

令和元年6月12日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09229

研究課題名(和文)サルコペニアの治療戦略開発にむけた新規筋衛星細胞発現遺伝子R3hdmlの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of R3h domain containing-like, a novel skeletal satellite-cell-expressed gene, for investigating new treatment strategy of sarcopenia

研究代表者

竹本 稔 (Takemoto, Minoru)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：60447307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、新規、骨格筋衛星細胞発現遺伝子R3h domain containing like (R3hdml)を同定し、機能解析を行った。その結果、R3hdmlノックアウトマウスでは筋分化マーカーや増殖マーカーの発現が低下するが、その原因としてR3hdmlはIGT-AKTシグナルやフォプロネクチンの発現調節を介して、筋衛星細胞の増殖に関与し、骨格筋の発達・再生に関わる可能性が示唆された。R3hdml研究は加齢性骨格筋減少(サルコペニア)などの筋関連疾患の新たな治療法につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎えている今、健康長寿を達成するためにもサルコペニアなどの骨格筋関連疾患のメカニズムの解明と治療法の確立は急務である。骨格筋は優れた再生能力をもち、障害を受けても速やかに機能を回復する。この再生には筋衛星細胞が重要な役割をはたしている。本研究はR3hdmlという新しい筋衛星細胞発現遺伝子を中心にした研究であり新しい切り口でサルコペニア発症機序の解明やさらには治療応用に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a novel skeletal satellite-cell-expressed gene, R3h domain containing-like (R3hdml). R3hdml protein was secreted from cultured myotubes into the conditioned media, suggesting that R3hdml a novel myokine. In R3hdml knock out (KO) mice, the body weight and skeletal muscle mass were lower than that in the wild type control mice. Expression levels of cell cycle-related markers within the skeletal muscle was decreased in R3hdml KO mice compared with control mice. Cardiotoxin (CTX) was injected into the skeletal muscle to induce skeletal muscle regeneration after injury; consequently, the expression of R3hdml increased during skeletal muscle regeneration. Recovery of hand grip strength after CTX injection was significantly impaired in the R3hdml KO mice and overexpression of R3hdml rescued this decreased hand grip strength. Our results indicate that R3hdml is important for skeletal muscle development as well as regeneration.

研究分野：老年医学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 筋衛星細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢化社会を迎えている。現代の高齢者医療の大きな課題は、高齢者が日常的に介護を必要とせず、自立した生活ができる生存期間、いわゆる**健康寿命を延伸**することである。加齢に伴い骨格筋が減少する現象は**サルコペニア**と称され、高齢者の身体活動能力を著しく低下させ、生活の質の低下や肥満、糖尿病の発症・進展にも深く関与する。加齢に伴い、骨格筋の量的な変化に加えて、質的な変化も生じ、この変化により代謝性疾患や骨格筋障害がさらに助長するといった**悪循環を生み、虚弱高齢者 (frailty)を増やし、健康寿命延伸の大きな障壁となっている**。このように、サルコペニアは克服すべき課題ではあるが、その発症機序の理解は不十分かつ介入方法も限られおり、この分野のブレークスルーは、今後も**高齢者数が増加の一途をたどる我が国おける緊急の課題**である。

骨格筋は優れた再生能力をもち、障害を受けても速やかに機能を回復する。この再生には**筋衛星細胞が重要な役割**をはたしている。筋衛星細胞は筋形質膜と基底膜の間に存在する未分化な細胞であり通常は休眠状態にあるが、障害後、活性化し増殖、分化し筋線維へと癒合する。**加齢に伴い筋衛星細胞の再生能力が低下することが報告されている** (Conboy IM et al. Science 2003)。

我々はこれまで腎系球体発現遺伝子の同定とその機能解析を行ってきた。この目的のため新しいマウス系球体採取方法を確立 (Takemoto M et al. Am J Pathol 2002) し、マウス系球体特異的 cDNA ライブラリーや系球体特異的 cDNA マイクロアレーを作成し、新たな系球体特異的遺伝子を同定しその機能解析を行ってきた (Takemoto M et al. EMBO J 2006)。この過程で系球体発現遺伝子の一つとして R3h domain containing like (R3hdml) 遺伝子を同定し、さらに **R3hdml が筋衛星細胞に発現することも見出した**。

