

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11116

研究課題名(和文)脳卒中発症ラット骨格筋由来の新規遺伝子群を標的とした病態改善への有効性の検討

研究課題名(英文)Studies on genes involved in skeletal muscle hypotrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

研究代表者

井上 敬夫 (Takao, INOUE)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00441006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧により脳卒中を発症するラット(脳卒中発症ラット)は、正常血圧ラットと比較して体重に差がみられる。骨格筋に関して詳細に検討したところ、遅筋主体の骨格筋において有意な減少がみられ、速筋有意な骨格筋においてはその差がみられなかった。遅筋主体のヒラメ筋に対して網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、遅筋においてタンパク質分解系に関与する一部のタンパク質の発現上昇が確認された。更に原因となる上流因子を探索した。その結果、通常、速筋特異的に発現がみられるタンパク質が遅筋において発現が増加傾向にあることがわかり、遅筋特異的な発育異常に関与してい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

高血圧症は、超高齢化社会において多くの割合を占める疾患であり、脳卒中を始めとする様々な疾患の原因となる。脳卒中の発症は、自身の力で生活することができる「健康寿命」を短くする。骨格筋は、運動機能の維持だけでなく、身体の恒常性の維持に重要であることが知られている。従って、本研究における脳卒中発症ラットにおける骨格筋の発育異常を改善できれば、高血圧症のみならず、脳卒中の病態改善に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) have lower weight than normotensive rats (WKY). The results obtained from investigating for skeletal muscle showed that slow muscle, but not fast muscle had specific lower weight in SHRSP. Comprehensive gene expression analysis for soleus, slow muscle, clarified protein involved in protein degradation highly expressed in slow muscle of SHRSP. Further analysis for upstream of the protein showed that the upstream protein which expresses mainly in fast muscle tended to highly express in slow muscle of SHRSP. This indicated that ectopic expression in slow muscle of the upstream protein might be involved in slow muscle specific hypotrophy in SHRSP.

研究分野：生活習慣病

キーワード：骨格筋 高血圧 脳卒中

1. 研究開始当初の背景

近年、骨格筋は姿勢維持や動作を生み出すといった運動器としての機能だけでなく、マイオカインとよばれる一群のタンパク質を分泌することによって全身の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。従って、老化や疾患に伴う骨格筋量の減少は運動機能の低下を引き起こすだけでなく、様々な疾患の発症や増悪へと結びつく可能性がある。高齢者の多くが罹患する高血圧症において高血圧関連因子が骨格筋の発育異常に関連しているとの報告もあることから、骨格筋機能と疾患の間には密接な関係があるものと考えられた。更に我々は、高血圧ラットにおいて病態依存的に身体の発育低下がみられることも確認している。このような背景から、1)疾患関連因子による骨格筋の発育低下、2)マイオカインの分泌異常、3)更なる疾患の増悪、4)疾患関連因子の増加、という悪循環を引き起こしているとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

高血圧により脳卒中を発症する脳卒中発症ラット(SHRSP)は、正常血圧ラットであるWKYより派生したラットであるが、血圧差のみならず、体重にも大きな差がみられる。骨格筋は、体重の約40%を占める最大の臓器であるため、この体重差は骨格筋の影響が現れているものと考えられた。背景に示したように、骨格筋の筋量低下は運動機能の低下のみならず、全身の恒常性の維持に対しても異常を引き起こす可能性がある。すなわち、高血圧関連疾患の増悪がSHRSPでは助長される可能性が考えられる。本研究では、SHRSPでみられる骨格筋の発育異常の原因を明らかにするとともに、治療標的として利用可能であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)脳卒中発症ラットにおける骨格筋の発育異常

12週齢雄性の正常血圧ラット(WKY)と脳卒中発症ラット(SHRSP)(n=6)の下腿筋(ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋、及び前脛骨筋)の脛骨長による補正重量の比較、ヒラメ筋を用いた組織学的解析(横断筋面積、Type染色)を行った。

