

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17934

研究課題名(和文)肥満が筋萎縮の進行を促進させるメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of accelerated progression of muscle atrophy in obese mice

研究代表者

後藤 亜由美(Goto, Ayumi)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：20780969

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)：肥満が廃用性筋萎縮を促進させる因子であることが示唆されているがそのメカニズムの多くは不明である。本研究では肥満が筋萎縮の進行を促進させる分子メカニズムを炎症性サイトカインIL-6と筋萎縮原因遺伝子の発現を中心として評価・検討することを目的とした。肥満における廃用性筋萎縮は、骨格筋組織内の筋萎縮原因遺伝子MuRF1や炎症性サイトカインIL-6の発現増加を介してタンパク質合成経路を減弱させ、骨格筋萎縮の進行を促進す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

肥満が筋萎縮の進行を促進させる可能性が示唆されている社会的背景として、加齢に伴う筋量減少(サルコペニア)と肥満が組み合わさった病態である「サルコペニア肥満」が歩行障害のリスクを増加させ、寝たきり高齢者を増加させることが問題となっている。本研究の成果は、サルコペニア肥満など肥満と筋萎縮に関連した疾患の治療・予防法の開発への足掛かりになり、寝たきり高齢者の予防・対策に繋がる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that obesity may contribute to the loss of skeletal muscles. However, the obesity-related cellular mechanisms during inactivity still need to be elucidated. The purpose of this study was to determine the effects of obesity on degradation-related signaling pathways and inflammatory mediators in muscles during inactivity. Mice were fed either a normal diet (ND) or a high fat diet (HFD). Then, the hind limbs of all mice were unilaterally immobilized for 6 h (initial phase) or 1, 3 and 7 days (long-term inactivity). In the 7 days, the HFD significantly augmented loss of mass rate as compared with ND. Due to long-term inactivity, the expression level of MuRF1 mRNA 3days in soleus and plantaris muscles was significantly higher in the HFD compared with the ND. Moreover, IL-6 mRNA expression was significantly increased by immobilization in the HFD during the initial phase of inactivity. We showed that HFD affects inflammatory mediators during muscle inactivity.

研究分野：骨格筋

キーワード：骨格筋 肥満 筋萎縮 炎症性サイトカイン IL-6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性に富む組織であり、怪我や病気に伴う不活動は骨格筋萎縮を誘発させることはよく知られている。骨格筋萎縮は日常生活活動への制限をきたし、社会復帰の障害となる。近年、骨格筋萎縮の進行を促進させる新たなリスクファクターとして『肥満』が注目されている。これまでの先行研究において、肥満マウスに対する除神経は、通常マウスと比較して 10%ほど筋の萎縮率が高くなることが報告されている (Roseno SL, et al. 2015)。骨格筋萎縮率の増大は長期臥床や不活動期間を延長させ、それに伴う二次的な弊害 (循環機能低下、心肺機能低下、認知機能低下など) の発症リスクも増加させる。しかしながら現状では、肥満が筋萎縮の進行を促進させる原因や機序は特定されておらず、その鍵となる分子および機序の早急な解明が必要である。

研究開始当初、研究代表者は肥満が筋萎縮の進行を促進させる背景には、肥満と筋萎縮がクロストークすることで相加・相乗的に作用する分子が存在すると考えた。そこで肥満と筋萎縮に共通して活性化する分子 Interleukin-6(IL-6)に着目した。IL-6 は肥満などの慢性炎症によって増加することが報告されている。さらに実験動物を用いた研究では、IL-6 の投与により筋萎縮が生じることが示唆されている (Goodman MN. 1991)。したがって肥満が筋萎縮の進行を促進させるメカニズムとして、筋萎縮が肥満と組み合わせることで通常の筋萎縮よりも IL-6 の活性増大が生じ、筋萎縮の増加が生じると仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の最終ゴールは、肥満が筋萎縮の進行を促進させるメカニズムの解明、さらにはサルコペニア肥満など肥満と筋萎縮に関連した疾患の治療・予防におけるターゲット分子やメカニズムを同定することである。そこでまずは肥満が筋萎縮の進行を促進させる分子メカニズムを炎症性サイトカイン IL-6 と筋萎縮原因遺伝子の発現を中心として評価・検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では肥満が筋萎縮を促進させる分子メカニズムを解明するために、実験として廃用性筋萎縮を生じるギプス固定期間 (~7 日) における筋萎縮原因遺伝子発現の経時的変化、実験として廃用性筋萎縮を生じないギプス固定初期段階 (~6 時間) が筋萎縮原因遺伝子に及ぼす影響を評価することとした。

