

令和 4 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：2019～2021
 課題番号：19K11486
 研究課題名(和文) 新規生活習慣病治療薬開発を目指した遅筋化促進因子過剰発現マウスの作製と機能解析

研究課題名(英文) Generation and phenotyping of mice overexpressing slow contractile phenotype promoting factor for the development of new metabolic syndrome drugs

研究代表者
 本多 賢彦 (Honda, Masahiko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10455545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は安静時には全身の2割を占めるほどのエネルギー消費を行う。本研究では、筋線維タイプと代謝能力との密接な関係に着目して、遅筋化制御因子であるVgll2の発現レベルが個体の肥満耐性にも影響をおよぼすか、遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。まず筋特異的にVgll2を過剰発現するトランスジェニック(Vgll2 Tg)マウスを新たに作製し、4系統を得た。さらに、通常飼育したVgll2 Tgマウスの体重増加率が、野生型マウスと比較して有意に低下していることを見出した。一方、Vgll2欠損(Vgll2 K0)マウスに高脂肪食を与えたときの体重増加率は、野生型マウスと比較して有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自に作出したVgll2 K0マウスおよびVgll2 Tgマウスを用いて、Vgll2の発現レベルが個体の肥満しやすさに関係している可能性を示すことに成功した。研究期間内に分子機構の解明までには至らなかったが、Vgll2は骨格筋選択的に発現することから、筋代謝調節を介して、全身の代謝に影響をおよぼしているものと考えられる。運動刺激によって活性化する点を加味すると、Vgll2の制御機構には、人為的に活性操作の可能な、生活習慣病の治療標的となる分子が存在する可能性は高い。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle consumes so much energy that it accounts for 20% of the total body under sedentary conditions. Focusing on the close relationship between muscle fiber type and metabolic capacity, in this study, I examined whether the expression level of Vgll2, a promoter of slower contractile phenotype, also influences an individual's tolerance to obesity, using genetically engineered mice. First, I generated transgenic mice that overexpress Vgll2 in a muscle-specific manner (Vgll2 Tg) and obtained four strains. Furthermore, I found that the body weight gain rate of normally bred Vgll2 Tg mice was significantly lower than that of wild-type mice. On the other hand, the rate of weight gain of Vgll2-deficient mice (Vgll2 K0) fed a high-fat diet was significantly increased compared to wild-type mice.

研究分野：筋線維タイプ制御

キーワード：Vgll2 遅筋 好氣的代謝 トランスジェニックマウス ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は単なる運動器ではなく、安静時には全身の 2 割を占めるエネルギーを消費する代謝器官の役割も担っている。骨格筋を構成する筋線維は遅筋線維と速筋線維とに分類されるが、ミトコンドリアを豊富に含む遅筋線維は好氣的代謝活性が高いのに対し、速筋線維ではミトコンドリア含量が低く好氣的代謝活性も低い。遅筋線維と速筋線維の混在比は外的な要因に応じて変動するが、同時に代謝特性も変動する。このため、筋線維タイプの操作を介した筋代謝の調節も広く行われている。例えば習慣的な運動は、より収縮スピードの遅いタイプの筋線維の混在比を増加させる（遅筋化）一方で、脂質消費量や糖取り込み量を増加させる。

このようなことから、遅筋化促進因子の作動薬を生活習慣病治療に用いようとする動きがある。ところが、動物実験で効果の認められる既存薬もあるものの、骨格筋以外の臓器への作用も大きく、臨床応用には至っていない。この状況を打開するために、骨格筋選択的に発現する新規標的分子の探索が求められていた。

