

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03263

研究課題名(和文) 運動効果獲得の個体差を理解するための骨格筋エピジェネティクス研究

研究課題名(英文) Skeletal muscle epigenetics for understanding individual differences in response to exercise

研究代表者

河野 史倫 (Kawano, Fuminori)

松本大学・大学院 健康科学研究科・准教授

研究者番号：90346156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：遍歴の異なる骨格筋では「どのようなエピジェネティクスの違いがあるのか」を明らかにすることを主たる目的として研究全体を実施した。運動によるヒストン分布変化は、運動期間後も残存し、不活動に対する応答性を減弱させた。若齢期の高脂肪食摂取は、加齢に伴うヒストンバリエーションの取り込みを減少させ、耐糖能低下を抑制した。ヒトにおいてもレジスタンストレーニング後にアセチル化ヒストンが増加し、運動効果に関連した遺伝子発現が高まりやすい状態になっていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動効果獲得や病気のなりにくさには個人差があることは周知の事実であるが、このような違いが後天的にどのように発生するのかは明らかではなかった。運動や栄養素による生理的刺激は、骨格筋の遺伝子構造へも影響し、それらの変化は将来まで残存する、または将来の遺伝子構造変化に影響を与えることを示すいくつかの事象を本研究にて立証した。これらの成果は、生活習慣によるエピジェネティクスが個体差発生の原因のひとつであることを当該学術領域および一般社会に発信する。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of our research was to identify the epigenetic differences in skeletal muscles which experienced different physiological history. We found that 1) Exercise training attenuated the response of skeletal muscle to disuse in association with altered histone distribution at specific loci. 2) High fat feeding in early life improved age-related glucose intolerance, that associated with lowered incorporation of histone variant H3.3 into the loci related to lipid metabolism in skeletal muscle. 3) Resistance training in human increased histone acetylation at the loci responded to exercise, might lead to maintaining active status for gene transcription.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 エピジェネティクス 個人差 個体差 運動 栄養 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動によるエネルギー消費の増加が、肥満や糖尿病などの予防・改善に有効であることは周知の事実である。しかしながら、同じ運動を行った場合でも、大きく改善する集団とあまり改善しない集団が存在することも事実である。このような個体差の背景には、それまでの運動歴や食習慣などの要因が、組織・細胞レベルにおいて影響していると考えられるものの、運動効果における個体差を説明できる理論は現在のところ解明されていない。遺伝要素も、当然、個体差を生む要因であるが、近年の双生児を使った研究結果からも後天的要因の重要性が示唆されている。

骨格筋は遅筋と速筋に大別され、それぞれ固有の性質を持つ。遅筋は高いエネルギー代謝能を保有し、全身代謝に強く影響する。速筋は大きな筋パワーを発揮できるため、スポーツパフォーマンスの向上に必須である。生涯の健康維持という観点からは、遅筋特性を維持・強化することが不可欠であると考えられている。慢性的な走運動や持続的な筋活動は、速筋においてミトコンドリアのエネルギー代謝を顕著に亢進することが知られている。しかし、筋線維タイプ(ミオシン重鎖発現)は運動により影響されず、速筋から遅筋への完全な移行が起こらないこともまた事実である。一方で、ラットを用いて尾部懸垂を行った場合、遅筋線維で構成されるヒラメ筋では筋線維タイプの顕著な速筋化が認められる。しかし、多くのヒラメ筋線維は遅筋特性のまま残存し、後肢懸垂による筋不活動の影響を回避していることもこれまでの研究で示されてきた。以上の事象から、骨格筋は「変わりにくい」機能を持っており、生後の発育期において骨格筋がどのような適応を起こしたかによって、その後の「変わりにくさ」に影響すると考えられる。

エピジェネティクスは、遺伝情報に依存しない遺伝子の転写制御機構であり、遺伝子を取り巻く環境(エピゲノム)が転写の強弱に影響する。我々はこれまでの研究において遅筋と速筋に起こるエピジェネティクスの違いを明らかにした。ヒストンアセチル化のような活性型のヒストン修飾は、速筋においては転写活性化されている遺伝子座で多く認められたが、遅筋では遺伝子の転写とヒストン修飾には関係が認められなかった。また、筋活動量が増加した際には、逆にヒストン修飾量が減少しながら遺伝子が転写されることも明らかにした。ヒストン修飾の集積を伴わない弱い転写活性が、上述のように遅筋特性の獲得・維持を困難にしていると考えられる。