2. 研究の目的

本研究は R3hdml の機能解析を通して筋再生メカニズムを明らかにすることであり、サルコペニアの新たな介入法の開発を最終目的とした基盤研究である。

3. 研究の方法

(1) 生理学的な条件下における R3hdml の発現、骨格筋の発達、機能の解析 -in vivo

野生型マウスより下肢骨格筋を生後 0 日、7 日、21 日毎に採取し、R3hdml 遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。骨格筋から筋衛星細胞を単離培養し、ex vivo で分化させ R3hdml の遺伝子レベル、タンパクレベルの発現を検討した。筋衛星細胞の細胞融解液ならびに培養上清中の R3hdml 蛋白の発現をウェスタンブロット法にて確認した。C2C12 細胞の分化過程における R3hdml タンパク発現と MyoD、Myogenin、Pax7 などの筋原性制御因子の発現を時間を追って観察した。R3hdml 遺伝子の 5' UTR をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、C2C12 細胞に遺伝子導入を行い、C2C12 細胞の分化にともなう転写活性を観察した。

(2) 筋障害・再生モデルにおける R3hdml の発現、骨格筋の発達、機能の解析 -in vivo

10mM の CTX (0.9% NaCl 溶液 100 μ l) を腓腹筋に注射を行い、経時的な組織学変化、R3hdml の遺伝子変化を検討した。

(3) R3hdml 欠損による筋衛星細胞に対する影響に関する解析 -in vitro

野生型ならびに R3hdml 欠損マウスから筋衛星細胞を単離し、筋衛星細胞の増殖に関与する細胞内シグナルである IGF-1-AKT シグナルや、筋衛星細胞のニッチ形成に必要なフィブロネクチン発現を観察した。

4 . 研究成果

R3hdm1 は骨格筋や筋衛生細胞の分化に伴って発現する

最初に骨格筋の発達に伴う R3hdm1 の発現様式を観察した。野生型マウスより下肢骨格筋を生後 0 日、7 日、21 日毎に採取し、R3hdm1 遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、R3hdm1 の発現は出生直後にピークがあり、以後漸次発現低下し、生後 21 日目には、ほぼ消失した。続いて、骨格筋から筋衛生細胞を単離培養し、ex vivo で分化させた所、R3hdm1 は分化に伴い遺伝子レベル、タンパクレベルで発現が増加した。この分化に伴う R3hdm1 の発現亢進はマウス筋芽細胞株である C2C12 細胞でも観察された。

R3hdm1 は筋衛生細胞から分泌される新しいマイオカインである

続いて、タンパクレベルでの解析を進めた。筋衛生細胞の細胞融解液ならびに培養上清中の R3hdm1 蛋白の発現をウェスタンブロット法にて確認した所、細胞融解液中には 28kDa の R3hdm1 タンパクが検出できた。一方、培養上清中では 21kDa と細胞内よりも小さな R3hdm1 が検出できた。そこで培養上清中のタンパクを質量解析にて調べた所、R3hdm1 はタンパク質 N 末端にある Furin 切断部位で切断され培養細胞液に検出されることが明らかとなった。このことより、R3hdm1 は筋衛生細胞から分泌される新しいマイオカインであることが示唆された。

R3hdm1 は MyoD によって発現制御を受ける

続いて C2C12 細胞の分化過程における R3hdm1 タンパク発現と MyoD、Myogenin、Pax7 などの筋原生制御因子の発現を時間を追って観察した所、R3hdm1 タンパク発現に先だって MyoD が発現していた。そこで、R3hdm1 のプロモーター領域と考えられる領域を in silico で解析した結果、MyoD 結合配列が数か所見出された。そこで、その部位を含む R3hdm1 遺伝子の 5' UTR をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、C2C12 細胞に遺伝子導入を行い、C2C12 細胞の分化にともなう転写活性を観察した所、分化に伴ってルシフェラーゼの発現増加が観察された。さらに MyoD を C2C12 細胞に強制発現させた細胞においても R3hdm1 遺伝子の転写活性は増加したことより、R3hdm1 遺伝子の発現制御には MyoD が関与することが示唆された。

R3hdm1 は筋管形成や骨格筋の分化に重要である

続いて、C2C12 細胞の R3hdm1 遺伝子を RNA 干渉法にてサイレンシングを行い、筋分化させた所、野生型の C2C12 細胞に比較して R3hdm1 遺伝子をサイレンシングさせた細胞では有意に筋管形成が抑制された。次に、R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスの子鼠の下肢骨格筋を調べた所、ノックアウトマウスでは野生型に比し、筋重量が有意に軽く、また光学顕微鏡下でも筋繊維が野生型に比し、細かった。さらに電子顕微鏡下で観察した所、筋サルコメア構造の配列がノックアウトマウスでは著しく乱れていた。