他方、研究代表者は **TEAD** 転写因子と共役するコファクターで、骨格筋に選択的に発現する **Vgll2** の生体における機能を明らかにするために、遺伝子欠損マウス (**Vgll2 KO** マウス) を独自に作出して解析を行っていた。その結果、**Vgll2 KO** マウスでは遅いタイプの筋線維の混在比が減少（速筋化）していることや、**Vgll2 KO** マウスの骨格筋は、習慣的に運動を行っても遅筋化しないことなどを見出して、**Vgll2** が運動刺激によって活性化する遅筋化促進因子であることを明らかにした。しかし、**Vgll2** の機能が筋代謝調節にも及ぶのか否か、また、いかなる分子機構でそれを行うのかについては知見が得られていなかった。

研究の計画段階で利用可能な動物モデルは **Vgll2 KO** マウスのみであった。しかし、野生型マウス自体が速筋線維比率の高い動物であることを踏まえると、速筋化の筋代謝に対する影響は軽微であることも予想された。そのため、この可能性に備えて、筋特異的に **Vgll2** を過剰発現するトランスジェニックマウス (**Vgll2 Tg** マウス) を新たに作出することとした。

2. 研究の目的

本研究は、運動によって活性化する遅筋化制御因子であることが新たに明らかになった **Vgll2** が、筋代謝調節にも関与するかを検証することと、**Vgll2** を介した筋代謝調節機構がいかなるものかを明らかにすることで、2 型糖尿病を含む生活習慣病の新規治療法の分子基盤構築を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 筋特異的 **Vgll2** 過剰発現マウス (**Vgll2 Tg** マウス) の作製

筋クレアチンキナーゼプロモーター搭載プラスミド **pBS-MCK** を **addgene** 社から入手し、このプロモーター下流に **V5-6xHis** タグ付加マウス **Vgll2** コード領域を連結して、マウス過剰発現用ベクターを作製した。その後、制限酵素処理によって必要領域を線状化し、得られた **DNA** 断片を **C57BL/6J** マウス受精卵雄性前核に顕微注入することで、**Vgll2 Tg** マウスの作製を行った。得られた産仔についてジェノタイピング **PCR** を行ってスクリーニングし、ファウンダーマウス (**F0**) を選定した。**F0** マウスは野生型マウスと交配し、産仔について再びジェノタイピング **PCR** を行って、次世代 (**F1**) にトランスジェンが受け継がれるかの確認を行なった。以上をもって、**Vgll2 Tg** マウスの確立とした。

(2) 通常飼育下における体重の測定および体脂肪率の測定

野生型マウス、**Vgll2 KO** マウス、**Vgll2 Tg** マウスについて 8 週齢から 12 週齢にかけて週に 1 回の頻度で体重の測定を行った。12 週齢時には、実験動物用 X 線 **CT (Latheta LCT-200)** を用いて体脂肪率の測定を行った。

(3) 高脂肪食負荷試験

野生型マウスおよび **Vgll2 KO** マウスに高脂肪食 (**HFD32**) を一定期間与え、その間の体重の変化を記録し比較した。試験は 5 週齢から開始し、17 週齢まで 12 週間にわたって行った。試験の終了後、実験動物用 X 線 **CT** を用いて体脂肪率を測定した。

(4) 定量的逆転写 **PCR (qRT-PCR)**

通常飼育した 12 週齢、野生型マウスおよび **Vgll2 Tg** マウスより長趾伸筋 (**EDL**) を摘出し、得られた **cDNA** を用いて **qRT-PCR** を行い、**Vgll2 Tg** マウス各系統における **Vgll2** の過剰発現レベルの測定や、**Vgll2** を介した筋代謝調節機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1) **Vgll2 Tg** マウスの作製

本研究では合計 569 個の受精卵に **DNA** 断片の顕微注入を行い、9 匹の **F0** マウスを得ることが

できた。得られた **F0** 雄マウス (**6** 匹) を野生型マウスと交配させたところ、**F1** マウスが得られたのは **4** 系統であった。マウスの個体識別は耳標によって行ったため、これらの **4** 系統を、**F0** マウスの識別番号に基づき、それぞれ **L67**、**L71**、**L126**、**L129** と便宜上呼称して区別することとした。現時点で **L67** と **L71** は各 **5** 世代目、**L126** は **3** 世代目、**L129** は **4** 世代目まで繁殖が進んでいる。

