

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20349

研究課題名(和文)敗血症による筋分化抑制機序の解明と治療薬の探索

研究課題名(英文) Identification of the mechanism of sepsis induced muscle wasting and potential pharmacological treatment

研究代表者

大野 雄康 (Ono, Yuko)

福島県立医科大学・医学部 救急医療学講座・助教

研究者番号：00745333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はリポポリサッカライド(LPS)が骨格筋新生プロセスに及ぼす影響と、その機序を見出す事である。LPSは用量依存的にC2C12筋芽細胞のNF- $\kappa$ Bを活性化し、myogeninおよびMyoDの発現を低下させ、myostatinの発現を上昇させ、骨格筋新生プロセスを阻害した。Toll like receptor 4阻害剤であるTAK-242、およびTNF 中和抗体はNF- $\kappa$ Bの活性を抑制し、myogenin、MyoDの発現を回復させ、さらにmyostatinの発現を低下させ、骨格筋新生能を部分的に回復させた。本研究により、敗血症誘発性骨格筋萎縮の新規分子基盤および治療標的が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on skeletal muscle myogenesis. LPS dose-dependently and significantly decreased the formation of C2C12 myotubes and the expression of myosin heavy chain II, myogenin, and MyoD, and increased NF- $\kappa$ B DNA-binding activity and myostatin expression. Both TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signaling and anti-TNF- $\alpha$  antibody reduced the LPS-induced increase in NF- $\kappa$ B DNA-binding activity, downregulation of myogenic regulatory factors, and upregulation of myostatin, thereby partially rescuing the impairment of myogenesis. Our data suggest that LPS inhibits myogenic differentiation via a TLR4 and NF- $\kappa$ B-dependent pathway and an autocrine/paracrine TNF- $\alpha$ -induced pathway. These pathways may be involved in the development of muscle wasting caused by sepsis or metabolic endotoxemia. This study shows novel molecular basis of sepsis induced muscle wasting and the therapeutic target for this etiology.

研究分野：救急医学、薬理学

キーワード：骨格筋分化 敗血症 Toll like receptor 4 TAK 242 TNF

## 1. 研究開始当初の背景

Lipopolysaccharide (LPS) はグラム陰性菌細胞壁の主な構成成分である。循環血漿中の LPS 濃度上昇は、敗血症だけでなく糖尿病、末期腎不全、肝硬変等の様々な内因性疾患でも認められる。(後者は metabolic endotoxemia として知られている)。

骨格筋の病的萎縮はこれら全ての病態に共通する徴候である。筋力低下は日常生活動作を著しく制限し、患者の生命予後を悪化させ、大きな健康被害を引き起こす。従って、LPS による骨格筋萎縮分子メカニズムの解明は重要な課題である。

骨格筋は、筋芽細胞から筋管細胞を経て再生修復される。この骨格筋形成プロセスの障害は、病的筋萎縮の主要な原因となり得る。しかしながら、LPS が骨格筋形成過程にどのような機序で、どのように影響を与えるかこれまで不明であった。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、我々は以下の2点を明らかにすることを試みた。

- (1). LPS が筋形成過程にどのような影響を及ぼすか。
- (2). もし LPS が筋形成を抑制するとしたら、そのメカニズムは何か。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、確立した骨格筋分化モデル細胞株である、マウス筋芽細胞 C2C12 cell line を使用した。これを 5% ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地 (成長培地) でコンフルエントまで増殖後、2% ウマ血清含有ダルベッコ改変イーグル培地 (分化誘導培地) で LPS (0.1 または 1  $\mu$ g/mL)、Toll like receptor (TLR) 4 signal の特異的阻害剤である TAK-242 (1  $\mu$ M)、および tumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$  中和抗体 (5  $\mu$ g/mL) 存在下/非存在下で培養した。

分化度の指標として、1) myogenic index (メイグリユンワルド・ギムザ染色した時の筋管細胞中の核の割合)、2) 骨格筋特異的タンパク質であるミオシン重鎖 II (MyHC II) の発現量を用いた。

分子細胞生物学的な検討として、正の骨格筋分化誘導因子である myogenin、MyoD および負の分子シグナルである myostatin の発現量をウエスタンブロット法で定量した。Nuclear factor -  $\kappa$  B (NF  $\kappa$  B) の活性は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。