(1) 倫理規定の遵守

本研究における全ての動物実験は、順天堂大学動物実験等管理規則を遵守し、順天堂大学動物実験委員会の審議を経て学長の承認を得て実施された。

(2) 実験動物

本研究では、生後 5 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (66 匹) を用い、無作為に通常食 (ND) 群と高脂肪食群 (HFD) 群に分類した。

(3) 高脂肪食負荷

HFD 群は高脂肪食飼料 (脂肪 60%、タンパク質 20%) を 16 週間与えることで肥満を誘発させた。一方の ND 群においては、通常飼料 (脂肪 10%、タンパク質 20%) を与えた。

(4) ギプス固定

16 週間の食事介入後、全てのマウスに対しキャストリングテープで右後肢を足関節最大底屈位に固定し、廃用性筋萎縮を惹起させた。なお、マウスはケージ内を自由に移動でき、餌および水は問題なく摂取できることを確認した。

(5) サンプル採取

ギプス固定前、ギプス固定後 6 時間、1 日、3 日、7 日後にサンプリングを実施した。マウスの体重を測定した後、イソフルラン麻酔下にてマウスから血液を採取し、遠心分離にて血漿成分を分離して -80 にて保存した。またペントバルビタールの過剰投与による安楽死させた後、マウスより精巣上体脂肪組織ならびに下肢骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋) を採取し、重量を測定した後液体窒素にて急速凍結し、その後 -80 にて保存した。

(6) Western blotting

採取したヒラメ筋と足底筋を protease inhibitor と phosphatase inhibitor を含むタンパク質抽出液を用いてホモジネートし、ピシンコニン酸法によりタンパク質を定量測定した。その後タンパク質量を一定に調整し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。その後各種一次抗体 [Actin p-Akt Ser473, Akt, p-p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) Thr389, p70S6K, p-4E-binding protein 1 (4E-BP1) Thr37/46, p-c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) Thr183/Tyr185, JNK, p-Forkhead box O3a (FoxO3a) Ser253, FoxO3a] を 4、overnight で反

応させた。次に二次抗体 (anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG) を室温で 1~2 時間反応させた。Chemi Doc™ を用いて化学発光を行った。得られたデータを Image J を使って定量的に算出した。得られたデータは内在性コントロールである Actin に対する各タンパク質の相対的発現量で示した。

(7) Real-time RT-PCR

得られた筋サンプルにおける遺伝子の発現量の解析は、定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ転写反応 (Real-time RT-PCR) にて行った。RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し cDNA に逆転写した。合成した cDNA は TaqMan Gene Expression Assays を用いて Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1), atrophy gene-1/muscle atrophy F-box (atrogin-1/MAFbx-1), Tumor Necrosis Factor (TNF)、Interleukin-6 (IL-6) を測定した。内在性コントロールとして Ribosomal Protein S18 (Rps18) を用い、Rps18 に対する各遺伝子発現レベルの相対的発現量を評価した。

(8) 統計解析

データは Student's t-test または二元配置分散分析にて評価し、二元配置分散分析は主効果として実験 : ギプス固定期間 (Time) と食事 (Diet)、実験 : 不活動 (Inactive) と食事 (Diet) とし、交互作用が認められた場合には多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) にて評価した。有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

実験 : 肥満における長期的なギプス固定が骨格筋萎縮と遺伝子発現に及ぼす影響

本研究では ND 群と HFD 群におけるギプス固定前、ギプス固定後 1 日、3 日、7 日のマウスを用いて、肥満が骨格筋萎縮に及ぼす影響を検討した。

(1) 高脂肪食負荷による肥満の影響

ND 群と比較し HFD 群では体重ならびに精巣上体脂肪組織の有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。したがって本研究における高脂肪食負荷は、適切に肥満を誘発することを確認した。

(2) ギプス固定による筋萎縮の影響

足底筋およびヒラメ筋でギプス固定期間 (Time) と食事 (Diet) に主効果が認められ ($p < 0.05$)、ギプス固定による筋萎縮が確認された。さらに、足底筋およびヒラメ筋のギプス固定 7 日後の骨格筋萎縮率は、ND 群と比較して HFD 群で有意に高く ($p < 0.05$)、肥満が筋萎縮率の増加に寄与することを確認した (図 1)。

