

令和元年6月25日現在

機関番号：33930

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16450

研究課題名(和文)加齢筋の廃用性病変形成におけるMBNL1の役割解明とフレイル対策の開発

研究課題名(英文) A physiological role of MBNL1 in aging-associated decrease in mass and function of skeletal muscle

研究代表者

横山 真吾 (YOKOYAMA, Shingo)

豊橋創造大学・保健医療学部・助教

研究者番号：30706859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は選択的スプライシング因子MBNL1に着目し、ミトコンドリア機能不全、アポトーシスの増加といった骨格筋の加齢性変化のメカニズムを明らかにすることである。C2C12筋管細胞においてMBNL1をノックダウンするとPGC-1 発現量低下、ミトコンドリア膜の脱分極、Bcl-2に対するBax発現量およびapoptotic indexの増加が認められた。また、マウス加齢筋ではMBNL1およびPGC-1 発現量低下とBcl-2に対するBax発現量増加が認められた。以上より、MBNL1はミトコンドリア機能不全やアポトーシスの増加の抑制を介して、加齢性の骨格筋萎縮を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会にある我が国においてフレイル対策は国家的課題であるが、その病変の多様性から未だ有効策は確立されていない。ミトコンドリア機能不全やアポトーシスの増加といった骨格筋の加齢性変化がスプライシング因子によって制御されている可能性を示した本研究の成果はフレイル対策策定のための重要な基礎資料になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate a physiological role of muscleblind-like 1 (MBNL1) in aging-associated changes in mass and function of skeletal muscle. Expression level of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1) and mitochondrial membrane potential evaluated by the fluorescence ratio of JC-1 aggregate to monomer in C2C12 myotubes were suppressed by knockdown of MBNL1. On the other hand, MBNL1 knockdown-associated increase in the ratio of Bax to Bcl-2 as well as the apoptotic index in C2C12 myotubes was observed. In plantaris muscle, the expression level of MBNL1 and PGC-1 in old mice was significantly lower than that in young mice. Furthermore, the ratio of Bax to Bcl-2 in mouse plantaris muscle was increased by aging. These observations suggest that MBNL1 may be a key player of aging-associated muscle atrophy accompanied with mitochondrial dysfunction and apoptosis via mediating PGC-1 expression.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：MBNL1 PGC-1 apoptosis Bax

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 超高齢社会にある我が国において虚弱高齢者(フレイル)対策は国家的課題であるが、その病変の多様性から未だ有効策は確立されていない。
- (2) 骨格筋の萎縮や筋線維タイプ移行、ミトコンドリア機能不全といった病態を呈する筋強直性ジストロフィー1型(DM1)には、選択的スプライシング因子である muscleblind-like 1(MBNL1)の機能不全が関与していることが報告されている。
- (3) DM1の筋病変は骨格筋の加齢性変化と類似する点が多いため、骨格筋の加齢性変化にも MBNL1の機能不全が関与している可能性が示唆されるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は選択的スプライシング因子 MBNL1に着目し、骨格筋におけるミオシン重鎖(MyHC)のタイプ別変化、ミトコンドリア機能不全、アポトーシスの増加といった加齢性変化のメカニズムを明らかにすることでフレイル対抗策策定のための基礎資料を得ることである。

3. 研究の方法

本研究は培養細胞実験ならびに動物実験の2つの実験系により構成された。本研究における動物実験は、所属機関における動物実験に関する規定に従い、所属機関の動物実験委員会による審査・承認を得て実施された。

- (1) 培養細胞実験では、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いた。タイプ コラーゲンがコーティングされた培養プレートを用い、C2C12 を増殖培地にてサブコンフルエント状態にまで増殖させた。その後、分化培地に交換して培養することで筋管細胞に分化させた。

MBNL1 ノックダウン

分化誘導3日後の筋管細胞に対して MBNL1 に対する siRNA 干渉法を用いて導入し、MBNL1 遺伝子をノックダウンした。トランスフェクションから2日後の細胞を対象として各解析を実施した。

細胞含有タンパク量ならびに分化

筋管細胞を回収し、タンパク質抽出液を用いてホモジネートした後 Bradford 法により細胞含有タンパク量を評価した。また、筋管細胞の分化の評価として myogenin mRNA 発現量と creatine kinase (CK) タンパク発現量をそれぞれ real time RT-PCR 法と Western blot 法を用いて評価した。

MyHC mRNA 発現量

筋管細胞を回収し、RNA 抽出後 cDNA を合成し胎児型(myh3)、新生児型(myh8)、遅筋型(myh7、myh7b)、速筋型(myh4)ならびに中間筋型(myh2)の MyHC mRNA 発現量を real time RT-PCR 法を用いて評価した。

