また加齢性筋萎縮(サルコペニア)やカロリー制限・癌悪液質によって惹き起こされる筋萎縮では遅筋の割合が優位になる一方で、寝たきり等による廃用性筋萎縮やギプス固定・無重力環境下曝露による筋萎縮では速筋が誘導される。すなわち、筋肥大・萎縮に伴う筋線維タイプ変換は、原因によって大きく異なる事を示している。更には、筋線維タイプ変換を誘導する因子には、筋肥大・萎縮を誘導する因子と共通のものが含まれる可能性を考えた。ところが筋線維タイプ変換の詳細なメカニズムは未解明な部分が多く、さらに筋線維タイプと骨格筋の可塑性との関連についても全く不明である。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、骨格筋線維タイプを定義する全ての MyHC 鎖 (type-I, -IIA, -IIB/X, -IIB)を蛍光蛋白 (YFP, Sirius, Cerulean, mCherry)を用いて識別できる MusColor マウスを作製した(投稿準備中)。

本申請では、このマウス由来筋細胞を用いて、筋線維タイプ変換を引き起こす生体内物質・薬剤等を網羅的に探索し、新規筋線維タイプ変換誘導因子を同定する事を目的とする。また、骨格筋におけるその因子の作用機序を解明し、どのように筋肥大・萎縮を誘導するかを明らかにする。筋線維タイプ変換誘導因子の同定は、サルコペニアや不活動によって惹き起こされる筋萎縮の要因・機序解明に繋がると予想される一方で、それら病態に対する治療薬開発にも繋がると期待される。そこで、同定した因子を用いて加齢や不活動による筋萎縮に対する予防・治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) MusColor マウスを用いた筋線維タイプ変換誘導因子の探索

MusColor マウス骨格筋から筋衛星細胞を単離・培養し、得られた筋管細胞に対し、生体内因子・薬剤等を添加した。添加後、MyHC type-I-YFP(遅筋)および type-IIB-mCherry(速筋)の発現を蛍光顕微鏡下で測定し、YFP 或は mCherry を顕著に誘導する物質の網羅的スクリーニングを行った。筋線維タイプ変換は、定量 PCR を用いた MyHC 遺伝子発現(遅筋:

Myh-7, 速筋: Myh-2, -1, -4)で併せて確認した。

(2) 筋線維タイプ変換誘導因子の筋線維の代謝機能への影響の検証

筋線維タイプ変換が代謝機能を伴う変換か否かを in vitro で検討する為、候補因子で処理した筋管を、細胞外フラックスアナライザー-XFp を用いて測定した。酸素消費量を指標とするミトコンドリア活性、或は pH 値変化を指標とする解糖能の変化を検討した。

(3) 筋線維タイプ変換誘導因子投与による骨格筋への影響の検証

In vitro で筋線維タイプ変換を確認した生体内因子・薬剤が in vivo においても同様に変化を誘導するか否かを確認する為、野生型マウスに対して筋線維タイプ変換誘導因子・薬剤の投与を行った。投与開始1ヶ月後、マウス骨格筋採取・筋重量測定をした。更にミトコンドリア内代謝を制御する SDH 或は NADH 活性を評価した。

(4) 筋萎縮モデルマウスに対する筋線維タイプ変換誘導因子の効果の検証

筋萎縮モデルマウスに対して筋線維タイプ変換誘導因子を投与し、筋線維タイプ・代謝の変化及び筋萎縮を抑制できるか否かを検討した。老齢マウス(19~24ヶ月齢)に対し、筋線維タイプ変換誘導因子・薬剤を投与し、筋萎縮の予防・運動機能改善・寿命延長効果があるか否かを検討した。投与開始1~2ヶ月後、各種筋力機能測定し、マウス筋重量を測定した。また、SDH 或は NADH 活性を評価した。

4. 研究成果

(1) MusColor マウス由来筋細胞を用いて、筋線維タイプ変換を惹き起こす生体内因子・薬剤を網羅的に探索し、遅筋線維 (Type-I) 或は速筋線維 (Type-IIB) を誘導する因子を複数同定した。これらの変化は MyHC 遺伝子発現においても確認された。さらに筋線維タイプ変換は代謝機能を伴う変換であり、遅筋を誘導する因子は主にミトコンドリア代謝能が、速筋を誘導する因子は主に解糖能を亢進させる事が明らかとなった。

(2) In vitro で筋線維タイプ変換を確認した生体内因子・薬剤を野生型マウスに投与を行い、効果の検証を行った。新規遅筋誘導因子をマウスに投与した結果、生体内においても遅筋を誘導する事が免疫染色及び MyHC 遺伝子発現で確認された。さらにこの因子は、速筋において筋萎縮を誘導し、且つ SDH 及び NADH 活性を指標とするミトコンドリア代謝機能を低下させる事が明らかとなった。

(3) 筋線維タイプ変換に関わる新規シグナル

経路を解明する為、筋線維タイプ変換を誘導する既知遺伝子(Sirt1, Pgc-1 α)を筋特異的に欠損したマウス MusColor マウスを作成した。これらマウス由来筋管細胞に対し新規遅筋誘導因子を添加した結果、新規遅筋誘導因子は Pgc-1 α ではなく、Sirt1 を介して遅筋線維を誘導している事が明らかとなった。