(2) 過剰発現レベルの比較

Vgll2 Tg マウスの **4** 系統における **Vgll2** の過剰発現レベルを **qRT-PCR** で解析したところ、最も発現量の多かったのは **L129** で野生型マウスの約 **30.9** 倍となった。以下、**L67** (野生型マウスの約 **21.5** 倍。以下同様。)、**L126** (約 **13.0** 倍)、**L71** (約 **6.73** 倍) の順に発現が高かった。このうち、野生型マウスとの間に有意差が認められたのは、**L129**、**L67**、**L126** である (図 1)。

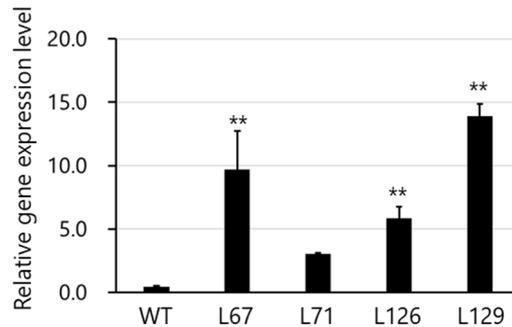


図1 トランスジェニックマウス各系統におけるVgll2遺伝子の発現レベル

(3) 通常飼育下における体重および体脂肪率の比較

通常環境で飼育されたマウスの体重に **Vgll2** の発現量が影響をおよぼすかを検証する目的で、野生型マウスおよび各遺伝子改変マウスについて、**8** 週齢から **12** 週齢にかけて週に **1** 回の頻度で体重の測定を行った。その結果、**8** 週齢時、**Vgll2 KO** マウスの平均体重は野生型マウスよりも軽い傾向が見られた。他方、**8** 週齢 **Vgll2 Tg** マウスの平均体重は野生型マウスよりも重い傾向が見られた。**Vgll2 Tg** マウスと **Vgll2 KO** マウスとの間には有意差が認められた。また、**Vgll2 Tg** マウスの各系統の **8** 週齢時平均体重はそれぞれ、**L67** が **23.9 g (n=8)**、**L71** が **23.5 g (n=11)**、**L126** が **23.8 g (n=14)**、**L129** が **24.8 g (n=2)** となった。**L129** の集計数が少ないことを考慮しても、**Vgll2** の発現レベルと **8** 週齢時の平均体重には相関関係がある可能性が考えられる。一方、体重増加率の平均 (**12** 週齢/**8** 週齢) は、野生型マウスが **1.16**、**L126** が **1.10** となり、有意に低下していた (図 2)。**12** 週齢時の体脂肪率と **Vgll2** 発現レベルとの相関性は認められなかった。