遺伝子発現の網羅的解析ならびに peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1) 発現量

MBNL1 siRNA ならびにそのコントロールとして scrambled siRNA をトランスフェクションした筋管細胞から mRNA を抽出し、MBNL1 ノックダウンにより発現量が変化する遺伝子の網羅的解析を RNA-seq を用いて実施した。発現量が2倍以上あるいは1/2以下に変化した遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。また、発現変動遺伝子として抽出された Ppargc1a ならびにそれにコードされるタンパク質である PGC-1 発現量をそれぞれ real time RT-PCR 法と Western blot 法を用いて評価した。

ミトコンドリア膜電位

筋管細胞に対し JC-1 色素を用いた染色を施し、画像解析にて JC-1 monomer で染色された細胞の輝度を計測することでミトコンドリア膜電位を評価した。

アポトーシスならびにアポトーシス関連タンパク発現量

筋管細胞に対し Hoechst 33342 を用いた核染色を施し、画像解析にて全核数に対する凝縮濃縮核数(apoptotic index)を評価した。また、アポトーシス促進タンパク質である Bax ならびに抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 発現量を Western blot 法を用いて評価した。

- (2) 動物実験では C57BL/6J 雄性マウスを用いた。マウスを10週齢の若齢群と100週齢の加

年齢群に振り分け、加齢の影響を受けやすいとされる足底筋を対象筋とした。全てのマウスは気温約 23℃、明暗サイクル 12 時間の環境下で飼育された。なお、実験期間中マウスは自由に餌および水を摂取できるようにした。

サンプリングならびに骨格筋量

各群のマウスの体重を測定した後、後肢より足底筋を摘出した。筋周囲の結合組織を除去した後、筋重量を測定し、液体窒素およびイソペンタンを用いて急速凍結して保存した。体重あたりの筋重量を算出し、骨格筋量として評価した。

MBNL1、PGC-1 ならびにアポトーシス関連タンパク発現量

摘出した足底筋を、タンパク抽出液を用いてホモジネートし、MBNL1、PGC-1、Bax ならびに Bcl-2 発現量を Western blot 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) MBNL1 ノックダウンが筋管細胞に及ぼす影響

MBNL1 ノックダウン効率の評価

今回用いた干渉法による MBNL1 ノックダウンにより、MBNL1 発現量は mRNA レベルで約 70%、タンパクレベルで約 76%低下した。

細胞含有タンパク量ならびに分化

MBNL1 ノックダウンにより、myogenin mRNA 発現量ならびに CK タンパク発現量に変化は認められなかったが、細胞含有タンパク量は有意に低下した。このことから MBNL1 は骨格筋細胞の分化に直接的な影響は及ぼさないものの何らかのタンパク質の発現や修飾に関与することが示唆された。

MyHC mRNA 発現量

MBNL1 ノックダウンにより、遅筋型 (myh7b)、速筋型 (myh4)、中間筋型 (myh2)、胎児型 (myh3) および新生児型 (myh8) mRNA 発現量は有意に高値を示した。分化が進み中間筋型や速筋型の mRNA 発現量が増加するのに伴い胎児型や新生児型の mRNA 発現量は低下することが報告されていることから、MBNL1 は MyHC mRNA 発現を変調させる可能性が示唆された。

発現変動遺伝子ならびに PGC-1 発現量

MBNL1 ノックダウンにより、発現が増加した遺伝子は 54 種、逆に発現が低下した遺伝子は 27 種抽出された。発現が低下した遺伝子の中にはミトコンドリアの生合成や機能に関わるとされる PPARGC1A が含まれていた。PPARGC1A ならびにそれにコードされるタンパク質である PGC-1 発現量を改めて評価したところ、MBNL1 ノックダウンにより mRNA レベル、タンパクレベルともに有意に低値を示した。

ミトコンドリア膜電位

MBNL1 ノックダウンにより、ミトコンドリア膜の脱分極を示す JC-1 monomer で染色された細胞像の輝度は有意に高値を示した。ミトコンドリア膜の脱分極はアポトーシスを誘導することが報告されていることから、MBNL1 はアポトーシスに関与している可能性が考えられた。

アポトーシスならびにアポトーシス関連タンパク発現量

MBNL1 ノックダウンにより、apoptotic index は有意に高値を示した。また、Bax 発現量および Bcl-2 に対する Bax 発現量は MBNL1 ノックダウンにより有意に高値を示した。以上より、骨格筋細胞において MBNL1 発現低下は PGC-1 発現低下を惹起し、ミトコンドリア機能低下を介しアポトーシスを誘導することが示唆された。

