

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09817

研究課題名(和文)新規マイオカイン R3hdmlによる骨格筋糖代謝、多臓器連関に関する検討

研究課題名(英文) Investigation of a novel myokine, R3hdml, on skeletal and bone metabolism and multiorgan association

研究代表者

小林 一貴 (Kobayashi, Kazuki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：30400998

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)：本研究は筋芽細胞分泌タンパクR3hdmlの骨格筋や肝臓における役割を明らかにすることと目的とした。結果、R3hdmlは一部IGF-1シグナルの増強と筋衛星細胞のニッチ構成成分であるフィブロネクチンの発現調節差作用を介して筋衛星細胞の増殖や分化を促し、骨格筋の発達や再生に重要な役割を果たすことをin vivo、in vitroで証明した。さらにR3hdmlの欠損は脂肪肝を増強し、逆に肝臓におけるR3hdmlの過剰発現は肝臓における脂肪合成が抑制された。筋衛星細胞から分泌される新しい因子R3hdmlは骨格筋の分化・再生に役割を果たし、肝脂質代謝にも関与する新たな代謝関連因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は骨格筋構成細胞の一つである筋芽細胞から分泌される新たなタンパクとしてR3hdmlを同定した。本研究によりR3hdmlは骨格筋の分化・再生のみならず全身の糖脂質代謝にも役割を果たすことを明らかにした。超高齢社会の我が国では今後、サルコペニア肥満が増加することが予想される。今後も研究を継続してR3hdmlを介したサルコペニアや肥満関連代謝疾患への新たな治療法を確立したい。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to investigate the roles of a myoblast-secreted novel protein, R3hdml, in the skeletal muscles and liver. We found that R3hdml accelerates the proliferation and differentiation of muscle satellite cells through the enhancement of IGF-1 signaling and increased production of fibronectin, which is important in the development of the satellite-cell niche. These results were confirmed both in vivo and in vitro. Furthermore, we found that R3hdml knockdown in mice worsens hepatosteatosis, whereas R3hdml overexpression in the liver suppresses lipid synthesis in the liver. In conclusion, our results surmise that the novel protein, R3hdml, which is secreted by activated myoblasts, is an important metabolic factor for not only skeletal muscle differentiation/regeneration but also hepatic lipid metabolism.

研究分野：糖尿病

キーワード：骨格筋 マイオカイン 脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

【骨格筋は運動器として働く以外にも全身の代謝調整に重要な体内最大器官である。】

骨格筋は骨と骨との間をつなぎ生物の動きを司る重要な臓器であり、その機能異常は時に致命的となる。代表的な遺伝性疾患として、筋ジストロフィーがあり、進行性の骨格筋の炎症・壊死により骨格筋に退行性変化をもたらし、多くの症例が30歳代で死亡する。また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、生活の質の下や肥満、糖尿病の発症・進展にも深く関与することが報告されているが、そのメカニズムは不明であり、治療法も確立されていない。このように、骨格筋は運動器としての役割に加えて、インスリン感受性臓器として糖代謝とも深く関わり、インスリン感受性の低下(インスリン抵抗性)は糖尿病の発症に関与する。さらに近年、骨格筋から種々の生理活性物質が分泌されることが報告されており、総称して「マイオカイン」と呼ばれる。マイオカインの一つとして最初に報告された物質は Interleukin-6 (IL-6)であり、運動に伴い骨格筋で一過性に分泌され、骨格筋の糖取り込みや筋グリコーゲン蓄積を促進し、小腸上皮からのインクレチンホルモン分泌を促し糖代謝に関与することが報告されている。このようにマイオカインの全身代謝調整機構が着目されている。