## 4. 研究成果

LPS は TLR4 のリガンドとして作用する。そこでまず、分化誘導中の C2C12 細胞における TLR4 mRNA の発現を調べた。

図 1 に示すように、骨格筋分化のどの段階においても TLR4 mRNA は安定して発現していた。

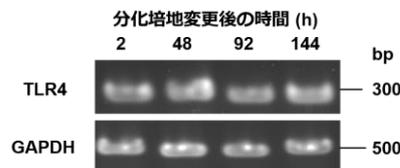


図 1 TLR4 mRNA は骨格筋形成プロセスのどの段階においても、マウス筋芽細胞上に安定して発現している。TLR4 および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 内部標準) のアガロースゲル電気泳動像。

この結果から、LPS は骨格筋形成プロセスのいずれの段階においても、筋芽細胞上の TLR4 に結合しうることが示された。

骨格筋分化に LPS が及ぼす影響を形態的に分析するために、LPS (0.1 または 1  $\mu$ g/mL) 存在下/非存在下で筋芽細胞を 144 時間培養し、メタノール固定の後メイグリユンワルド・ギムザ染色を行った。LPS は筋管細胞の形成を用量依存的に抑制し(図 2A)、myogenic index および筋管細胞の径を用量依存的に減少させた(図 2B および C)。

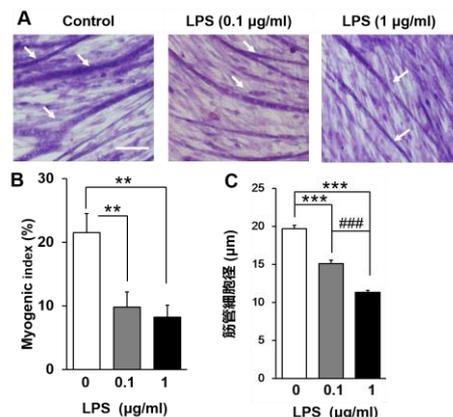


図 2 LPS が骨格筋分化に及ぼす影響。(A) メイグリユンワルド・ギムザ染色像。LPS は用量依存的に、多核の筋管細胞を減少させた。スケールバー=100  $\mu$ m。(B) LPS は myogenic index を減少させた。(C) LPS は筋管細胞径を低下させた。それぞれのグループで 50-60 のランダムに選んだ顕微鏡視野において、175-296 の筋管細胞をカウントした。\*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, ###p < 0.001。

同様のプロトコルを用いて、骨格筋分化マ-

カーである MyHC II の発現量をウエスタンブロット法で定量した。LPS は MyHC II の発現を用量依存的に抑制した (図 3)。

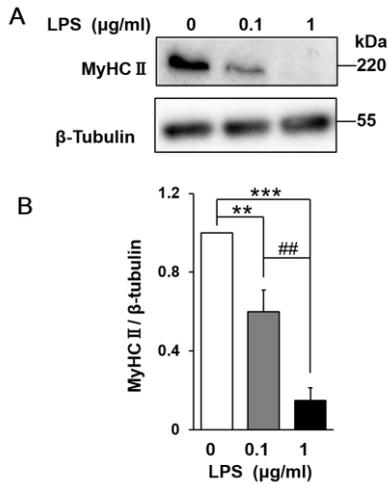


図 3. LPS は用量依存的に MyHC II 発現量を低下させた。(A) 代表的なウエスタンブロット像と、(B) その定量化。β-Tubulin は内部標準として用いた。N=13-14. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, ##p < 0.01, #p < 0.05。

図 2, 3 に示す結果を合わせて、用量依存的な、LPS による骨格筋形成阻害効果が示された。

次に、骨格筋分化 48 時間後における、myogenin、MyoD の発現量をウエスタンブロット法を用いて定量化した。図 4 に示すように、LPS は用量依存的に myogenin および MyoD の発現量を低下させた。