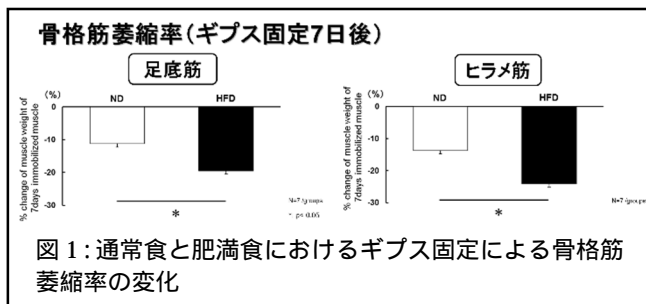


図 1: 通常食と肥満食におけるギプス固定による骨格筋萎縮率の変化

(3) 高脂肪食負荷におけるギプス固定が筋萎縮原因遺伝子の発現に及ぼす影響

筋萎縮原因遺伝子である Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) と atrophy gene-1/muscle atrophy F-box (atrogin-1/MAFbx-1) の発現量を評価したところ、MuRF1 遺伝子発現量は足底筋とヒラメ筋でギプス固定期間 (Time) に主効果が認められ、ギプス固定期間 (Time) と食事 (Diet) の要因間で交互作用が認められた ($p < 0.05$)。さらに、足底筋の MuRF1 においては HFD 群のギプス固定 3 日目まで有意な増加を示した ($p < 0.05$)。atrogin-1/MAFbx-1 の遺伝子発現量は足底筋およびヒラメ筋でギプス固定期間 (Time) に主効果が認められた ($p < 0.05$) が、食事 (Diet) による変化は認められなかった。

本研究では、肥満はギプス固定による廃用性筋萎縮誘導において骨格筋萎縮率を増加させることが明らかとなった。さらに肥満における廃用性筋萎縮は MuRF1 mRNA の発現量が有意に増加することが明らかとなり、肥満における長期間 (~7 日) の廃用性筋萎縮は MuRF1 遺伝子発現の増加を介して筋の萎縮率を増加させる可能性が示唆された。

実験 : 肥満におけるギプス固定初期段階が炎症性サイトカインに及ぼす影響

本研究では ND 群と HFD 群における右後肢ギプス固定後 6 時間のマウスを用いて検討した。なお、それぞれの群の左後肢を対照群とした。

(1) 高脂肪食負荷による肥満の影響

実験 : 同様に、ND 群と比較し HFD 群では体重ならびに精巣上体脂肪組織の有意な増加が認められ ($p < 0.05$) 肥満が確認できた。

(2) ギプス固定による筋萎縮の影響

ヒラメ筋と足底筋の筋重量は、それぞれの対照脚と比較して 6 時間のギプス固定で有意な変

化は認められず、短時間のギプス固定では廃用性筋萎縮は認められないことを確認した。

(3) 筋タンパク質合成経路への影響

ギプス固定の初期段階でのタンパク質合成関連シグナル伝達に対する肥満の影響を検討するために、ギプス固定6時間後の足底筋およびヒラメ筋におけるAkt、p70S6K、および4E-BP1のリン酸化状態を測定した。足底筋とヒラメ筋の両方でのAktリン酸化は、肥満におけるギプス固定によって有意な変化が認められなかった。p70S6Kのリン酸化は、足底筋とヒラメ筋で不活動(Inactive)の主効果が認められ、ギプス固定により有意な低下が認められた。さらに足底筋のHFD群におけるp70S6Kリン酸化はギプス固定にตอบสนองして有意に減少したが、ND群では有意な減少はみられなかった。一方、ヒラメ筋のp70S6Kのリン酸化は、HFD群とND群の両方でギプス固定にตอบสนองして有意に減少した($p < 0.05$)。足底筋における4E-BP1のリン酸化は不活動(Inactive)に主効果が認められ($p < 0.05$)、さらにHFD群でのみ4E-BP1リン酸化は非ギプス脚と比較してギプス固定脚で有意に減少した($p < 0.05$)。一方、ヒラメ筋の4E-BP1のリン酸化は不活動(Inactive)と食事(Diet)の影響は認められなかった。