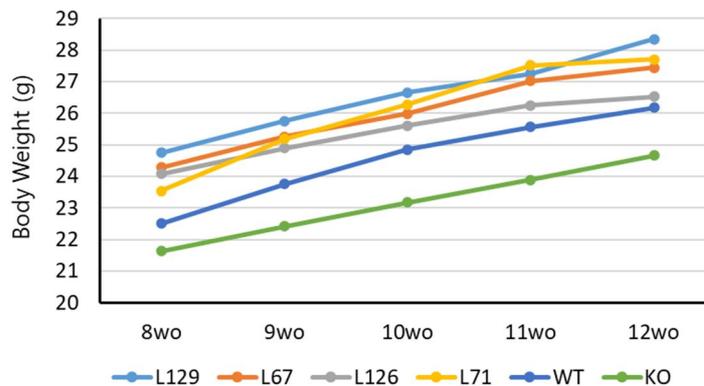


図2 通常飼育下における野生型マウスおよび各Vgll2遺伝子改変マウスの体重の推移

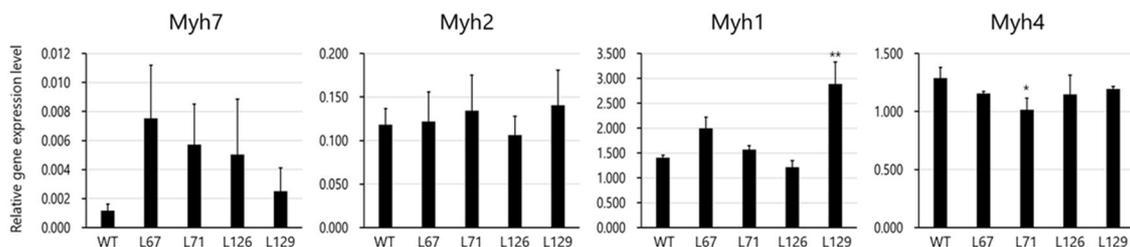


図3 通常飼育下におけるミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の発現レベル

(4) 体重増加率に影響をおよぼす分子機構の解析

Vgll2 の過剰発現が体重の増加率を低下させる分子機構を明らかにするために、**qRT-PCR** によ

る遺伝子発現解析を行った。まず、ミオシン重鎖アイソフォームをコードする遺伝子群 (**Myh7**、**Myh2**、**Myh1**、**Myh4**)について解析を行ったが、野生型マウスとの間に明確な差は認められず、**Vgll2** 単独の過剰発現では筋線維タイプの混在比に影響をおよぼさないことが示唆された(図3)。次いで、代謝調節に直接的に関与する遺伝子の発現について解析を行ったところ、**L129**における**Pdk4**の発現が、野生型マウスに比べて有意に上昇していた。しかしながら、ミトコンドリア合成に関与する遺伝子群 (**Ppargc-1a**、**Tfam**) および、脂質代謝に関与する遺伝子群 (**Cpt1b**、**Cd36**、**Acadm**) の発現量に有意差は認められなかった。現時点で、**Vgll2** を介した筋代謝調節機構は不明である。

(5) 高脂肪食負荷試験

Vgll2 欠損が肥満耐性に与える影響を観察する目的で、野生型マウスおよび**Vgll2 KO** マウスに高脂肪食を一定期間与え、その間の体重の推移を記録した。高脂肪食負荷は5週齢から開始し、17週齢までの12週間にわたり行った。試験終了時(17週齢)における平均体重を比較したところ、高脂肪食負荷群同士、通常食群同士では、野生型マウスと**Vgll2 KO** マウスとの間に有意差は認められなかった(図4)。しかしながら、体重増加率の平均(17週齢/5週齢)は、野生型マウスの高脂肪食負荷群で**2.15**であるのに対して、**Vgll2 KO** マウスの高脂肪食負荷群では**2.83**となり、有意に上昇していた(図4)。しかしながら、17週齢時の体脂肪率に有意差は認められなかった。

