

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09511

研究課題名(和文)筋小胞体へのCa<sup>2+</sup>再取り込み促進を標的とした筋萎縮抑制法の開発研究課題名(英文) Development of a method to inhibit muscle atrophy by targeting accelerated Ca<sup>2+</sup> reuptake into the sarcoplasmic reticulum

研究代表者

谷端 淳 (Tanihata, Jun)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00508426

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)：萎縮骨格筋や筋疾患では筋小胞体にCa<sup>2+</sup>を取り込む筋小胞体Ca<sup>2+</sup> ATPアーゼ(SERCA)の機能を抑制する筋小胞体タンパク質・サルコリピン(SLN)の発現が増加し、細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇することが知られている。そこで、「筋小胞体Ca<sup>2+</sup>再取り込み機能維持による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度適正化が筋の恒常性維持に寄与する」と仮説をたて、SLN欠失に対する筋萎縮誘導が筋萎縮の程度に及ぼす影響を検討した。しかし残念ながらSLN KOマウスに対して筋萎縮を誘導すると野生型筋萎縮誘導モデルと同様に筋が萎縮し、筋萎縮の抑制効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、SLNはcalcineurinを介して筋肥大に関わるという報告やSLN欠失では筋の再生が遅延するということが報告された。即ち、SLN欠失はSERCA機能を改善させる一方で、SLNは筋の恒常性維持にも関わるため、SLNの発現を抑制すると骨格筋の恒常性が損なわれる可能性が示唆された。そのため、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の正常化を介した筋萎縮抑制法の開発に際し、SLNを標的することは適切ではない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is known that the expression of sarcoplasmic reticulum protein sarcolipin (SLN), which suppresses the function of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) to reuptake Ca<sup>2+</sup> into the sarcoplasmic reticulum, is increased in atrophic skeletal muscle and muscle diseases, and the intracytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is increased. Therefore, we hypothesized that "optimization of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by maintenance of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> reuptake function contributes to muscle homeostasis," and examined the effect of induction of muscle atrophy on the degree of muscle atrophy in response to SLN deletion. Unfortunately, induction of muscle atrophy in SLN KO mice resulted in muscle atrophy similar to the wild-type model of muscle atrophy, and no inhibitory effect on muscle atrophy was observed.

研究分野：筋生理

キーワード：サルコリピン 筋萎縮抑制 SERCA機能 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮を防ぐことは健康及び生活の質を維持する上で必須である。特に、不活動や老化(サルコペニア)による筋萎縮の阻止は、超高齢社会をむかえた本邦においては極めて重要な医学的・社会的に課題である。筋萎縮の主因は筋原線維の減少であるが、我々を含む先行研究の結果から、筋細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度の過剰増加が筋原線維の分解を促進して、筋萎縮を誘導する機序が示されている。しかし、筋萎縮過程において細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇する分子メカニズムは明らかになっていない。筋細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を適切なレベルに維持するためには、筋小胞体での  $Ca^{2+}$ 放出と再取り込み機能が正常に働く必要がある。筋小胞体での  $Ca^{2+}$ 放出にはリアノジン受容体が、 $Ca^{2+}$ 再取り込みには筋小胞体  $Ca^{2+}$  ATPアーゼ (SERCA) が一義的な役割を担う。これまでに研究代表者は Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では、SERCA 機能を抑制することが知られているサルコリピン (SLN) の発現が増加し、SERCA 機能低下による筋細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇が筋の変性・壊死を惹起すること、さらに SLN の発現を抑制することで DMD 病態が改善することを世界に先駆けて明らかにした。同様の報告が同時期に相次いで発表されており、筋研究のトピックスとなっている。さらに、研究代表者は筋萎縮誘導時や加齢により萎縮した骨格筋で SLN の発現が増加するという見出ししており、筋萎縮時の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は筋小胞体  $Ca^{2+}$ 再取り込み機能低下に起因するという本研究の着想に到った。

### 2. 研究の目的

「筋小胞体  $Ca^{2+}$ 再取り込み機能維持による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の適正化が筋萎縮を抑制できるか」を検証することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