【新しい筋芽細胞分泌タンパク R3h domain containing-like (R3hdml)の発見】

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 (Am J Pathol 2002、EMBO J 2006、Nephron Exp Nephrol 2007)。この過程で系球体発現遺伝子の一つとして R3hdml 遺伝子を同定した。これまで R3hdml の機能解析を行い、transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )の細胞内シグナルのうち p38MAPK を阻害し、系球体ポドサイトのアポトーシスや細胞老化の抑制に関与していることを明らかにした(論文投稿中)。さらに近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS)にて R3hdml 遺伝子がアジア人や日本人の2型糖尿病の発症に関連する候補遺伝子の一つである可能性が報告された (Nat Genet 2011、PLoS One 2013)。そこで R3hdml 遺伝子の腎外組織における R3hdml の発現様式を検討した所、骨格筋の発達時や障害後再生時期に、骨格筋線維の由来となる筋芽細胞に発現することを発見した。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おり、R3hdml はその分化過程に伴い発現が増加する。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。この骨格筋の再生能力は加齢により低下することが報告されている (Conboy IM et al. Science 2003)。この加齢に伴う衛星細胞再生能力低下には Notch- $\delta$  シグナルの低下や、WNT シグナル増強に伴う筋衛星細胞の筋芽細胞への形質転換が関与する可能性が報告されている (Brack AS et al. Science 2007)。また筋衛星細胞は活性化、増殖分裂する際に、分化した細胞と未分化な細胞といった異なる細胞に分裂する(不等細胞分裂)ことが知られており、この過程を通じて筋衛星細胞数を維持しているが加齢状態では p38MAPK の活性化に伴い、骨格筋の自己複製能力が減弱する可能性が近年報告された (Berner JD et al. Nat Med 2014)。このように、Notch- $\delta$  シグナル、WNT シグナル、p38MAPK シグナルが加齢に伴う骨格筋の再生力低下や、ひいてはサルコペニアの発症・進展にも関与する可能性がある。我々の系球体構成細胞を用いた研究では R3hdml は p38MAPK の機能を抑制することを明らかにしており、p38MAPK 抑制作用を介して、骨格筋の分化・再生を促す可能性がある。さらに、糖尿病

は加齢に伴うサルコペニアを促進し、サルコペニアは糖取り込みを抑制して血糖管理を悪化させるという悪循環を生じることが知られているが、サルコペニアに伴う糖取り込み低下機序は十分に明らかとなっていない。

また近年、骨格筋からはマイオカインと称される、生理活性物質が分泌されることが報告されている。IL-6, iristin, b-aminoisobutyric acid (BAIBA), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) 等が代表的なマイオカインであるが、運動時に発現が増加し、糖代謝改善効果や白色脂肪細胞の褐色化、さらには大腸がんの抑制作用など多彩な生理作用を有する。R3hdmI タンパクもアミノ酸 N 末端にシグナル配列を有し、筋芽細胞から分泌されることを我々は明らかにしている。このことは、R3hdmI が骨格筋局所で働くことに加え、全身の代謝にも影響を及ぼすことが示唆される。この仮説を支持する所見として、先に述べたように、R3hdmI 遺伝子がアジア人や日本人の 2 型糖尿病の発症に関連する候補遺伝子の一つである可能性が報告されている (Nat Genet 2011, PLoS One 2013)。さらに GWAS により R3hdmI はうつ病など精神疾患との関連も示唆されている (PLoS One. 2011)。運動療法が代謝性疾患はもとよりうつ病など精神疾患に対して有効なことが報告されており、マイオカインと精神疾患との関連の機序の一端が R3hdmI の機能解析を通じて明らかになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は我々が同定した、筋芽細胞分泌たんぱく R3hdmI の機能解析を通して、骨格筋における糖取り込み機構や、マイオカインとしての R3hdmI の機能を明らかにすることである。

計画している具体的な研究項目は以下の事項である。

R3hdmI の骨格筋における糖取り込み機構における役割を明らかにする。 R3hdmI のマイオカインとしての役割を明らかにする。この目的で、R3hdmI ノックアウト (KO) マウスに加齢、筋障害、肥満を惹起した際の表現型を野生型と比較する。 R3hdmI を骨格筋において過剰発現したさいに糖代謝、脂肪肝ならびに情動性をはじめとした全身への影響を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) R3hdmI KO 骨格筋の機能、形態に関する検討-in vivo-

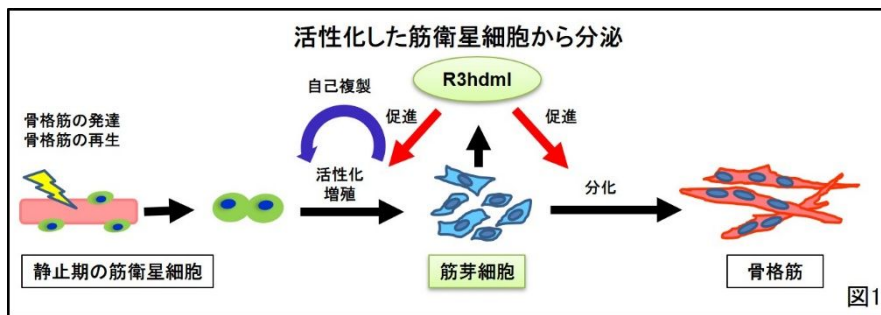
(2) R3hdmI 欠損もしくは過剰発現に伴う脂肪肝における役割に関する検討-マイオカインとしての役割に関する検討-