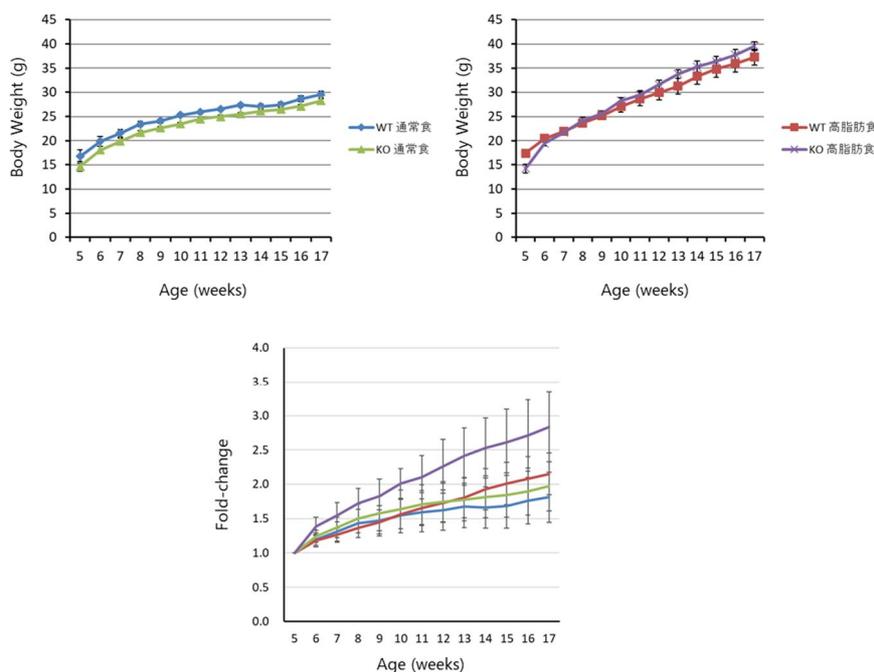


図4 高脂肪食負荷を行った野生型マウスおよび**Vgll2 KO**マウスの体重と体重増加率の推移
 上段左：通常食群の比較、上段右：高脂肪食群同士の比較
 下段：体重増加率の比較

(6) 総論

本研究の成果は、**Vgll2** の発現レベルがマウスの肥満耐性に影響をおよぼす可能性を示すものとして示唆に富むものと考えられる。また、発現領域が骨格筋選択的であることを考えると、**Vgll2** は筋代謝調節への関与を介して全身性に影響をおよぼすことが示唆される。しかも、元来、遅筋化制御因子として見出された **Vgll2** の過剰発現が、筋線維タイプ組成に影響をおよぼさないことが示唆される点は興味深い。今後は、各遺伝子改変動物での糖負荷試験やインスリン負荷試験による耐糖能の比較検討や、トランスクリプトーム解析およびメタボローム解析による **Vgll2** を介した筋代謝調節機構の検討などを行うことで、本研究が当初の目標に掲げていた生活習慣病の新規治療法確立の分子基盤構築へと発展させたいと考えている。

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 4件）

1. 著者名 Oka Naohiro, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Dash Suman, Honda Masahiko, Ota Kazushige, Nishimura Shunji, Ueda Takeshi, Akagi Masao, Okada Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	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） 10.1002/prp2.632	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 Hitachi Keisuke, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Okada Hitoshi, Tsuchida Kunihiro, Honda Masahiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Deficiency of Vgll2 Gene Alters the Gene Expression Profiling of Skeletal Muscle Subjected to Mechanical Overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Sports and Active Living	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/fspor.2019.00041	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 Hitachi Keisuke, Nakatani Masashi, Funasaki Shiori, Hijikata Ikumi, Maekawa Mizuki, Honda Masahiko, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression Levels of Long Non-Coding RNAs Change in Models of Altered Muscle Activity and Muscle Mass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1628 ~ 1628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21051628	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 Ueda Takeshi, Kanai Akinori, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Ota Kazushige, Honda Masahiko, Kawazu Masahito, Okada Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML1 ETO by regulating chromatin accessibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fba.2021-00030	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本多賢彦、土持裕胤、常陸圭介、岡田斉
2. 発表標題 慢性的な筋使用に伴う遅筋化における転写コファクター-VgI12の機能解析
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多賢彦、土持裕胤、常陸圭介、岡田斉
2. 発表標題 The role for transcriptional cofactor vestigial like family member 2 in functional muscle remodeling induced by chronic overload
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多賢彦、土持裕胤、常陸圭介、岡田斉
2. 発表標題 機械的負荷に伴う遅筋化における転写コファクター-VgI12の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田一成、古室暁義、天野恭志、本多賢彦、金井昭教、Kai Ge、上田健、岡田斉
2. 発表標題 Utx欠損は高脂肪食により誘導される肥満を雌マウス特異的に抑制する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
---------	---------