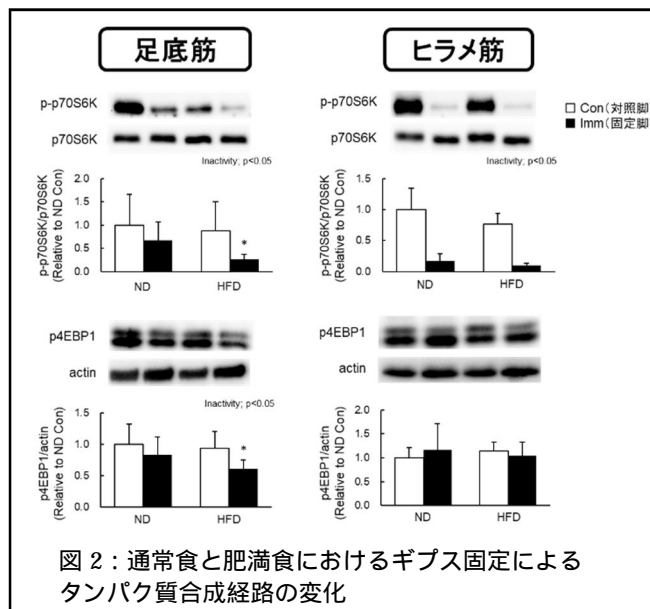


図2: 通常食と肥満食におけるギプス固定によるタンパク質合成経路の変化

(4) 筋タンパク質分解経路への影響

足底筋とヒラメ筋における筋萎縮原因遺伝子 MuRF1 mRNA と atrogen-1/MAFbx の遺伝子発現を測定した。足底筋における MuRF1 mRNA の発現は、食事(Diet)の主効果が認められ、肥満により発現が有意に増加した($p < 0.05$)が、ギプス固定による発現レベルに影響を与えなかった。一方、ヒラメ筋では、肥満と不活動にตอบสนองした MuRF1 mRNA の変化は認められなかった。足底筋における Atrogen-1/MAFbx mRNA の発現量は、肥満と不活動に対する変化がなかった。一方で、ヒラメ筋での Atrogen-1/MAFbx mRNA 発現は不活動(Inactive)に主効果が認められ、ND群とHFD群ともにギプス固定によって有意な発現増加が認められた($p < 0.05$)。

(5) 炎症性サイトカイン分子への影響

足底筋とヒラメ筋における炎症誘発性/ストレス経路に関連するタンパク質と遺伝子発現のレベルに関して、TNF と IL-6 の mRNA の発現と JNK のリン酸化を測定した。足底筋の TNF mRNA 発現レベルは不活動(Inactive)に主効果が認められ、さらにND群のTNF mRNAはギプス固定によって有意に増加した。一方、ヒラメ筋では、肥満とギプス固定によるTNF mRNAの変化はなかった。IL-6 mRNAの発現については、足底筋とヒラメ筋の両方で不活動(Inactive)に主効果が認められ、さらに足底筋では、HFD群においてギプス固定によりIL-6 mRNAの発現が有意に増加した(図3)。JNKのリン酸化に関しては、足底筋とヒラメ筋で不活動(Inactive)に主効果が認められ、不活動による影響が観察された。

