

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19752

研究課題名(和文) 骨格筋に存在するインスリン分泌機構が加齢性筋萎縮の予防あるいは形成に関わる可能性

研究課題名(英文) Role of muscle-specific insulin in prevention and formation of sarcopenia

研究代表者

藤井 宣晴 (Fujii, Nobuharu)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは膵臓の細胞での発現特異性が非常に強いことが知られている。申請者はこれまでに、骨格筋から分泌される生理活性因子であるマイオカイン(分泌物の総称)の探索において、インスリンは骨格筋でも発現していることを明らかにした。その生理的な役割を明らかにするために、骨格インスリンと筋細胞の増殖・分化の関係を検討した。C2C12細胞のゲノム上でインスリン1と2の両方の配列にCRISPER/Cas9法で点変異を導入し、インスリンの発現を消失させた細胞株を樹立した。それらの変異株では、増殖と分化の両方が、著しく阻害された。しかし株系統間の差が大きく、さらなる検討が必要とされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢ともなう筋萎縮の進行現象であるサルコペニアは、高齢者の生活の質を著しく低下させるため、その生成機序を明らかにすることと、その予防策を講じることは、超高齢者社会を迎えた日本では必須とされている。インスリンが骨格筋に発現していることは、申請者も含めて、多くの研究者が気づかなかったことである。しかし、一般的なインスリンの性質から、筋の同化作用に貢献している可能性が考えられる。本研究ではその一部が確かめられ、新たなサルコペニアの生成機序の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Insulin is highly and specifically expressed in the beta-cells of pancreas. However, we have found that insulin is also significantly expressed in the muscle cells although the expression level is lower than that in the beta-cells. In order to clarify the role of muscle-specific insulin in skeletal muscle tissue, we established C2C12 cell lines which has no expression of insulin due to point mutation of insulin 1 and insulin 2 genes in the genome that made with CRISPER-Cas9 method. Insulin depleted C2C12 cell lines had impaired proliferation and differentiation, suggested that muscle-specific insulin may contribute to maintain muscle mass. However, since variability of the results among the cell lines was relatively huge, more intensive investigation is necessary.

研究分野：骨格筋生物学、分子生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア インスリン C2C12細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う骨格筋量の減少および筋力の低下はサルコペニアと呼ばれ、高齢者の生活の質を低下させるだけでなく、様々な疾病に対する抵抗力を減少させる。日本は世界に先駆け未曾有の超高齢化社会を迎えており、サルコペニアの抑制が、医療費の低減・要介護の回避・健康寿命の延伸といった諸問題の解決に必須と考えられている。インスリンはタンパク質合成促進作用を持つホルモンで、膵臓の細胞で産生される。骨格筋は膵臓から分泌されたインスリンが作用する最も大きな標的臓器であり、加齢に伴うインスリン感受性の低下(インスリン抵抗性の増大)が、筋量および筋力を低下させる原因と考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、骨格筋から分泌されるホルモンの網羅的探索を進めてきた。その過程で、膵臓にしか存在しないとされてきたインスリンが、骨格筋でも産生・分泌されている証拠を複数得た。骨格筋が、膵臓から分泌されるインスリンの単なる受け手ではなく、自身でもインスリンを産生・分泌しているとなれば、これまでのサルコペニア成立機序とその予防・治療法の常識は覆されることになる。加えて、以下に示す3つの重要な問いが生じる。

- (1) 骨格筋のインスリンは、筋量・筋力の決定因子か？
- (2) 骨格筋のインスリン含有量や分泌能力は、加齢とともに減少するか？
- (3) 骨格筋のインスリンを標的とした、サルコペニア予防・治療は可能か？

本研究は、上記の問いの答えを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集によって、インスリンを産生できない培養骨格筋細胞を樹立した。マウス由来の培養筋細胞株 C2C12 のゲノムには、インスリン 1 とインスリン 2 の、2 つの遺伝子がコードされている。そこで、両方の遺伝子に相同な配列を標的にして、点変異の導入を試みた。その後、希釈法によって単一クローンを選択した。

4. 研究成果

結果として、インスリン 1 とインスリン 2 の両方にフレームシフトを起こす点変異が導入され、インスリンの発現が完全に抑制された細胞株が 6 つ得られた。それぞれの細胞株で、増殖能力および分化能力を検討したところ、いずれにおいても、野生株と比べて著しく低下していた。これらの結果は、骨格筋に発現するインスリンは筋細胞の成長を促進させる作用(同化作用)を有し、筋量維持の調節に関与していることが明らかになった。しかし、6 つの細胞株間で、増殖・分化の低下度合いが大きく異なった。これらの原因は、CRISPER/Cas9 によるゲノム編集と、その後のセレクション作業において、継代の回数が進むうちに、各株での個性が増長されたためと推察された。そのため、CRISPER/Cas9 ベクターの導入を、リポフェクション法からウイルス感染法に変更するなどして、継代回数を減らす工夫が必要と考えられた。今回の結果を確認するためのより精度の高い検討は必須である。しかし、今回の結果から示唆される内容は、インスリンがサルコペニアに関係しているかもしれないという新アイデアであり、その治療法の開発に一石を投じるものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Kenichi, Furuichi Yasuro, Yamamoto Masashi, Takahashi Megumi, Akimoto Yoshihiro, Ishikawa Takahiro, Shimizu Takahiko, Fujimoto Masanori, Takada Watanabe Aki, Hayashi Aiko, Mita Yoshitaka, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L, Ishibashi Ryoichi, Maezawa Yoshiro, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro, Takemoto Minoru	4. 巻 20
2. 論文標題 R3hdml regulates satellite cell proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947957	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 Sato Satoko, Nomura Mitsuru, Yamana Ikko, Uchiyama Akira, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 83
2. 論文標題 A new in vitro muscle contraction model and its application for analysis of mTORC1 signaling in combination with contraction and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1851 ~ 1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1625261	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 Goto Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Machida Kazumasa, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Miura Shinji, Mori Tsukasa	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterization of myofiber type specific molecules using mass spectrometry imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 185 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8319	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 Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Takagi Mayumi, Aoki Miho, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 13
2. 論文標題 Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206146	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 Hatazawa Yukino, Ono Yusuke, Hirose Yuma, Kanai Sayaka, Fujii Nobuharu L., Machida Shuichi, Nishino Ichizo, Shimizu Takahiko, Okano Masaki, Kamei Yasutomi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201700573R	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----