(2)ヒラメ筋を用いたマイクロアレイ解析

(1)の実験より、ヒラメ筋において最も顕著な違いがみられたため、ヒラメ筋に焦点を置いたマイクロアレイ解析を行った。採取したヒラメ筋よりRNAを回収し、RNA6000 nano assay(Agilent)によりRIN値を測定し、マイクロアレイ解析を行える品質であることを確認した。その後、Affimetrix社のClariom S ratを用いて各群(n=3)の間で発現差(fold change ≥ 2.0 ≤ -2.0 , $p < 0.05$)がみられるものを骨格筋の発育異常と関連する遺伝子群の候補として選出した。更にこれらの遺伝子に対して遺伝子解析ソフトIngenuity Pathway Analysis(IPA)を用いて解析した。

(3) 骨格筋の分解系からの骨格筋発育異常へのアプローチ

両ラット間において発現差のみられる遺伝子が数多く存在したため、まず骨格筋におけるタンパク質分解系(ライソソーム系、プロテアソーム系)に焦点を当てた解析を行った。差のみられた系のタンパク質に対して IPA を用いた上流解析を行う事で新規の候補タンパク質を選出し、タンパク質発現解析及び免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)WKY と SHRSP の下肢骨格筋を採取し、重量を脛骨長で補正した値を比較したところ、ヒラメ筋と腓腹筋において有意な差がみられたが、足底筋と前脛骨筋では有意な差がみられなかった(表 1)。これは WKY と SHRSP 間で遅筋特異的な骨格筋量の減少が生じていることを示唆した。

表 1. 正常血圧ラット(WKY)と脳卒中発症ラット(SHRSP)の下肢骨格筋の重量比較

| | WKY (n=6) | SHRSP (n=6) | p value |
|--|---------------|---------------|----------|
| Blood pressure (mmHg) | 135.9 ± 5.2 | 240.6 ± 10.7 | 1.04E-09 |
| Body weight (g) | 355.3 ± 19.9 | 287.7 ± 18.1 | 1.07E-04 |
| Tibia length (cm) | 4.08 ± 0.06 | 3.79 ± 0.10 | 0.004 |
| Skeletal muscles/Tibia length (g · cm ⁻¹) | | | |
| Soleus | 0.029 ± 0.003 | 0.023 ± 0.002 | 8.80E-04 |
| Gastrocnemius | 0.403 ± 0.027 | 0.340 ± 0.016 | 0.008 |
| Plantaris | 0.064 ± 0.006 | 0.064 ± 0.006 | 0.893 |
| Tibialis anterior | 0.141 ± 0.008 | 0.134 ± 0.009 | 0.182 |

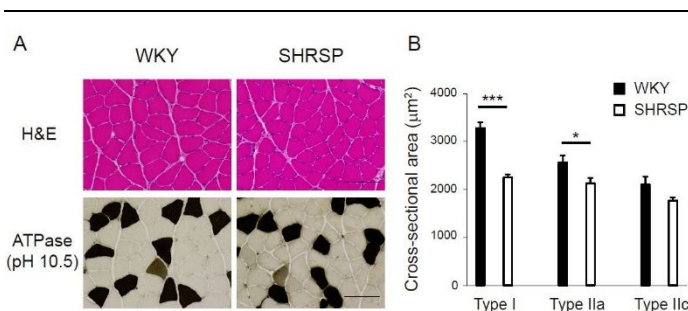


図1. ヒラメ筋の組織学的解析
(A) H&E(ヘマトキシリン・エオジン染色)、ATPase染色(pH10.5処理) Bar:50um、(B) 筋断面面積 (n=6)

詳細な検討を行うために、ヒラメ筋の組織学的解析を行った(図 1)。特に遅筋線維(Type I)における筋断面面積で両ラット間に大きな差がみられた。この結果は、筋の補正重量差が遅筋の比率が