## 4. 研究成果

(1) R3hdmI KO 骨格筋の機能、形態に関する検討-in vivo-

R3hdmI 遺伝子と糖尿病との関連を検討する目的で、糖尿病を含む病的な条件における腎外組織での R3hdmI の発現様式を検討した所、肥満 2 型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の骨格筋で発現が増加し、さらに骨格筋にコブラ毒であるカルジオトキシン (CTX: Cobra cardiotoxin) やグリセロールを注入し骨格筋を傷害すると障害前には R3hdmI は殆ど検出されないが、筋細胞の再生時期に一致して遺伝子レベル、タンパクレベルでの発現増加が観察された。さらに R3hdmI 発現細胞の同定を目的にマウス筋衛星細胞を単離し、R3hdmI を観察した所、単離衛星細胞で発現し、分化に伴ってその発現が増加することを明らかにした。さらに、R3hdmI は一部 IGF-1 シグナル増強と筋衛星細胞のニッシェ構成成分であるフィブロネクチンの発現調節作用を介して筋衛星細胞

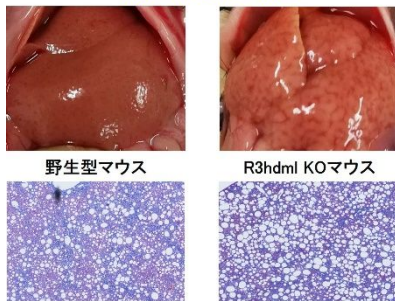
の増殖や分化を促し、骨格筋の発達や再生に重要な役割を果たすことを in vivo、in vitro で証明した。(図1、EMBO rep 2019)。



(2) R3hdm1 欠損もしくは過剰発現に伴う脂肪肝における役割に関する検討-マイオカインとしての役割に関する検討-

R3hdm1 ノックアウトマウス (KO) ならびに野生型マウスにコリン欠乏高脂肪食飼料 (CDAHFD) を負荷し脂肪肝形成における R3hdm1 の役割を検討した。その結果、R3hdm1 KO