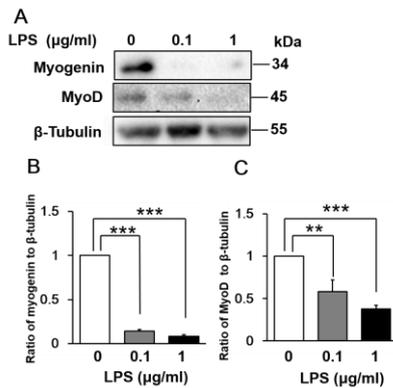


図 4. LPS は用量依存的に myogenin および MyoD の発現量を低下させる。(A) 代表的なウエスタンブロット像と、(B) および (C) その定量化。β-Tubulin は内部標準として用いた。N=6-7. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01

更に LPS は myostatin の発現量および核内転写因子 NF-κB の活性を用量依存的に増加させた (図 5)。

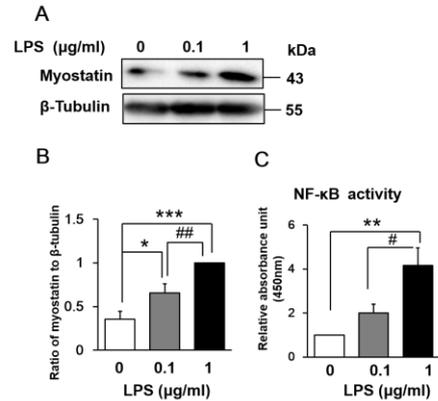


図 5. LPS は用量依存的に myostatin の発現量および NF-κB の活性を増加させる。(A) 代表的な myostatin のウエスタンブロット像。β-Tubulin は内部標準として用いた。(B) (A) に示すデータの定量化。N=14. (C) ELISA を用いて検出した、NF-κB 活性。N=5. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05, ##p < 0.01, #p < 0.05。

図 4 および図 5 で示した結果から、LPS による MyoD および myogenin の downregulation と、LPS による myostatin の upregulation は、NF-κB の活性上昇を介している事が示唆された。

次に、LPS の筋分化抑制効果が可逆性かどうか調べるために、LPS を 1 μg/mL 含んだ分化培地で 48 時間 C2C12 cell を培養したのち、新鮮な分化培地に置換し、さらに 24 時間および 48 時間培養した。myogenin の発現量を継続的にウエスタンブロット法で検出した。図 6 に示すように LPS を wash out すると myogenin の発現は速やかに回復した。

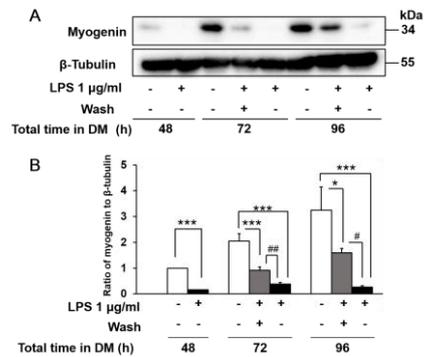


図 6 LPS の筋形成抑制作用は可逆性である。(A) 代表的なウエスタンブロット像と、(B) その定量化。β-Tubulin は内部標準として用

いた。N=5. \*\*\*p < 0.001, \*p < 0.05, #p < 0.05, ##p < 0.01.

この結果から、LPS の筋形成抑制作用は可逆的であり、細胞死誘導などの不可逆的な変化ではない事が示唆された。

次に TLR4 の薬理的な制御が、LPS 誘発性の骨格筋分化抑制を修正しうるかどうかが検討するために、C2C12 cell を LPS (1  $\mu$ g/mL) および TAK-242 (1  $\mu$ M) 存在下/非存在下で 144 時間培養した。TAK-242 投与により、多核の分化した筋管細胞の割合 (図 7A)、fusion index (図 7B)、および筋管細胞径 (図 7C) がいずれも有意に回復した。