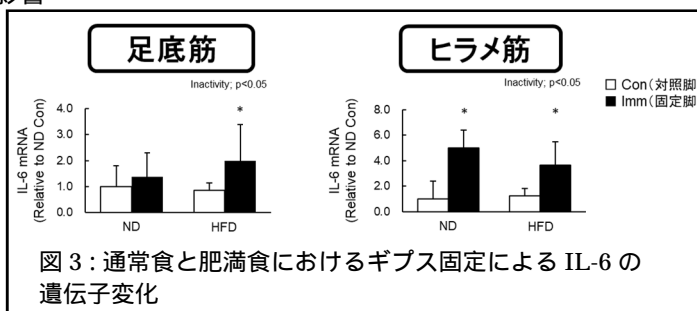


図3: 通常食と肥満食におけるギプス固定によるIL-6の遺伝子変化

本研究の結果より、高脂肪食負荷による肥満は足底筋の不活動初期段階でp70S6Kと4E-BP1のリン酸化レベルが有意に低いことを示した。さらに、高脂肪食負荷による肥満は足底筋の不活動初期段階でIL-6の遺伝子発現が有意に増加することが明らかとなった。先行研究において、動物におけるIL-6の投与はタンパク質合成経路を減弱させることが報告されている(Goodman MN, 1991)。したがって、肥満が筋萎縮を促進するメカニズムの一つとして、肥満における不活動の初期段階では炎症誘発性/ストレス分子であるIL-6の発現増加とそれに関連したタンパク質合成経路の減少が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsuro Egawa, Yoshitaka Ohno, Shingo Yokoyama, Ayumi Goto, Rika Ito, Tatsuya Hayashi, Katsumasa Goto	4. 巻 7(4)
2. 論文標題 The effect of advanced glycation end products on cellular signaling molecules in skeletal muscle .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Phys Fit Sports Med	6. 最初と最後の頁 229-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.7.229	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 Egawa T, Ohno Y, Goto A, Yokoyama S, Hayashi T, Goto K	4. 巻 19(10)
2. 論文標題 AMPK mediates muscle mass change but not the transition of myosin heavy chain isoforms during unloading and reloading of skeletal muscles in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E2954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19102954	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 Ito R, Higa M, Goto A, Aoshima M, Ikuta A, Ohashi K, Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Miyata H, Goto K.	4. 巻 13(10)
2. 論文標題 Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0205645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205645. 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 後藤亜由美、町田修一	4. 巻 45(5)
2. 論文標題 サルコペニア研究の現状と臨床への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 理学療法学	6. 最初と最後の頁 332-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15063/rigaku.45-5kikaku_Goto_Ayumi	査読の有無 無
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 Yamashita Y, Takeuchi T, Endo Y, Goto A, Sakaki S, Yamaguchi Y, Takenaka H, Yamashita H.	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 Dietary Supplementation with Dunaliella Tertiolecta Prevents Whitening of Brown Fat and Controls Diet-Induced Obesity at Thermoneutrality in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients.	6. 最初と最後の頁 1686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12061686.	査読の有無 無
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 Hashimoto M, Goto A, Endo Y, Sugimoto M, Ueda J, Yamashita H.	4. 巻 22(3)
2. 論文標題 Effects of CREG1 on Age-Associated Metabolic Phenotypes and Renal Senescence in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031276.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 橋本理尋、後藤亜由美、遠藤優貴、竹内環、喬善楼、山下均
2. 発表標題 aP2-CREG1-Tgマウスにおける加齢性腎硬化の改善
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤亜由美、江川達郎、吉原利典、柿木亮、都築孝允、内藤久土、林達也
2. 発表標題 温熱刺激が骨格筋代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 温熱生理研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下均、橋本理尋、竹内環、遠藤優貴、後藤亜由美、片岡直也、岡田只士、向井貴子、楠堂達也
2. 発表標題 CREG1の病態生理学的役割の解明
3. 学会等名 温熱生理研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goto A, Tsuzuki T, Yoshihara T, Kakigi R, Furuichi S, Tsukioka K, Naito H.
2. 発表標題 High-fat diet augments muscle atrophy by changes of muscle atrophy-related genes in mice.
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakigi R, Goto A, Yoshihara T, Tsuzuki T, Naito H.
2. 発表標題 Effects of heat stress treatment and leucine supplementation on age related muscle loss in mice.
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川達郎、王昱媛、岩元麻祐、芳賀浩太郎、後藤亜由美、林達也
2. 発表標題 日本食および欧米食摂取によるラット骨格筋の脂質プロファイルの比較検討
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 都築孝允、後藤亜由美、吉原利典、月岡恵惟、内藤久士
2. 発表標題 肥満マウスにおけるキサンチンオキシダーゼ阻害剤投与は一過性運動による骨格筋の糖代謝関連シグナル伝達に影響を与えない
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤亜由美、柿木亮、吉原利典、松本綾子、都築孝允、古市真也、月岡恵惟、内藤久士
2. 発表標題 温熱刺激はサルコペニア肥満の新規治療法となり得るか?
3. 学会等名 第26回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川達郎、大野善隆、横山真吾、津田諭志、後藤亜由美、伊藤理香、後藤勝正、林達也
2. 発表標題 糖化ストレスによる筋肥大と筋収縮機能およびシグナル伝達分子への影響解明
3. 学会等名 第33回日本体力医学会大会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Egawa T, Ohno Y, Yokoyama S, Goto A, Tsuda S, Goto K, Hayashi T.
2. 発表標題 Glycative stress influences skeletal muscle growth and cell growth signaling in mice .
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goto A, Endo Y, Hashimoto M, Yamashita H.
2. 発表標題 The effect of CREG1 for energy metabolism in aged mice
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤亜由美、橋本理尋、遠藤優貴、山下均
2. 発表標題 CREG1が高齢マウスの脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 優貴、後藤 亜由美、橋本 理尋、松井 美佳、山下 均
2. 発表標題 絶食下におけるCREG1の生理的役割の検討
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 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

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
---------	---------