比較的高い筋肉(ヒラメ筋、腓腹筋)において有意差がみられたことと一致した。

(2)WKY と SHRSP のヒラメ筋における Microarray 解析は、筋タンパク質分解系であるカ

ルパイン系、ライソソーム(カテプシン)系及びユビキチン-プロテアソーム系に焦点をおいた。カルパイン系では、遺伝子発現差がみられなかった。カテプシン系では、カテプシン H が WKY で有意に高値(fold change vs SHRSP; 2.08, $p=0.032$)を示した。これは、カルパイン系やカテプシン系が遅筋特異的の発育異常に関与していないことを示唆した。ユビキチン-プロテアソーム系においては、muscle-specific ubiquitin ligase(MuRF1)が SHRSP で有意に高値(fold change vs WKY; 4.49, $p=0.003$)を示したが、同じユビキチンリガーゼである atrogen-1(fold change vs WKY; 1.04, $p=0.830$)では差がみられなかった。更にこの遺伝子発現の結果を確かめるため、ウェスタンブロットを行ったところ、遺伝子発現と同様の結果が得られた(図 2)。しかしながら、速筋主体の足底筋では、発現差はみられなかった(図 2)。

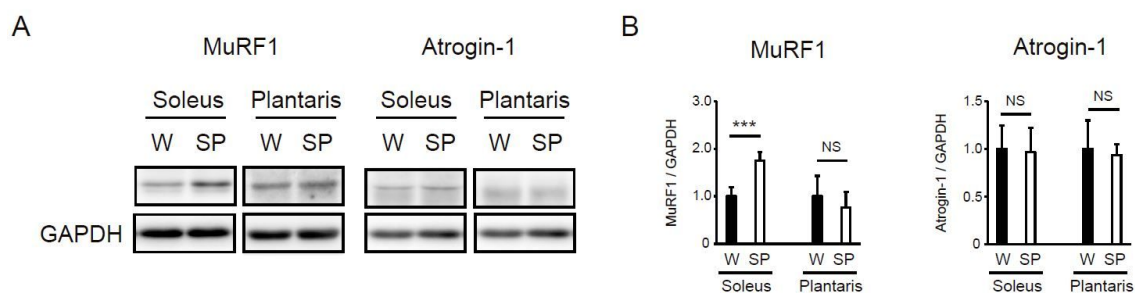


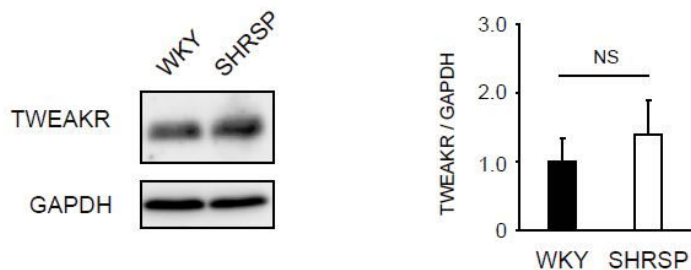
図2. ヒラメ筋、足底筋におけるユビキチンリガーゼ(MuRF1, atrogen-1)のタンパク質発現解析 (A)ウェスタンブロット (B)デンストメトリー解析(n=6)

MuRF1 の発現上昇によるユビキチン化の影響を調べるため、ウェスタンによる評価を行った。その結果、ヒラメ筋においては、トータルのユビキチン化に関して SHRSP では、増加傾向にあったが、有意差はなかった。しかしながら、100 k Da 付近のタンパク質に関しては有意な差がみられた(data not shown)。一方、足底筋に関しては、どちらに関しても有意差はなく、SHRSP において少し減少傾向にあった(data not shown)。遅筋特異的な MuRF1 の発現上昇が、部分的なユビキチン化への影響を及ぼしていると考えられる。