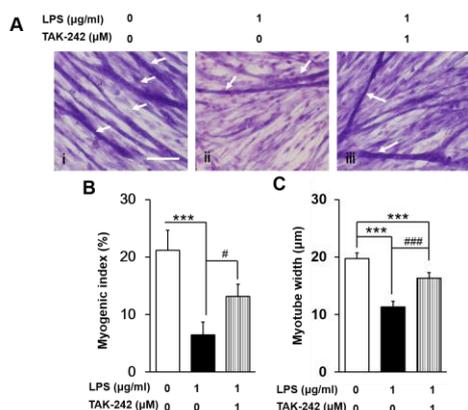


図 7. LPS 誘発性骨格筋分化抑制に対する、TAK-242 の効果. (A) メイグリユンワルド・ギムザ染色像。TAK-242 投与により多核の筋管細胞が増加した。スケールバー=100  $\mu$ m. (B) TAK-242 は myogenic index を回復させた。(C) TAK-242 は筋管細胞径を回復させた。それぞれのグループで 50-60 のランダムに選んだ顕微鏡視野において、194-296 の筋管細胞をカウントした。\*\*\*p < 0.001, ###p < 0.001, #p < 0.05.

図 8 に示すように、TAK-242 は MyHC II の発現量を有意に回復させた。

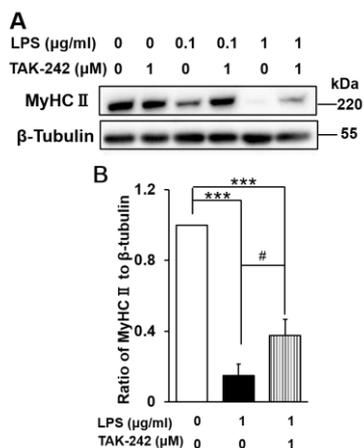


図 8. TAK-242 投与による MyHC II 発現量の回復. (A) 代表的なウエスタンブロット像と、(B) その定量化。 $\beta$ -Tubulin は内部標準として用いた。N=12-13. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, ##p < 0.01.

次に、TAK-242 投与により LPS 誘発性の正の分化誘導シグナルの発現低下、および負の分化誘導シグナル発現上昇が修正されるかどうかを調べた。

図 9 に示すように、TAK-242 投与により LPS による myogenin の downregulation は有意に回復したが、myoD は回復しなかった。

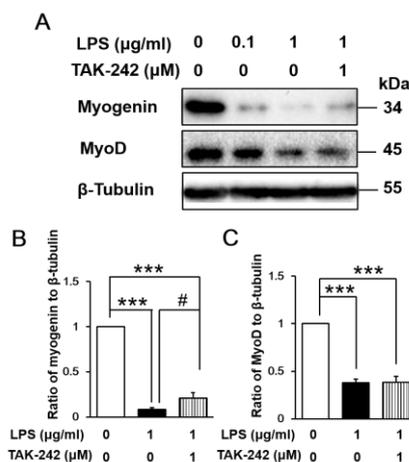


図 9. TAK-242 は LPS 誘発性の myogenin 発現低下を修正する。代表的なウエスタンブロット像 (A) と、その定量化 (B, myogenin および C, MyoD)。 $\beta$ -Tubulin は内部標準として用いた。N=5-7. \*\*\*p < 0.001, #p < 0.05.

図 10 に示すように、TAK-242 投与で、LPS による myostatin および NF  $\kappa$  B の upregulation は有意に抑制された。

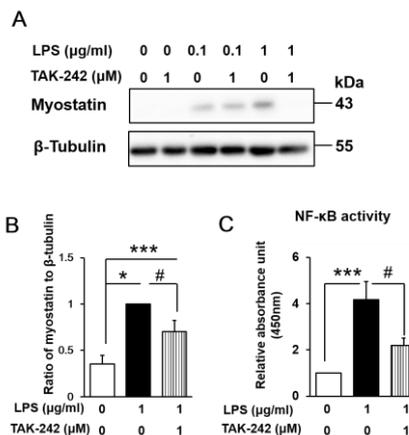


図 10. TAK-242 は LPS 誘発性の myostatin および NF  $\kappa$  B の upregulation を抑制する。(A)

代表的な myostatin のウェスタンブロット像と、(B) その定量化。β-Tubulin は内部標準として用いた。N=14-16. (C) ELISA を用いて検出した、NFκB の活性。N=5. \*\*\*p < 0.001, \*p < 0.05, #p < 0.05.