R3hdm1 ノックアウトマウスでは筋分化マーカーや増殖マーカーの発現が低下する

続いて、生後 0 日の R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスおよび野生型マウスから下肢骨格筋を採取し、遺伝子発現を RNA シークエンス法にて調べた。その結果、659 遺伝子セットに発現変化が見られ、特に細胞周期に関与する遺伝子の発現変化が観察された。そこで、real time PCR 法を用いて RNA シークエンス法で得られた結果を確認した結果、Mki67、E2f1、Ccnd1 (CyclinD1) といった細胞増殖に重要な遺伝子がそれぞれ 72.5%、34.6%、39.0%低下し、細胞増殖抑制的に働く p21 は有意に 124.0%増加していた。さらに MyoD、Myogenin といった筋分化マーカーも R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスで発現低下していた。

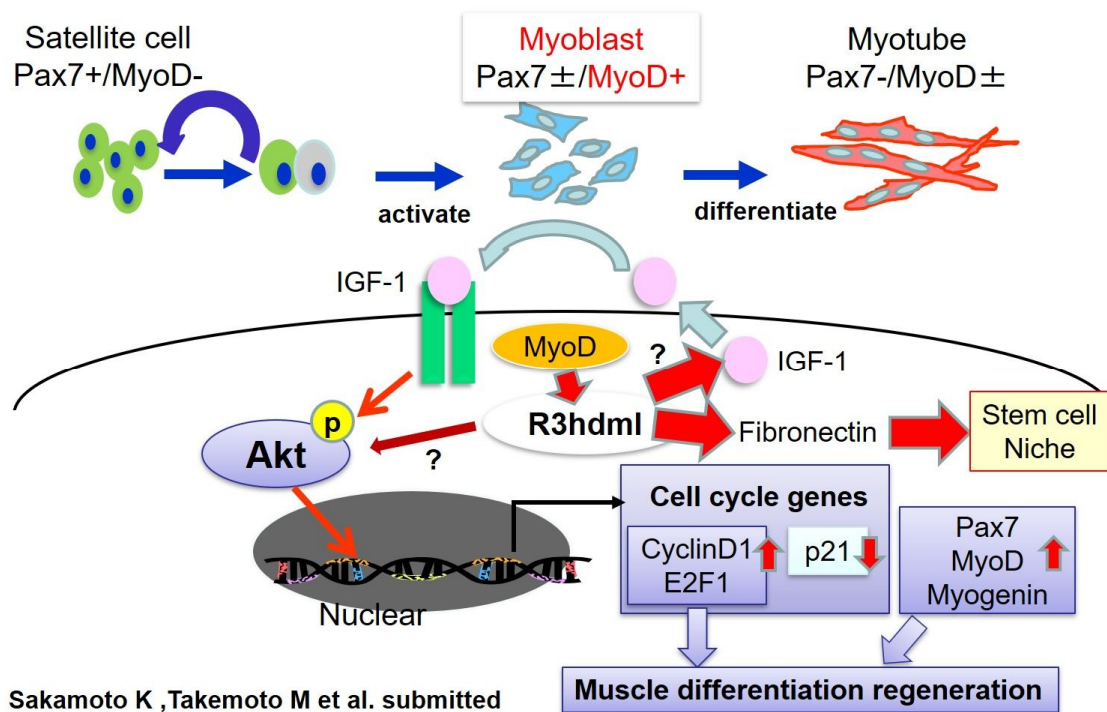
R3hdm1 は IGF-1-AKT シグナルや、フィブロネクチンの発現に関与する

続いて、筋衛星細胞の増殖に関与する細胞内シグナルである IGF-1-AKT シグナルや、筋衛星細胞のニッチ形成に必要なフィブロネクチン発現を観察した所、R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスでは野生型に比し、IGF-1 の発現や AKT のリン酸化が低下していた。さらにフィブロネクチンの発現も低下していた。C2C12 細胞を用いた実験では R3hdm1 遺伝子サイレンシングで IGF-1 やフィブロネクチンの発現が低下し、逆に R3hdm1 遺伝子の過剰発現で両遺伝子の発現が増加した。

R3hdm1 は骨格筋再生にも重要である

最後に R3hdm1 遺伝子と筋再生に関して検討を行った。10mM の CTX (0.9% NaCl 溶液 100 μ l) を腓腹筋に注射を行い、経時的な組織学変化、遺伝子変化を検討した所、R3hdm1 は骨格筋の障害後の再生過程で発現が増加すること、R3hdm1 KO マウスでは骨格筋の再生が遅延し、筋力も低下すること、R3hdm1 を腓腹筋局所に過剰発現することにより R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスの表現型がレスキューされること明らかにした。

以上の結果より、R3hdm1 は骨格筋の分化・再生に重要な筋衛星細胞から分泌される新たなマイオカインである可能性がある。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Ishibashi R, Takemoto M, Tsurutani Y, Kuroda M, Ogawa M, Wakabayashi H, Uesugi N, Nagata M, Imai N, Hattori A, Sakamoto K, Kitamoto T, Maezawa Y, Narita I, Hiroi S, Furuta A, Miida T, Yokote K. Immune-mediated acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: A case report and literature review. J Clin Lipidol. 査読有. 2018 Jul - Aug;12(4):888-897.e2

Shoji M, Takemoto M, Kobayashi K, Shoji T, Mori S, Sagara JI, Kurosawa H, Hirayama Y, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis. *Sci Rep*. 査読有. 2018 Jan 10;8(1):245.