コリン欠乏高脂肪食飼料(CDAHFD) マウスNASHモデル



Masson trichrome染色 図2

マウスでは野生型に比して有意に体重増加が観察され、脂肪肝の悪化が観察された(図2)。

逆に肝臓における R3hdm1 の過剰発現は肝臓における脂肪合成が抑制された。筋衛星細胞から分泌される新しい因子 R3hdm1 は骨格筋の分化・再生に役割を果たし、肝脂質代謝にも関与する新たな代謝関連因子であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 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	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18647-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Mayumi, Takemoto Minoru, Kobayashi Kazuki, Shoji Toshihiro, Mori Satoka, Sagara Jun-ichi, Kurosawa Hiroyuki, Hirayama Yoshiaki, Sakamoto Kenichi, Ishikawa Takahiro, Koshizaka Masaya, Maezawa Yoshiro, Yokote Koutaro	4. 巻 8
2. 論文標題 Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18647-6	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 Yamaga Masaya, Takemoto Minoru, Shoji Mayumi, Sakamoto Kenichi, Yamamoto Masashi, Ishikawa Takahiro, Koshizaka Masaya, Maezawa Yoshiro, Kobayashi Kazuki, Yokote Koutaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Werner syndrome: a model for sarcopenia due to accelerated aging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY)	6. 最初と最後の頁 1738-1744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.101265	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 Koshizaka Masaya, Ishikawa Ko, Ishikawa Takahiro, Kobayashi Kazuki, Takemoto Minoru, Horikoshi Takuro, Shimofusa Ryota, Takahashi Sho, Nagashima Kengo, Sato Yasunori, Tatsuno Ichiro, Terano Takashi, Hashimoto Naotake, Kuribayashi Nobuichi, Uchida Daigaku, Yokote Koutaro	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficacy and safety of ipragliflozin and metformin for visceral fat reduction in patients with type 2 diabetes receiving treatment with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in Japan: a study protocol for a prospective, multicentre, blinded-endpoint phase IV randomised controlled trial (PRIME-V study)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e015766 ~ e015766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2016-015766	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 Hayashi Aiko, Maeda Yukari, Takemoto Minoru, Tokuyama Hirotake, Koide Hisashi, Kitahara Aya, Hayashi Hideki, Kitamoto Takumi, Yamaga Masaya, Kobayashi Kazuki, Yokote Koutaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy in elderly obese Japanese patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 2068 ~ 2073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koshizaka M, Ishikawa K, Ishibashi R, Maezawa Y, Sakamoto K, Uchida D, Nakamura S, Yamaga M, Yokoh H, Kobayashi A, Onishi S, Kobayashi K, Ogino J, Hashimoto N, Tokuyama H, Shimada F, Ohara E, Ishikawa T, Shoji M, Ide S, Ide K, Baba Y, Hattori A, Kitamoto T, Takemoto M, Newby LK, Yokote K	4. 巻 21
2. 論文標題 Comparing the effects of ipragliflozin versus metformin on visceral fat reduction and metabolic dysfunction in Japanese patients with type 2 diabetes treated with sitagliptin: A prospective, multicentre, open-label, blinded-endpoint, randomized controlled study (PRIME-V study).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Obes Metab.	6. 最初と最後の頁 1990-1995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.13750.	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川耕、越坂理也、石橋亮一、前澤善朗、坂本憲一、内田大学、中村晋、山賀政弥、横尾英孝、大西俊一郎、小林一貴、荻野淳、橋本尚武、徳山宏丈、大原恵美、石川崇広、正司真弓、井出真太郎、井出佳奈、小林明菜、馬場雄介、高橋翔、長嶋健吾、佐藤康憲、竹本稔、横手幸太郎
2. 発表標題 メトホルミンを対照としてイブラグリフロジンによる内臓脂肪面積の変化を検討した多施設共同無作為化比較試験PRIMEVStudy
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越坂理也、石川耕、石橋亮一、前澤善朗、坂本憲一、内田大学、中村晋、山賀政弥、横尾英孝、大西俊一郎、小林一貴、荻野淳、橋本尚武、徳山宏丈、大原恵美、石川崇広、正司真弓、井出真太郎、井出佳奈、小林明菜、馬場雄介、高橋翔、長嶋健吾、佐藤康憲、竹本稔、横手幸太郎
2. 発表標題 高齢2型糖尿病患者の内臓脂肪に対するイブラグリフロジンの効果：メトホルミン対照 多施設共同無作為化比較試験PRIMEVサブ解析
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林一貴、佐久間幸枝、小林三枝子、堀江篤哉、鈴木義史、大西俊一郎
2. 発表標題 高齢者糖尿病の血糖管理における薬物療法の経年的変化：各種提言や専門性による影響の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大西俊一郎、下濱祥、佐久間幸枝、小林一貴
2. 発表標題 高度慢性高血糖症例の長期血糖コントロール経過と予後に関する検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 坂井厚夫、山本友香、大西俊一郎、石毛静馬、野村良亮、松本恵理奈、小林一貴
2. 発表標題 糖尿病啓発イベントにて血糖測定を行なった各集団ごとの特徴と食習慣の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山口裕二、小林一貴、大西俊一郎、菅谷誠
2. 発表標題 当院における糖尿病用薬の処方動向の変遷と血糖コントロールの変化
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林隆行、佐久間幸枝、横谷浩士、三浦秀之、大西俊一郎、小林一貴
2. 発表標題 耐糖能異常患者における外来リハビリテーション実施内容の違いが長期的な糖・脂質代謝、腎機能に与える効果の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林一貴、佐久間幸枝、小林三枝子、堀江篤哉、鈴木義史、大西俊一郎
2. 発表標題 当院高齢者糖尿病の薬物療法における専門性の影響やガイドライン発表等に伴う経年的変化の検討
3. 学会等名 第61回日本老年医学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林一貴、山口裕二、大西俊一郎、菅谷誠
2. 発表標題 千葉県東総地域中核病院における過去10年間の血糖降下薬処方状況と血糖コントロールの動向
3. 学会等名 第58回全国自治体病院学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 内村信一郎、疋田智之、崎山拓海、田中宏明、小林一貴
2. 発表標題 造血管腫瘍患者の入院治療期間におけるサルコペニア有病率の変化と関連因子の検討
3. 学会等名 第6回日本フレイル・サルコペニア学会
4. 発表年 2019年～2020年



1. 発表者名 小俣渡、中村聡子、浦崎知恵、船石裕樹、盛田紘有、小林一貴、小出尚史、松江弘之
2. 発表標題 二ボルマブ投与により続発性副腎皮質機能低下症を発症した踵悪性黒色腫の1例
3. 学会等名 第83回日本皮膚科学科東京・東部支部合同学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	竹本 稔  (Takemoto Minoru)  (60447307)	千葉大学・大学院医学研究院・特任教授    (12501)	