*In vivo* 実験で SLN 欠失に対する筋萎縮誘導が筋萎縮の程度、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度・動態に及ぼす影響を検証する。

正常・SLN KO マウスの坐骨神経除去 2 週間後、筋萎縮・筋力の程度：重量、筋張力測定(長趾伸筋: EDL)、筋径、筋線維タイプ、筋萎縮関連分子の発現 (Atrogin-1, MuRF-1 等)で評価する。

上記 *In vivo* 実験で SLN 欠失に対する筋萎縮抑制効果が認められた場合、*In vitro* 実験を用いてより詳細なメカニズムの検討を行う。

一方、*In vivo* 実験で SLN 欠失に対する筋萎縮抑制効果が認められた場合下記の実験に移行する。

*In vitro* 実験で重力除負荷が筋芽細胞内  $Ca^{2+}$ 動態、筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討する。

### 4. 研究成果

SLN KO マウスを用いて SLN 欠失が筋萎縮に及ぼす影響を検討したが、SLN KO マウスの筋萎縮抑制効果は遅筋のヒラメ筋では若干認められるが、その程度は小さく、速筋の前脛骨筋では全く認められなかった。このことは、SLN は calcineurin を介して筋肥大に関わるという報告や SLN を欠失すると筋の再生が遅延するという報告と一致する。即ち、SLN 欠失は SERCA 機能を改善させる一方で、SLN は筋の恒常性維持にも関わるため、SLN の発現を抑制すると骨格筋の恒常性が損なわれる。そこで、SLN +/- マウスを用いて同様の検討を行ったが、それでも筋萎縮抑制効果は認められなかった。

しかし、この結果は SLN を介した細胞内  $Ca^{2+}$ 動態の制御が筋萎縮抑制効果に影響を及ぼさないことが明らかとなっただけで、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度と筋の恒常性との関係を明らかにできなかったわけではない。そこで、

*In vitro* 実験で重力除負荷が筋芽細胞内  $Ca^{2+}$ 動態、筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討することとした。

先行研究により筋管に対する模擬微小重力の影響により筋管サイズが減少すること、酸化ストレス応答が増加すること、筋分化能が損なわれることなどがあきらかとなっている。一方で、筋の増殖に及ぼす微小重力環境の影響はほとんど明らかとなっていない。また、模擬微小重力が細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度に及ぼす影響に関する検討もそれほど多くはなく、微小重力下で筋管細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度が有意に減少するという報告があるのみで、微小重力下で増殖中の筋芽細胞における細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を直接検討した報告はまだない。

そこで、重力除負荷が筋芽細胞内  $Ca^{2+}$ 動態、筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討することとした。

#### -1 微小重力環境が細胞増殖、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度へ及ぼす影響

骨格筋細胞の細胞株である C2C12 細胞を微小重力装置の Gravite®を用いて培養したところ、地上 1G 環境での培養と比較して微小重力環境曝露 16 時間後には細胞増殖が抑制され、同様の傾向は 48 時間後でも継続していた。また、同様のタイムコースで細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を計測したところ、細胞数と同様に微小重力環境曝露 16 時間から 48 時間で 1G 培養群と比べて微小重力環境曝

露群で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の低下が認められた。以上より、微小重力環境により惹起された細胞増殖能の低下に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が関与している可能性が示唆された。

#### -2 細胞増殖と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度との関係

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が細胞増殖に影響を与えるのかを確認するために 1G 環境培養液に  $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤の BAPTA-AM を添加したところ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は減少し、細胞増殖能も低下した。また、細胞培養液の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を増加 (通常の 1.2 倍) させ微小重力環境で培養すると通常  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の細胞培養液で培養した時よりも細胞増殖の抑制が阻害され、1G 条件下で培養した時と同程度の細胞増殖能を示した。以上より、細胞増殖には、ある一定量の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が必要であり、微小重力環境による細胞増殖抑制は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の減少が主な原因である事が示された。

