

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08634

研究課題名(和文)クロマチン構造解析による新規サルコペニア治療薬の基盤創生

研究課題名(英文)The molecular mechanism of skeletal muscle atrophy by analyzing chromatin structure in skeletal muscle

研究代表者

井上 和則 (Inoue, Kazunori)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10631301

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)： ビタミンD受容体ノックアウトマウス及びコントロールマウスの骨格筋重量を測定し、遅筋(ヒラメ筋)及び速筋(長趾伸筋)共に有意に筋萎縮を呈する週齢を見出し、同時期の骨格筋における遺伝子発現をRNA sequence(RNAseq)により網羅的に解析した。また慢性腎不全モデルである、5/6腎摘マウスを作成し、同様に筋萎縮を呈する週齢の骨格筋における遺伝子発現をRNA sequence(RNAseq)により網羅的に解析した。両RNAseq解析にて得られた発現変動遺伝子のうち共通の遺伝子を候補遺伝子として抽出し、候補遺伝子の発現制御機構について、転写因子を中心に解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎え、慢性腎臓病患者も高齢化しており、筋力低下による転倒、骨折が医療的、医療経済的な問題となっている。本研究により慢性腎臓病の進展による骨格筋萎縮の分子機序が明らかとなれば、これまで候補治療薬とされてきた活性型ビタミンDなどと併用もしくはそれらに代わる新規治療薬創生の分子基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)： We have measured skeletal muscle weight (slow-twitch soleus and fast-twitch extensor digitorum longus) in control and vitamin D receptor knockout (Vdr KO) mice, and found skeletal muscle weight decreased significantly in Vdr KO mice compared to control mice at the age of 3 months. Next, we performed RNAseq in the mice skeletal muscles to analyze mRNA expression comprehensively. Also, we examined RNAseq in the skeletal muscles of 5/6 nephrectomized mice in a similar way as Vdr KO mice. Differentially expressed genes (DEGs) were found in both RNAseq data and the common genes of the DEGs were identified. We are examining how these genes were regulated, especially by transcription factors.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 ビタミンD 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

CKDは全人口の約10%が罹患していると推定される国民的疾患であり、CKD患者は慢性炎症や尿毒症物質などの要因によりサルコペニアの頻度が高く(Souza VA et al. *PLoS One* 2017 Apr 27;12(4):e0176230)、さらに我が国の高齢化社会も伴い、サルコペニアによる日常生活動作(ADL)の低下、転倒、骨折などにより、生活の質(QOL)の低下したCKD患者が増加していることからCKD患者のサルコペニア対策は医療・介護の観点から重要であると思われる。

CKD患者は腎機能低下早期よりビタミンD活性化障害が生じ、ビタミンD不足も生じやすい。*Vdr* KOマウスは骨格筋の筋力低下を呈する事や、サルコペニアは転倒の危険因子であり、臨床研究にてビタミンD投与により転倒が減少した事から活性型VDがCKD患者のサルコペニア治療薬となり得るのではないかと考えたが、これまでに骨格筋におけるVDR転写制御機構について詳細には解析されておらず、また骨格筋のうち赤筋線維と白筋線維との間でのVDR転写制御機構についても明らかではない。

2. 研究の目的

心筋・骨格筋におけるVDR転写制御機構及びVDR共役因子を明らかにし、CKD患者のサルコペニア治療に対する新たな分子生物学的基盤を構築する。

3. 研究の方法

1) *Vdr* KOマウスの骨格筋におけるオープンクロマチン領域の網羅的解析

骨格筋のうちヒラメ筋・長趾伸筋はそれぞれ赤筋線維・白筋線維からなるため、ヒラメ筋・長趾伸筋を用いて各筋組織におけるVDR転写制御機構を比較検討する。Control, *Vdr* KOマウスより心筋・ヒラメ筋・長趾伸筋を取り出し、Assay for Transposase Accessible Chromatin sequence (ATACseq)により赤筋線維、白筋線維におけるオープンクロマチン領域を網羅的に解析する。ATACseqによりControlマウスと*Vdr* KOマウス間で異なるオープンクロマチン領域を見出し、その候補クロマチン領域のうちVDR結合配列を含むプロモーター領域をJASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)を用いて同定する。

2) 候補VDR結合遺伝子プロモーター領域及び標的遺伝子の同定

VDRが真に1)にて同定された候補遺伝子プロモーター領域に結合し、結果として遺伝子転写制御に関わり得るかについて、1)にて解析した同週齢の*Vdr* KOマウスを用いてヒラメ筋、長趾伸筋のRNAseqを行う。さらに候補遺伝子の発現をreal time PCR・immunoblot・免疫組織染色にて比較検討する。

3) VDRと共にプロモーター領域に結合する共役因子の同定

1)で同定した候補遺伝子プロモーター領域におけるVDR共役因子を同定するため、候補遺伝子プロモーター領域の塩基配列のbiotin化sense及びantisense oligo-DNAを人工的に作成し、それらをアニールさせた2本鎖DNAと心筋・骨格筋の核抽出物とを混ぜた後、DNAをavidin beadsにて回収する(ABCD assay)。

4. 研究成果

まず*Vdr* KOマウスとcontrolマウスの体重、筋重量の推移を時系列にて検討を行った。3カ月齢にて*Vdr* KOマウスはcontrolマウスと比べ有意に心重量が増加し、ヒラメ筋、長趾伸筋の筋重量が減少した。そこで3カ月齢における*Vdr* KOマウス及びControlマウスよりヒラメ筋、

長趾伸筋を採取し、ATACseq 及び RNAseq を行った。ATACseq にて同定したオープンクロマチン領域が制御し得る遺伝子と RNAseq にて得られた differential expressed genes(DEGs)とで共通する候補遺伝子を見出した。候補遺伝子の転写制御機構及び機能については現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 和則
2. 発表標題 マルチオミックス解析を用いたvitaminDシグナルによる骨格筋維持機構の解明
3. 学会等名 日本CKD-MBD研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 和則
2. 発表標題 腎不全マウスにおけるビタミンD受容体非依存性骨格筋萎縮関連遺伝子の同定
3. 学会等名 日本CKD-MBD研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 和則
2. 発表標題 vitaminDシグナルによる骨格筋維持機構の解明
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2022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	安田 聖一 (Yasuda Seichi) (00869927)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	島田 果林 (Shimada Karin) (60814770)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

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