Shoji M, Takemoto M, Kobayashi K, Shoji T, Mori S, Sagara J, Kurosawa H, Hirayama Y, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis *SciRep*. 査読有. 2018;8:245

Yamaga M, Takemoto M, Takada-Watanabe A, Koizumi N, Kitamoto T, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Recent Trends in WRN Gene Mutation Patterns in Individuals with Werner Syndrome. *J Am Geriatr Soc*. 査読有. 2017;65:1853-1856.

Yamaga M, Takemoto M, Shoji M, Sakamoto K, Yamamoto M, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Kobayashi K, Yokote K. Werner syndrome: a model for sarcopenia due to accelerated aging. *Aging (Albany NY)*. 査読有. 2017;9:1738-1744.

Shoji M, Kobayashi K, Takemoto M, Sato Y, Yokote K
Urinary podocalyxin levels were associated with urinary albumin levels among patients with diabetes ,Biomarkers. 査読有. 2016;21:164-7.

Zhang C, Dervoort DV, Shi H, Zhang R, Qing Y, Hiraoka S, Takemoto M, Yokote K, Moxon JV, Norman P, Rittie L, Kuivaniemi H, Atkins GB, Gerson SL, Shi GP, Golledge J, Dong N, Perbal B, Prosdocimo DA, Lin Z. Matricellular Protein CCN3 Mitigates Abdominal Aortic Aneurysm *J Clin Invest* . 査読有. 2016 ;126:2012.

Ishibashi R, Takemoto M, Akimoto Y, Ishikawa T, He P, Maezawa Y, Sakamoto K, Tsurutani Y, Ide S, Ide K, Kawamura H, Kobayashi K, Tokuyama H, Tryggvason K, Betsholtz C, Yokote K. A novel podocyte gene, semaphorin 3G, protects glomerular podocyte from lipopolysaccharide-induced inflammation. *Sci Rep*. 査読有. 2016;6:25955.

〔学会発表〕(計6件)

Yamamoto, M. Takemoto, A. Matsuzaki, H. Masuyama, M. Koshizaka, Y. Maezawa, K. Yokote:Diabetes can accelerate sarcopenia in the diaphragm
54th EASD, 2018年10月1-5日

山本雅、竹本稔、越坂理也、前澤善朗、横手幸太郎:横隔膜厚は肺炎患者の新たな予後予測になりうる-CT画像を用いた新たな横隔膜測定法を用いた解析から 第60回 日本老年医学学術集会、2018年6月15日

坂本憲一、竹本稔、古市泰郎、高橋恵、秋元義弘、山本雅、石川崇広、前澤善朗、清水孝彦、眞鍋康子、藤井宣晴、横手幸太郎 新規筋衛星細胞発現遺伝子 R3hdm1 は筋衛星細胞の増殖能を制御し、骨格筋の分化再生を促進する
第61回 日本糖尿病学会年次学術集会、2018年5月24日 26日

山本雅、竹本稔、松崎敦、増山英則、越坂理也、前澤善朗、横手幸太郎:
CT画像を用いた新たな横隔膜測定法の開発および同手法を用いた年齢や糖尿病と横隔膜肥厚の関連に関する検討、第61回 日本糖尿病学会年次学術集会、2018年5月24日 26日

Sakamoto K, Takemoto M et al. R3h domain containing-like has pivotal roles in skeletal muscle development and regeneration. 第 77 回 アメリカ糖尿病学会 2017 年 6 月 8 日-13 日

坂本憲一、竹本稔、古市泰郎、高橋恵、秋元義弘、山本雅、石川崇広、前澤善朗、清水孝彦、眞鍋康子、藤井宣晴、横手幸太郎 新規筋衛星細胞発現遺伝子 R3hdml は衛星細胞の増殖能を制御し骨格筋の分化再生に関わる 2017 年 4 月 17 日 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石川 崇広

ローマ字氏名：Ishikawa Takahiro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁): 00749426

研究分担者氏名：横手 幸太郎

ローマ字氏名：Yokote Koutaro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 20312944

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。