図 9 および図 10 の結果は、TLR4 が LPS 誘発性骨格筋分化抑制の、NFκB より上流のレギュレーターである事を示す。

筋芽細胞および骨格筋自身も、免疫細胞同様、LPS 刺激により炎症性サイトカイン (TNF-α およびインターロイキン 6) を放出する事が知られている。この事から LPS 誘発性骨格筋萎縮に、このオートクリンもしくはパラクリン分泌される TNF-α が影響を及ぼしている可能性を考えた。

この可能性を検証するために、LPS 誘発性の骨格筋分化抑制が TNF-α 中和抗体 (5 μg/mL) により回復するかどうか検討した。

図 11 に示すように、TNF-α 中和抗体により、LPS による myogenin および MyoD の downregulation は有意に回復した。

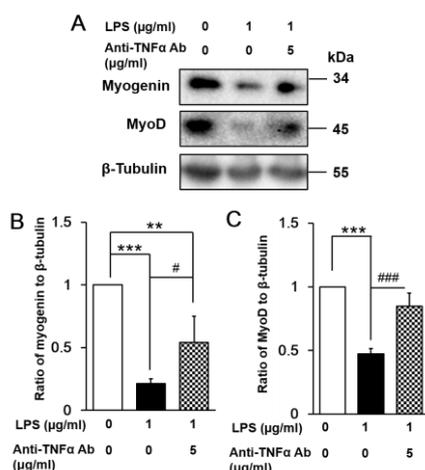


図 11. TNF-α 中和抗体は LPS 誘発性の myogenin および MyoD 発現低下を修正する。

(A) 代表的なウェスタンブロット像と、(B) および (C) その定量化。β-Tubulin は内部標準として用いた。N=7-15. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, ###p < 0.001, #p < 0.05.

図 12 に示すように、TNF-α 中和抗体により、LPS による myostatin および NFκB の upregulation は有意に抑制され、MyHC II の発現低下も有意に回復した。

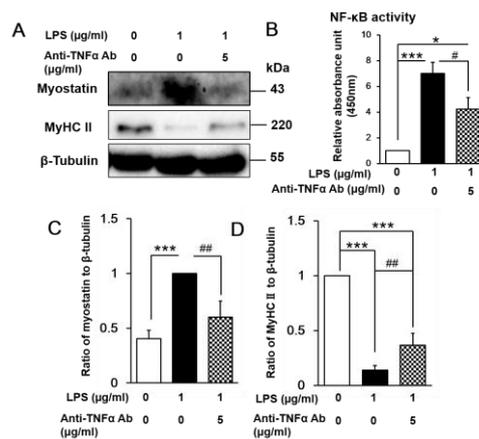


図 12. TNF-α 中和抗体は LPS 誘発性の myostatin および NFκB の upregulation を抑制し、MyHC II の発現を回復させる (A) 代表的な myostatin および MyHC II のウェスタンブロット像。β-Tubulin は内部標準として用いた。(B) ELISA を用いて検出した、NFκB の活性。N=7. (C) および (D) (A) の定量化。N=5-21. \*\*\*p < 0.001, \*p < 0.05, ## p < 0.01, # p < 0.05.

図 11, 図 12 で示されたデータより、筋芽細胞からオートクリンもしくはパラクリン分泌される TNF-α が少なくとも一部、LPS による骨格筋分化抑制に関与している可能性が示された。

ここまで得られたデータから導かれる、LPS の骨格筋分化抑制メカニズムのモデルを図 13 に示す。

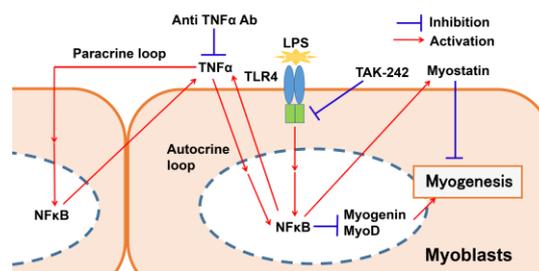


図 13. LPS が骨格筋分化プロセスを抑制する機序のシエーマ.