(2) MBNL1 が骨格筋の加齢性変化に及ぼす影響

骨格筋量

足底筋重量は加齢群で低下する傾向がみられ、体重あたりの筋重量は加齢群で有意に低値を示した。以上より、本実験で解析に用いた筋は加齢による影響を受けていることが確認された。

MBNL1、PGC-1 ならびにアポトーシス関連タンパク発現量

MBNL1 発現量ならびに PGC-1 発現量は加齢群で有意に低値を示した。また、Bax 発現量および Bcl-2 に対する Bax 発現量は加齢群で有意に高値を示した。この結果は培養細胞実験の結果を支持するものであった。

培養細胞実験と動物実験の結果から、MBNL1 発現低下はミトコンドリア機能不全やアポトーシス増加を惹起し、骨格筋の加齢性変化に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Apostolopoulos A, Nakamura A, Yokoyama S, Aoshima M, Fujimoto R, Nakamura K, Ito R, Goto K, Nuclear accumulation of HSP70 in mouse skeletal muscles in response to heat stress, aging, and unloading with or without reloading, *Front Genet*, 査読有, 2018, 617

DOI : 10.3389/fgene.2018.00617.

Ito R, Higa M, Goto A, Aoshima M, Ikuta A, Ohashi K, Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Miyata H, Goto K, Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle, *PLOS ONE*, 査読有, 13 (10), 2018, e0205645

DOI : 10.1371/journal.pone.0205645.

Egawa T, Ohno Y, Goto A, Yokoyama S, Hayashi T, Goto K, AMPK mediates muscle mass change but not the transition of myosin heavy chain isoforms during unloading and reloading of skeletal muscles in mice, *Int J Mol Sci*, 査読有, 19 (10), 2018, 2954
DOI : 10.3390/ijms19102954.

Egawa T, Ohno Y, Yokoyama S, Goto A, Ito R, Hayashi T, Goto K, The effect of advanced glycation end products on cellular signaling molecules in skeletal muscle, *J Phys Fit Sports Med*, 査読有, 7 (4), 2018, 229-238

DOI : 10.7600/jpfsm.7.229

Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells, *Acta physiol*, 査読有, 223 (2), 2018, e13042

DOI : 10.1111/apha.13042.

Egawa T, Tsuda S, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Goto K, Hayashi T, Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice, *Br J Nutr*, 査読有, 117(1), 2017, 21-29
DOI : 10.1017/S0007114516004591.

Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, Goto K, Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading, *Acta Physiol*, 査読有, 217(4), 2016, 325-337

DOI : 10.1111/apha.12692.

[学会発表](計8件)

Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Nakamura A, Goto K, MBNL1-associated mitochondrial dysfunction and apoptosis in C2C12 myotubes and mouse skeletal muscle, *International Conference on Frailty & Sarcopenia Research*, 2019

横山真吾, 中村文音, 大野善隆, 後藤勝正, MBNL1 発現低下がマウス骨格筋細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響, 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018

横山真吾, 大野善隆, 江川達郎, 中村文音, 後藤勝正, マウス骨格筋における PGC-1 発現の加齢性低下と MBNL1 の関与, 第72回日本体力医学大会, 2018

横山真吾, 江川達郎, 大野善隆, 後藤勝正, カフェ酸およびクロロゲン酸が骨格筋細胞の分化に与える影響, 第71回栄養・食糧学会大会, 2017

横山真吾, 大野善隆, 池谷直美, 中村文音, 比嘉正輝, 青島恵, 後藤勝正, 加齢による骨格筋組織内蓄積脂肪の増加 - マウスヒラメ筋を用いた検討 -, 第52回日本理学療法学会学術大会, 2017

Yokoyama S, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses unloading-associated slow-fast transition of myosin heavy chain isoforms in mouse soleus muscle, 第94回日本生理学会大会, 2017

横山真吾, 大野善隆, 江川達郎, 中村文音, 後藤勝正, MBNL1 発現低下がマウス骨格筋細胞のミオシン重鎖 mRNA 発現に及ぼす影響, 第71回日本体力医学大会, 2016

横山真吾, 大野善隆, 後藤勝正, 荷重除去とその後の再荷重によるマウスヒラメ筋の筋線維タイプ移行と NFAT ファミリーの発現, 第51回日本理学療法学会学術大会, 2016

6. 研究組織

※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。