以上のように、運動(筋活動)によって起こるエピジェネティクスは、一般的に認識されているものとは異なる。運動がもたらす生理刺激は、遺伝子転写制御機構そのものを変化させる可能性が高い。しかしながら、このようなエピゲノムの変化が「どこまで可塑的に起こり」、「どのように個体差発生に寄与するのか」は全く分かっていない。

### 2. 研究の目的

個体差が発生する機序として、「過去に受けた生理刺激」が「エピゲノム変化として蓄積」し、将来的な運動に対する応答性に影響しているという仮説を立てている。運動や運動不足による不活動、食事に含まれる栄養素は、生理刺激として骨格筋内の分子シグナルを動かすことで筋特性を変化させる。これらは一過性の反応であり、刺激がなくなると分子シグナルも定常状態に戻るのが通常の捉え方であるが、生理刺激はエピゲノムにも影響しており、強い刺激や繰り返しの刺激はエピゲノム変化を誘導すると考えている。つまり、異なる遍歴を持つ骨格筋は、異なるエピゲノム変化を起こしており、運動効果や刺激応答性に差が生じると考えられる。遍歴の違いが、将来の個体差を引き起こすメカニズムの一部であろうと考えている。これらの仮説を検証し、遍歴の異なる骨格筋では「どのようなエピジェネティクスの違いがあるのか」を明らかにすることを主たる目的として本研究を実施する。

### 3. 研究の方法

若齢期の運動習慣が将来の筋不活動に与える影響(2016年度~2017年度)

若齢雄ラット(4週齢)にトレッドミルを用いた8週間の走運動を行った。その後8週間通常飼育に戻し、さらに1週間の後肢懸垂を実施した。運動4週目と8週目および後肢懸垂の前後で後肢筋のサンプリングを行った。

損傷後に再生した筋線維の機能変化(2016年度~2019年度)

成熟ラットのヒラメ筋にカルジオトキシン注入による筋損傷を与え、8週間再生させた後、過負荷または筋不活動モデルを行った。過負荷モデルでは、協働筋(腓腹筋、足底筋)の腱を切除し、2週間飼育した。筋不活動モデルでは、1週間の後肢懸垂を行い後肢筋に廃用性筋萎縮を誘発した。

筋再生中におけるサテライト細胞過増殖による再生筋線維への影響を明らかにするため、p21阻害薬(UC2288)投与のより過増殖を誘導し再生した筋線維の特性を調べた。ドキシサイクリン投与により全身細胞でH2B-GFP融合タンパク質を発現誘導できるマウスに6週間ドキシサイクリン入りの飲料水を摂取させ、通常水に戻し1週間後にカルジオトキシンの前脛骨筋注による損傷誘導とUC2288またはDMSOを充填した浸透圧ポンプの腹腔内留置を行った。2週間後に前脛骨筋をサンプリングし、オールインワン蛍光顕微鏡システム(キーエンス)を用いて全筋横断面の解析を行った。

運動条件の違いによる骨格筋エピゲノム変化の相違 (2017 年度 ~ 2018 年度)

若齢雄ラット (4 週齢) を Sedentary (非運動群) Run-1、Run-2、Run-3 の 4 群に分け、Run-1 は 1 日 30 分のトレッドミル走 (1.5km/h) を週 4 日、8 週間行った。Run-2 は、1 日あたりの走行時間を半分にし、8 週間運動を実施した。Run-3 は、1 日あたりの走行時間を 2 倍にしたが、運動期間は 4 週間とした。12 週齢時に全群から足底筋をサンプリングした。

若齢期の高脂肪食摂取が加齢変化に及ぼす影響 (2017 年度 ~ 2019 年度)

若齢雄マウス (4 週齢) を高脂肪食摂取群とコントロール食摂取群に分け、高脂肪食摂取群には脂質由来のエネルギー量が約 60% の餌を与えた、2 ヶ月間高脂肪食摂取させた後、通常食に戻し、13 ヶ月齢までの期間ハングテストによる運動器機能評価と耐糖能テストによる代謝機能評価を実施した。高脂肪食摂取終了時点 (3 ヶ月齢) と 13 ヶ月齢で前脛骨筋のサンプリングを行った。