#### -3 微小重力環境により細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を減少させる原因分子の探索

細胞膜や筋小胞体膜上にある細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させ得る分子の遺伝子発現を網羅的に検討した結果、微小重力環境において特に細胞膜上の機械感受性  $\text{Ca}^{2+}$ 関連分子 (TRPC1, TRPM7, Piezo1, Piezo2) の発現が微小重力環境曝露 48 時間で有意に減少していることが明らかとなった。そこで、実際にこれら分子がこの微小重力が惹起する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度減少に関与するかを明らかにするため、機械感受性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性を非特異的に阻害する薬剤 (GsMTx4) を用いて検討を行った。その結果、GsMTx4 を培養液に加えると微小重力環境では細胞増殖能に影響を与えないものの、1G 培養細胞に対しては培養開始 24 時間時点で有意な細胞増殖抑制効果が認められた。このことは、微小重力環境により機械感受性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性が抑制されていることが示唆された。また、Piezo1 の特異的な活性化剤を用いたところ、微小重力環境下によける細胞増殖抑制が部分的に改善したことから、微小重力環境下では Piezo 1 の活性・発現抑制が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を減少させ、細胞増殖能を抑制していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Tanihata Jun, Minamisawa Susumu	4. 巻 18
2. 論文標題 Urinary titin is not an early biomarker of skeletal muscle atrophy induced by muscle denervation in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0289185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0289185	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 Hiramuki Yosuke, Abe Satoshi, Uno Narumi, Kazuki Kanako, Takata Shuta, Miyamoto Hitomaru, Takayama Haruka, Morimoto Kayoko, Takehara Shoko, Osaki Mitsuhiro, Tanihata Jun, Takeda Shin'ichi, Tomizuka Kazuma, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Full-length human dystrophin on human artificial chromosome compensates for mouse dystrophin deficiency in a Duchenne muscular dystrophy mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-31481-3	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 Hiramuki Yosuke, Abe Satoshi, Uno Narumi, Kazuki Kanako, Takata Shuta, Miyamoto Hitomaru, Takayama Haruka, Morimoto Kayoko, Takehara Shoko, Osaki Mitsuhiro, Tanihata Jun, Takeda Shin'ichi, Tomizuka Kazuma, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Full-length human dystrophin on human artificial chromosome compensates for mouse dystrophin deficiency in a Duchenne muscular dystrophy mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-31481-3	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 Ito A, Hashimoto M, Tanihata J, Matsubayashi S, Sasaki R, Fujimoto S, Kawamoto H, Hosaka Y, Ichikawa A, Kadota T, Fujita Y, Takekoshi D, Ito S, Minagawa S, Numata T, Hara H, Matsuoka T, Udaka J, Araya J, Saito M, Kuwano K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of Parkin mediated mitophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease related sarcopenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	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/jcsm.12988	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 Okada R, Fujita SI, Suzuki R, Hayashi T, Tsubouchi H, Kato C, Sadaki S, Kanai M, Fuseya S, Inoue Y, Jeon H, Hamada M, Kuno A, Ishii A, Tamaoka A, Tanihata J, Ito N, Shiba D, Shirakawa M, Muratani M, Kudo T, Takahashi S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome analysis of gravitational effects on mouse skeletal muscles under microgravity and artificial 1 g onboard environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88392-4	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 Matsuzaka Yasunari, Tanihata Jun, Ooshima Yoshiko, Yamada Daisuke, Sekiguchi Masayuki, Miyatake Shouta, Aoki Yoshitsugu, Terumitsu Mika, Yashiro Ryu, Komaki Hirofumi, Ishiyama Akihiko, Oya Yasushi, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Takeda Shin'ichi, Hashido Kazuo	4. 巻 18
2. 論文標題 The nSMase2/Smpd3 gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in mdx mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medicine	6. 最初と最後の頁 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12916-020-01805-5	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 該当する