(3) MuRF1 の上流に位置し、治療標的となり得るタンパク質を見出すために、IPA を用いた MuRF1 の上流解析を行ったところ、Tumor necrosis factor(TNF)が見出されたため、TNF スーパーファミリー受容体に焦点をおいて発現量を比較した。その結果、TNF-like tweak inducer of apoptosis(TWEAK)をリガンドとする TWEAK receptor(TWEAKR)が候補として見出された。以前の研究において、TWEAKR が MuRF1 の発現を上昇させる一方、Atrogen-1 の発現には影響しないとの報告が成されていることから、TWEAKR 発現の上昇による MuRF1 の発現上昇が遅筋特異的な発育異常を引き起こしている可能性が示唆された。しかしながら、TWEAKR のヒラメ筋におけるタンパク質発現は SHRSP において増加傾向が見られたが、有意差はなかった(図 3A)。更に、ヒラメ筋において TWEAKR に

対する免疫染色を行ったところ、通常は速筋 (Type II) 線維に特異的発現がみられる TWEAKR が SHRSP において遅筋線維の中に異所性な発現がみられるものが確認された(図 3B)。WKY においては、TWEAKR 陽性の遅筋線維は確認されなかった。この結果は、SHRSP

A



B

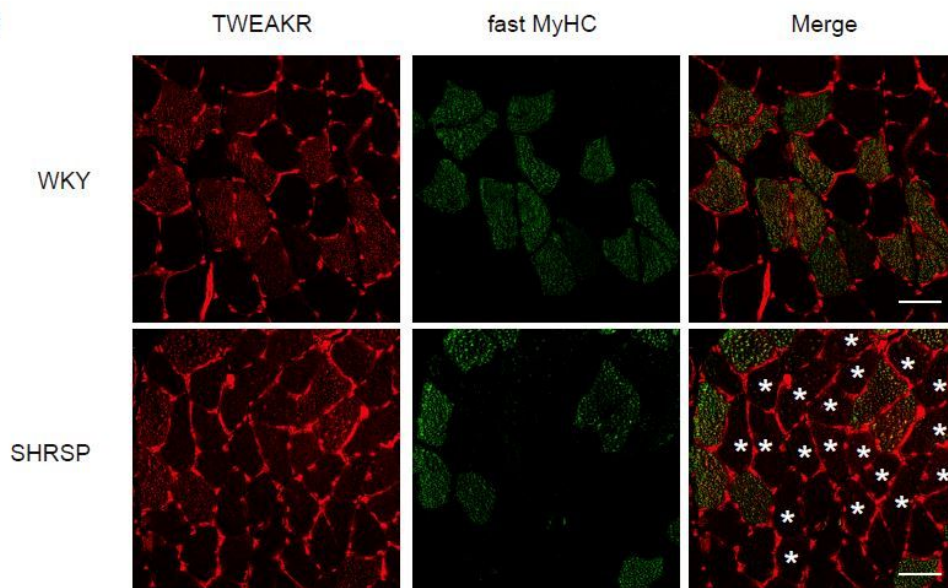


図3. ヒラメ筋におけるTWEAKRの発現

(A) ウェスタンブロット及びデンシトメトリー解析(n=6)