レジスタンストレーニングによるヒト骨格筋のエピゲノム変化 (2018 年度 ~ 2019 年度)

韓国体育大学 Kim Chang Keun 教授との共同研究により、既存のヒト骨格筋サンプルを入手し解析のみを本研究にて実施した。急性実験では、健康男性 9 名にレジスタンス運動を実施し、運動前と 3 時間後に大腿四頭筋生検をサンプリングした。慢性実験では、健康男性 21 名に 10 週間のレジスタンストレーニングを実施し、トレーニング前と最後の運動セッションから 3 日後に筋生検をサンプリングした。以上の筋サンプルは、Kim 教授グループが組織化学解析および生化学的解析を行った後の残サンプルを譲渡されたものであったため、各群のサンプルを 1 つにまとめて RNA シーケンシングおよびクロマチン免疫沈降法を用いたヒストン分布解析を行った。

#### 4. 研究成果

若齢期の運動習慣が将来の筋不活動に与える影響

運動歴のないラットでは後肢懸垂によって全ての後肢筋が萎縮したが、運動歴のあるラットではヒラメ筋以外の後肢筋 (足底筋、腓腹筋、前脛骨筋) は萎縮しなかった。足底筋から抽出した RNA を用いて RNA-seq 解析を行った結果、非運動群において後肢懸垂によって発現変動する遺伝子 (683 種) のうち 271 種が発現変化していないことが分かった。これらの遺伝子座では 8 週間の走運動によりヒストンアセチル化レベルが低下し、ヌクレオソーム形成の低下が認められた。8 週間の脱トレーニング後、ヌクレオソーム形成量は正常に戻ったが、ヒストンバリエント H3.3 の顕著な取り込みが見られた。後肢懸垂によって非運動群ではヌクレオソームの形成が促進したが、運動群において遺伝子発現が増加しなかった遺伝子群ではヌクレオソーム形成は促進しなかった。運動によって生じたヒストン分布変化が脱トレーニング後も残存し、不活動による転写活性化に対してヌクレオソーム形成応答を変化させたと示唆される。

損傷後に再生した筋線維の機能変化 (2016 年度 ~ 2019 年度)

成熟ラットを用いて、ヒラメ筋に筋損傷を誘発した後 8 週間再生を促し、協働筋腱切除による過負荷を与えた。正常筋では約 30% の筋線維肥大が起こったが、再生筋は肥大しなかった。筋タンパク質合成に重要な関与をすると考えられる *Igf1r* の遺伝子発現も、同様の傾向を示した。*Igf1r* の遺伝子座では転写開始点付近においてアセチル化ヒストンの分布が認められたが、再生筋では顕著に低下していた。筋再生中のエピゲノム変化が *Igf1r* 遺伝子が転写応答しなかった原因であると考えられる。また、再生筋を不活動にした場合には、正常筋と同様の廃用性筋萎縮が誘発された。以上の結果から、損傷後に再生した筋線維は肥大機能が低下したことが明らかとなった。

以上のような再生筋線維の肥大機能不全の原因として、筋再生中におけるサテライト細胞の過増殖に着目して検討を行った。全筋横断面解析の結果、再生筋における筋線維サイズ分布には阻害薬投与の影響は見られなかった。サテライト細胞数にも阻害薬投与の影響はなかったが、1 本の筋線維に含まれる筋核数には阻害薬投与による増加傾向が認められた。筋核の GFP 発光強度は阻害薬投与により顕著に低下しており、p21 阻害によりサテライト細胞から派生した筋前駆細胞が通常より多くの分裂を経て再生筋線維が新生したことが明らかである。以上の結果から、再生筋線維における肥大機能低下はサテライト細胞の過増殖が原因でないことが示唆された。