(4) 加齢性筋萎縮に対する筋線維タイプ変換誘導因子の効果を検討した。遅筋化が進行している老齢マウスに対し、速筋誘導薬剤を投与した。その結果、筋萎縮の予防効果を認め、更に筋力・運動機能、および筋代謝機能改善を認め、速筋誘導因子には加齢性筋萎縮に対する改善効果がある可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Mori S, Motohashi N, Takashima R, Kishi M, Nishimune H, Shigemoto K: Immunization of mice with Lrp4 induces myasthenia similar to MuSK-associated myasthenia gravis. *Exp Neurol*, 297:158-167 (2017), 査読有

DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.08.006

2. 本橋 紀夫: 「筋サテライト細胞除去と骨格筋量に関する論文の考察」 - 筋サテライト細胞の新たな可能性を探る -, 基礎老化研究 40(1), 41-44 (2016), 査読有

http://www.jsbmg.jp/products/products_back2016.html

3. Shigemoto K, Motohashi N, Mori S: Metabolic plasticity in sarcopenia. *J Phys Fitness Sports Med.* 4: 347-350 (2015), 査読無

DOI: 10.7600/jpfsm.4.347

4. Alexander MS*, Casar JC*, Motohashi N*: Stem Cell Differentiation and Therapeutic Use: Progress towards the Clinic. *Stem Cells Int.*, 2015: 308128(Editorial) (2015) *Contribute equally to this work, 査読無

DOI: 10.1155/2015/308128

5. Shimizu-Motohashi Y, Asakura Y, Motohashi N, Belur NR, Baumrucker MG, Asakura A: Pregnancy-induced amelioration of muscular dystrophy phenotype in mdx mice via muscle membrane stabilization effect of glucocorticoid. *PLoS One*, 10(3):e0120325 (2015), 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0120325

[学会発表](計 13 件)

<国際学会>

1. Norio Motohashi, Shu-ichi Mori, Rumi Takashima and Kazuhiro Shigemoto: Identification of novel factors influencing muscle fiber type transition, 2017 Keystone Symposia Conference; Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease, 神奈川(横浜),

2016.5.17

<国内学会>

1. 本橋 紀夫, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏: 筋衛星細胞と筋線維タイプの関連, 首都大学東京バイオコンフェレンス 2017, 東京, 2017.11.18

2. 本橋 紀夫, 朝倉 淳, 森 秀一, 高嶋 留美, 上住 円, 上住 聡芳, 重本 和宏: 新規骨格筋代謝制御因子の同定, 第 5 回若手による骨格筋細胞研究会, 兵庫(神戸), 2017.11.14

3. 本橋 紀夫, 朝倉 淳, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏: 骨格筋代謝制御因子の同定, 第 7 2 回日本体力医学会大会, 愛媛(松山), 2017.9.18

4. 本橋 紀夫, 朝倉 淳, 森 秀一, 高嶋 留美, 上住 円, 上住 聡芳, 重本 和宏: 骨格筋代謝制御因子の同定, 第 3 回日本筋学会, 東京(小平), 2017.8.4

5. 本橋 紀夫: 筋衛星細胞の自己複製機構と筋線維タイプ, 第 5 回骨格筋生物学研究会, 東京, 2017.3.4

6. 本橋 紀夫, 森 秀一, 山崎 綾乃, 高嶋 留美, 重本 和宏: 新規筋線維タイプ変換誘導因子の探索, 第 4 回若手による骨格筋細胞研究会, 愛知, 2016.11.14

7. 本橋 紀夫, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏: microRNA による骨格筋幹細胞の維持機構, 第 7 1 回日本体力医学会大会, 岩手, 2016.9.23

8. 本橋 紀夫, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏: 筋線維タイプと骨格筋幹細胞維持機構の関連, 第 2 回日本筋学会, 東京, 2016.8.5

9. 本橋 紀夫, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏, 朝倉 淳: 筋線維タイプと筋衛星細胞自己複製機構の関連, 第 3 回若手による骨格筋細胞研究会, 福岡, 2015.11.24

10. 本橋 紀夫, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏, 朝倉 淳: 筋線維タイプと筋衛星細胞自己複製機構の関連, 第 7 0 回日本体力医学会大会, 和歌山, 2015.9.19

11. 本橋 紀夫, 森 秀一, 重本 和宏, 高嶋 留美, 高谷 智英, 朝倉 淳: microRNA を介した骨格筋幹細胞維持機構, 第 1 回日本筋学会, 東京, 2015.8.8

12. 本橋 紀夫, 朝倉 淳, 森 秀一, 高嶋 留美, 重本 和宏: 骨格筋幹細胞における維持機構の解明, 第 3 8 回日本基礎老化学会大会, 横浜, 2015.6.14

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 紀夫 (MOTOHASHI, Norio)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・
研究員
研究者番号：50532727

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()