総括すると、本研究の結果は LPS が筋芽細胞の TLR4-NFκB および オークリン/パラクリン TNF-α 誘発経路を通して骨格筋形成を抑制することを示唆している。これらの経路が、敗血症や metabolic endotoxemia における病的骨格筋萎縮の一因になっている可能

性がある。本研究により TLR4-NF $\kappa$ B および TNF- $\alpha$  の薬理的な制御が、LPS 誘発性骨格筋萎縮の新規の治療ターゲットになる可能性が示された。

#### 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 16 件、以下は代表)

1. Ono Y, Sakamoto K. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor- $\alpha$ . PLoS One. 2017;12:e0182040. doi: 10.1371/journal.pone.0182040. 査読有.
2. Tanaka S, Ono Y, Sakamoto K. DCEB10 facilitates myogenic differentiation via intermediate conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel activation in C2C12 myoblasts. J Pharmacol Sci. 2017;133:276-279. doi: 10.1016/j.jphs.2017.02.005. 査読有.
3. Ono Y, Sugiyama T, Chida Y, et al. Association between off-hour presentation and endotracheal-intubation-related adverse events in trauma patients with a predicted difficult airway: A historical cohort study at a community emergency department in Japan. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2016;24:106. doi: 10.1186/s13049-016-0296-2. 査読有.
4. Ono Y, Tanigawa K, Shinohara K, et al. Difficult airway management resources and capnography use in Japanese intensive care units: a nationwide cross-sectional study. J Anesth. 2016;30:644-52. doi: 10.1007/s00540-016-2176-3. 査読有.
5. Ono Y, Shinohara K, Goto A, et al. Are prehospital airway management resources compatible with difficult airway algorithms? A nationwide cross-sectional study of helicopter emergency medical services in Japan. J Anesth. 2016;30:205-14. doi: 10.1007/s00540-015-2124-7. 査読有.
6. Ono Y, Ishida T, Iwasaki Y, et al. The off-hour effect on trauma patients requiring subspecialty intervention at a community hospital in Japan: a retrospective cohort study. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2015;23:20. doi: 10.1186/s13049-015-0095-1. 査読

有.

〔学会発表〕(計 15 件、以下は代表)

(招待講演/シンポジウム)

1. 大野 雄康. Lipopolysaccharide は骨格筋新生能を低下させる : ICU acquired weakness の新規分子機序の可能性. シンポジウム. ICU-AW の病態生理とその対策 up to date. 第 45 回日本集中治療医学会学術集会, 2018 年 2 月 21 日, 東京.
2. 大野 雄康, 篠原 一彰. 声門上器具は本邦救急部・集中治療部で適切に使われているか? 教育講演. 第 44 回日本集中治療医学会学術集会, 2017 年 3 月 11 日, 札幌.
3. 大野 雄康. 直接喉頭鏡とビデオ喉頭鏡～真の両刀使いとなるために～ ランチョンセミナー講師. 第 29 回東北救急医学会総会/学術集会 第 25 回日本救急医学会東北地方会, 2015 年 5 月 30 日, 福島.  
(一般演題)
4. 大野 雄康, 坂本 多穂. Lipopolysaccharide は Toll like receptor 4/Nuclear factor kappa B 経路を介してマウス筋芽細胞の筋新生を抑制する. 優秀演題. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 2017 年 6 月 8 日, 神戸.
5. Ono Y, Kimura J, Sakamoto K: LIPOPOLYSACCHARIDE INHIBITS MOUSE MYOGENIC DIFFERENTIATION BY INCREASING MYOSTATIN EXPRESSION The 89th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological society, March 9, 2016, Yokohama, Japan.
6. 大野 雄康, 木村 純子, 坂本 多穂. Lipopolysaccharide はマウス筋芽細胞 C2C12 の筋分化を抑制する. 第 66 回日本薬理学会北部会, 2015 年 9 月 18 日, 富山.

〔その他〕

ホームページ等

1. 福島県立医科大学 研究成果情報. 主な研究成果概要 [2017 年度]. <https://www.fmu.ac.jp/univ/kenkyuseika/research/1704.html>
2. 福島県立医科大学 研究者データベース. 研究者詳細. [http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1132\\_ja.html](http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1132_ja.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 雄康 (Yuko Ono)

公立大学法人福島県立医科大学 救急医療学講座 助教

研究者番号 : 00745333