運動条件の違いによる骨格筋エピゲノム変化の相違

足底筋のホモジネートを用いてクエン酸合成酵素活性を測定した結果、Run-1 と Run-2 では非運動群と同レベルだったが、Run-3 では増加する傾向が認められた。さらに先行研究においてターゲットとした遺伝子座におけるヒストン分布解析を行った結果、Run-1 においてアセチル化ヒストン分布は変わらなかったものの、Run-2 と Run-3 ではアセチル化ヒストン分布が有意に増加した。これらの遺伝子座へのヒストンバリエント H3.3 の取り込みは、Run-1 で有意に増加した。以上の結果から、運動によって誘発されるエピゲノム変化は、運動の量や期間によって異なることが明らかとなった。また、エピゲノム変化は 1 日あたりの運動量と関係しており、代謝変化によってもさらにヒストン分布変化が生じると考えられる。

#### 若齢期の高脂肪食摂取が加齢変化に及ぼす影響

高脂肪食摂取により有意な体重増加が起こったが、通常食に戻して 2 ヶ月でコントロール群と同等のレベルまで低下した。ハングテストスコアは 8 ヶ月齢までの期間、高脂肪食摂取群で有意に低下した。コントロール群においても加齢によって徐々にハングテストスコアは低下し、9 ヶ月齢以降は両群に差は見られなかった。3 ヶ月齢時、高脂肪食摂取群では空腹時血糖の増加ならびにグルコース投与 120 分後の高血糖が誘発された。このような耐糖能低下は、通常食に戻して 1 ヶ月で改善された。9 ヶ月齢までの期間はグルコース投与 120 分後の血糖値に高脂肪食摂取の影響は見られなかった。しかし 10 ヶ月齢以降、コントロール群では 120 分後血糖値が増加したが、高脂肪食摂取群では正常のまま維持された。以上の結果から、高脂肪食摂取によって低下した運動器機能はその後長期間残存するものの加齢変化には影響しないが、加齢に伴う耐糖能低下は若齢期の高脂肪食摂取によって改善することが分かった。

前脛骨筋では高脂肪食摂取により PDK4、UCP3、ZMYND17 のような酸化系代謝に関わる因子の遺伝子発現の有意な増加が認められた。このような遺伝子の高発現は、高脂肪食摂取群において 13 ヶ月齢時まで残存した。これらの遺伝子座におけるヒストン分布を解析した結果、3 ヶ月齢時では RNA ポリメラーゼ II 動員と関係ある H3K27 アセチル化の有意な増加が認められた。13 ヶ月齢時においては、高脂肪食摂取群で加齢に伴うヒストンバリエーション H3.3 の取り込み増加が抑制されており、さらにアセチル化や H3K4me1 のような活性型ヒストン修飾がコントロール群に比べ増加していることが分かった。以上の結果から、高脂肪食摂取後の遺伝子転写活性維持にはヒストンバリエーション H3.3 の取り込みが関与している可能性が示唆された。