(B) 免疫染色 赤:TWEAKR、緑速筋特異的Myosin heavy chain, Bar :50um、*: 異所性発現TWEAKR

の遅筋線維における異所性な TWEAKR の発現が MuRF1 の発現を上昇させることによって遅筋特異的な発育異常をもたらしていると考えられた。

現在、更なる詳細なメカニズムの解明を行うとともに、TWEAKR 特異的阻害薬による発育異常の改善とそれに伴う高血圧症関連疾患への影響を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Inoue Takao, Hagiya Man, Maenishi Osamu, Kimura Masatomo, Mizuguchi Nobuyuki, Mine Yoshihiro, Kimura Ryuichiro, Chikugo Takaaki, Itoh Tatsuki, Satou Takao, Ito Akihiko | 4. 巻 237 |
| 2. 論文標題 Ectopic TWEAKR expression in type I fiber of stroke-prone spontaneously hypertensive rats is related to slow muscle-specific hypotrophy | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Life Sciences | 6. 最初と最後の頁 116919 ~ 116919 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.116919 | 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 Hagiya Man, Nakatani Yoshihisa, Takashima Yasutoshi, Kato Takashi, Inoue Takao, Kimura Ryuichiro, Otani Tomoyuki, Sato Yasufumi, Mori Hideo, Arima Shuji, Ito Akihiko | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Urinary Cell Adhesion Molecule 1 Is a Novel Biomarker That Links Tubulointerstitial Damage to Glomerular Filtration Rates in Chronic Kidney Disease | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 111 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2019.00111 | 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 Ri A, Hagiya M, Inoue T, Kimura R, Yoneshige, A., Murakami, Y., Ito A. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Progression of Pulmonary Emphysema and Continued Increase in Ectodomain Shedding of Cell Adhesion Molecule 1 After Cessation of Cigarette Smoke Exposure in Mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2018.00052. eCollection 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 Hagiya Man, Kimura Ryuichiro, Yoneshige Azusa, Inoue Takao, Otani Tomoyuki, Ito Akihiko | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Cell Adhesion Molecule 1 Contributes to Cell Survival in Crowded Epithelial Monolayers | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 4123 ~ 4123 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114123 | 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 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 1. 井上 敬夫、萩山 満、前西 修、木村 雅友、水口 信行、峯 嘉宏、筑後 孝章、伊藤 龍生、佐藤 隆夫、伊藤 彰彦 |
| 2. 発表標題 発育低下のみられる骨格筋におけるTNF関連受容体の発現異常 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 2. 井上敬夫、前西修、木村雅友、萩山満、水口信行、峯嘉宏、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 遅筋特異的発育異常におけるMuRF1の発現上昇と上流因子の解析 |
| 3. 学会等名 第5回 日本筋学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 3. 辻 ひかり、豊田 啓士、池上 侑希、蒲 尚子、松田 邦子、井上 敬夫、水口 信行、佐藤 隆夫、伊藤 龍生 |
| 2. 発表標題 自然な脱毛が見られるメスラットを用いた、女性型脱毛の組織学的検討について |
| 3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上敬夫、萩山満、木村竜一朗、水口信行、前西修、筑後孝章、木村雅友、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 病態依存的に発育低下のみられる脳卒中発症ラットSHRSPのヒラメ筋に対する組織学的解析及び遺伝子発現解析 |
| 3. 学会等名 日本筋学会 第4回学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上敬夫、萩山満、前西修、水口信行、木村雅友、木村竜一朗、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 低形成骨格筋に対する網羅的遺伝子発現解析に基づいたタンパク質分解系の解析 |
| 3. 学会等名 第54回 高血圧関連疾患モデル学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上敬夫、萩山満、前西修、水口信行、木村雅友、木村竜一朗、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 脳卒中発症ラットSHRSPの遅筋特異的発育低下におけるMuRF1の発現上昇 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井上敬夫 |
| 2. 発表標題 心筋・骨格筋の以上から探るSHRSPの病態改善への糸口 |
| 3. 学会等名 第56回高血圧関連疾患モデル学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上敬夫、萩山満、前西修、水口信行、木村雅友、木村竜一朗、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 低形成骨格筋に対する網羅的遺伝子発現解析に基づいたタンパク質分解系の解析 |
| 3. 学会等名 第54回 高血圧関連疾患モデル学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Inoue, T., Hagiwara, M., Maenishi, O., Kimura, M., Mizuguchi, N., Mine, Y., Kimura, R., Chikugo, T., Itoh, T., Satou, T., and Ito, A |
| 2. 発表標題 Ectopic TWEAKR expression in type I fiber of stroke-prone spontaneously hypertensive rats is related to slow muscle-specific hypotrophy through MuRF1 |
| 3. 学会等名 The 27th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上敬夫、竹森久美子、水口信行、萩山満、木村竜一郎、前西修、筑後孝章、木村雅友、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 |
| 2. 発表標題 正常血圧ラット、高血圧ラット及び脳卒中発症ラットにおける心筋発現遺伝子の比較解析 |
| 3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|