1. 著者名 Senoo Nanami, Miyoshi Noriyuki, Kobayashi Eri, Morita Akihito, Tanihata Jun, Takeda Shin'ichi, Miura Shinji	4. 巻 62
2. 論文標題 Glycerophospholipid profile alterations are associated with murine muscle wasting phenotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 413 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.26993	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 Tanihata Jun, Fujii Teruyuki, Baba Shunsuke, Fujimoto Yoshitaka, Morimoto Sachio, Minamisawa Susumu	4. 巻 89
2. 論文標題 Troponin T amino acid mutation ( K210) knock-in mice as a neonatal dilated cardiomyopathy model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 846 ~ 857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-020-1016-1	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 Nogami Ken' ichiro, Maruyama Yusuke, Elhussieny Ahmed, Sakai-Takemura Fusako, Tanihata Jun, Kira Jun-ichi, Miyagoe-Suzuki Yuko, Takeda Shin' ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 iNOS is not responsible for RyR1 S-nitrosylation in mdx mice with truncated dystrophin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-03501-0	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 van Westering Tirsa L.E., Johansson Henrik J., Hanson Britt, Coenen-Stass Anna M.L., Lomonosova Yulia, Tanihata Jun, Motohashi Norio, Yokota Toshifumi, Takeda Shin'ichi, Lehti? Janne, Wood Matthew J.A., EL Andaloussi Samir, Aoki Yoshitsugu, Roberts Thomas C.	4. 巻 19
2. 論文標題 Mutation-independent Proteomic Signatures of Pathological Progression in Murine Models of Duchenne Muscular Dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 2047 ~ 2068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA120.002345	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 該当する

1. 著者名 Yamada Yuki, Kusakari Yoichiro, Akaoka Munetoshi, Watanabe Masato, Tanihata Jun, Nishioka Naritomo, Bochimoto Hiroki, Akaike Toru, Tachibana Toshiaki, Minamisawa Susumu	4. 巻 130
2. 論文標題 Thiamine treatment preserves cardiac function against ischemia injury via maintaining mitochondrial size and ATP levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00578.2020	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 Sugihara Hidetoshi, Kimura Koichi, Yamanouchi Keitaro, Teramoto Naomi, Okano Tomoko, Daimon Masao, Morita Hiroyuki, Takenaka Katsu, Shiga Takanori, Tanihata Jun, Aoki Yoshitsugu, Inoue-Nagamura Tokiko, Yotsuyanagi Hiroshi, Komuro Issei	4. 巻 61
2. 論文標題 Age-Dependent Echocardiographic and Pathologic Findings in a Rat Model with Duchenne Muscular Dystrophy Generated by CRISPR/Cas9 Genome Editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1279 ~ 1284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-372	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 市原彩夏, 谷端 淳、榎木裕紀, 松元一明, 南沢 享
2. 発表標題 微小重力は細胞内カルシウム濃度の低下を介して細胞増殖を抑制する
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 細川元靖、飯田 慶、谷端 淳、武田伸一、萩原正敏、武内章英
2. 発表標題 Sfpq-K0-マウスをモデルとした骨格筋エネルギー代謝-筋量制御連関及び、SFPQによる長鎖遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 第8回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市原彩夏, 谷端 淳、榎木裕紀, 松元一明, 南沢 享
2. 発表標題 模擬微小重力曝露による筋細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度低下が筋芽細胞増殖に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ichihara A, Tanihata J, Enoki Y, Matsumoto K, Minamisawa S
2. 発表標題 Relationship between microgravity and myoblast proliferation.
3. 学会等名 The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市原彩夏, 谷端 淳、南沢 享
2. 発表標題 微小重力環境は筋芽細胞の増殖を抑制するか.
3. 学会等名 筋生理の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷端 淳
2. 発表標題 “骨格筋量はどのように制御されているのか？”骨格筋量維持のための一考察-テストステロンに着目して-
3. 学会等名 第22回日本メンズヘルス医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ito A, Hashimoto M, Tanihata J, Matsubayashi S, Sasaki R, Fujimoto S, Kawamoto H, Hosaka Y, Ichikawa A, Kadota T, Fujita Y, Takekoshi D, Ito S, Minagawa S, Numata T, Hara H, Matsuoka T, Udaka J, Araya J, Saito M, Kuwano K
2. 発表標題 Involvement of Parkin-mediated mitophagy in the pathogenesis of COPD-related sarcopenia.
3. 学会等名 International Conference, American Thoracic Society Journal. (国際学会)
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	南沢 享  (Minamisawa Susumu)  (40257332)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	

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	暮地本 宙己  (Bochimoto Hiroki)  (60632841)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師     (32651)	

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