#### レジスタンストレーニングによるヒト骨格筋のエピゲノム変化

急性レジスタンス運動前後のサンプルを RNA シーケンシングした結果、運動により 153 種の遺伝子が発現増加応答を示すことが分かった。GO 解析により、これらの遺伝子が筋発達、ストレス応答、代謝、細胞死、転写因子に関連していることも明らかになった。さらにこれらの遺伝子は、慢性運動後に有意に発現増加していることも分かった。これらの遺伝子から 16 種を対象として選定し、クロマチン免疫沈降法によるヒストン分布解析を行った。その結果、急性運動に対しては総ヒストンおよびヒストンバリエーション H3.3 の分布量が有意に低下し、アセチル化ヒストン、H3K4me1、H3K27me3 は有意に増加した。慢性運動後においても、総ヒストン分布が有意に低下しており、アセチル化ヒストン分布は有意に増加した。以上の結果から、レジスタンス運動による転写活性化は遺伝子構造の緩和を促し、慢性的にも遺伝子転写されやすい状態に保たれることが示唆された。このような現象は、これまでの動物実験から得られた結果と共通しており、慢性運動によって遺伝子構造が緩和されることを強く裏付ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Masuzawa Ryo, Konno Ryotaro, Ohsawa Ikumi, Watanabe Atsuya, Kawano Fuminori	4. 巻 125
2. 論文標題 Muscle type-specific RNA polymerase II recruitment during PGC-1 gene transcription after acute exercise in adult rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00202.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohsawa Ikumi, Konno Ryotaro, Masuzawa Ryo, Kawano Fuminori	4. 巻 125
2. 論文標題 Amount of daily exercise is an essential stimulation to alter the epigenome of skeletal muscle in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00074.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Fuminori, Ono Yusuke, Fujita Ryo, Watanabe Atsuya, Masuzawa Ryo, Shibata Kazuhiro, Hasegawa Shunsuke, Nakata Ken, Nakai Naoya	4. 巻 312
2. 論文標題 Prenatal myonuclei play a crucial role in skeletal muscle hypertrophy in rodents	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C233 ~ C243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00151.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Keisuke, Ohsawa Ikumi, Masuzawa Ryo, Konno Ryotaro, Watanabe Atsuya, Kawano Fuminori	4. 巻 123
2. 論文標題 Running training experience attenuates disuse atrophy in fast-twitch skeletal muscles of rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 902 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00289.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lim Changhyun、Shimizu Junya、Kawano Fuminori、Kim Hyo Jeong、Kim Chang Keun	4. 巻 15
2. 論文標題 Adaptive responses of histone modifications to resistance exercise in human skeletal muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計13件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 河野史倫
2. 発表標題 運動が引き起こす骨格筋エピジェネティクスと適応限界の仕組み
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野史倫
2. 発表標題 抗重力筋活動による骨格筋の発育と筋特性獲得
3. 学会等名 第64回日本宇宙航空環境医学会大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 筋タイプ特有のエピゲノムと遺伝子転写応答
3. 学会等名 ConBio2017(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 Effects of long term running training on the responsiveness of genes to unloading in hindlimb muscles of rats
3. 学会等名 Cell Symposia: Exercise Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増澤 諒
2. 発表標題 Response of Pol II distribution to acute running in fast- and slow-twitch muscles of adult rats
3. 学会等名 Cell Symposia: Exercise Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 走運動歴を持つラットの後肢筋における廃用性萎縮応答の変化
3. 学会等名 第72回日本体力医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増澤 諒
2. 発表標題 PGC-1 遺伝子座における遅筋・速筋のエピゲノム相違と急性走運動に対する特異的転写制御
3. 学会等名 第72回日本体力医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大沢 育未
2. 発表標題 ラット足底筋のヒストン修飾を変化させる運動条件の検討
3. 学会等名 第72回日本体力医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 運動が引き起こすエピジェネティクスと骨格筋の適応性変化
3. 学会等名 第24回日本運動生理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 再生筋線維の肥大応答性を制御するエピジェネティック機構
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 純也
2. 発表標題 急性および慢性レジスタンス運動に対するヒト骨格筋のヒストン修飾変化
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 河野 史倫
2. 発表標題 筋再生中に起こるヒストン修飾変化と再生筋線維の肥大応答性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 純也
2. 発表標題 レジスタンス運動に対するヒト骨格筋の遺伝子発現およびヒストン修飾変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>スポーツ健康学科卒業生（現大学院生）の卒業論文が、アメリカの科学誌に掲載  <a href="https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2020/04/28952.php">https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2020/04/28952.php</a>          松本大学大学院修士・増澤諒さんの修士論文がアメリカ生理学会誌に採択  <a href="https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2018/08/22750.php">https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2018/08/22750.php</a>          スポーツ健康学科卒業生、大沢育未さん（現大学院生）の卒業論文がアメリカ生理学会誌に採択  <a href="https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2018/08/22722.php">https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2018/08/22722.php</a>          スポーツ健康学科卒業生、中村圭介さんの卒業研究がアメリカ生理学会誌に発表されました  <a href="https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2017/11/13752.php">https://www.matsumoto-u.ac.jp/news2017/11/13752.php</a>          本学大学院健康科学研究科の河野准教授と大学院生の論文が「American Journal of Physiology Cell Physiology」に掲載  <a href="https://www.matsumoto-u.ac.jp/news/2017/03/13706.php">https://www.matsumoto-u.ac.jp/news/2017/03/13706.php</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	二村 圭祐  (Nimura Keisuke)  (00462713)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小野 悠介  (Ono Yusuke)  (60601119)	熊本大学・発生医学研究所・准教授       (17401)	