

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K17509  
研究課題名（和文）骨格筋代謝を調節する遺伝子発現制御ネットワークの解明：運動模倣薬実現に向けて

研究課題名（英文）Elucidation of Gene Expression Regulatory Networks in Skeletal Muscle Metabolism: Toward the Creation of Exercise Mimetic Drugs

研究代表者  
細川 元靖（Hosokawa, Motoyasu）  
愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60812683  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、より安全な運動模倣薬の標的を見出すために、骨格筋の代謝活性化機構を転写・転写後制御レベルで包括的に理解することを目的に行った。そのために同週齢のマウスに、1. 運動、2. 外気温変化、3. 高脂肪食給餌：高脂肪食給餌は野生型マウスだけでなく、代謝異常と筋量減少を呈する骨格筋特異的Sfpq-KOマウスへの高脂肪食給餌、以上3種の刺激により代謝変化を生じさせたマウスの骨格筋のRNA-seqデータを取得した。これらのトランスクリプトーム比較解析を進め、運動模倣薬の標的探索のためのモデル解析系の確立といくつかの代謝活性化の候補パスウェイを同定した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにされたことや、確立した筋代謝活性化-筋量変化解析のモデル系はより安全な運動模倣薬の標的探しに有用である。運動模倣の実現により骨格筋代謝を人為的に活性化することが可能になれば、肥満や糖尿病などの生活習慣病の治療・予防薬の開発、さらには加齢に伴う筋力・筋量の低下（サルコペニア）や筋量減少を伴う各種疾患でも筋代謝の異常が問題視されているので、それらの治療や予防にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to comprehensively reveal the mechanisms of metabolic activation in skeletal muscle at the transcriptional and post-transcriptional regulatory levels in order to identify the targets of safer exercise-mimetic drugs. For this purpose, RNA-seq data were obtained from skeletal muscle of age-matched mice that had undergone metabolic changes by three different stimuli: 1. exercise, 2. ambient temperature change, 3. high-fat diet, and high-fat diet fed not only to wild-type mice but also to skeletal muscle-specific Sfpq-KO mice with metabolic abnormalities and decreased muscle mass. Transcriptome comparative analysis for these data led to establish a model analysis system to search for targets of exercise-mimetic drugs, and identify several candidate pathways of metabolic activation.

研究分野：骨格筋RNA制御学

キーワード：骨格筋代謝 筋量制御 高脂肪食 トランスクリプトーム比較 運動模倣 RNA結合タンパク質 遺伝子発現制御

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、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動器であると同時にグルコース消費の最大の臓器であり、その代謝が運動などにより活性化することを応用して、肥満や糖尿病などの生活習慣病の治療・予防を目的とした運動模倣薬の標的組織として注目されている。また、筋代謝の活性と筋量の関係も注目されており、加齢に伴う筋力・筋量の低下（サルコペニア）や筋量減少を伴う各種疾患の原因・治療標的としての研究も注目され始めている。これまでに、キナーゼや転写因子の活性化剤が運動模倣薬として考案されているが、思わぬ代償的経路の活性化・副産物の生成を引き起こすなど副作用が問題となり、運動模倣薬は動物実験レベルにとどまっている (Fan W, et al., *Cell Metab*, 2017)。このように、骨格筋代謝を人為的に制御するには、その制御遺伝子の遺伝子発現機構は未だ十分に理解されていない。また、シグナル伝達から転写因子の活性化までがこれまでの研究の中心として進んできたので、特に RNA 制御の知見は不足している。

### 2. 研究の目的

本研究は、運動などにおける骨格筋代謝の活性化に伴う遺伝子発現制御を転写から転写後の RNA 制御まで包括的に明らかにすることにより、骨格筋代謝の未知の制御因子、制御機構を発見することを目的としている。

### 3. 研究の方法

骨格筋代謝に関連する遺伝子発現制御を転写から転写後 RNA 制御まで包括的に解明することを目的として、それに関連する因子・パスウェイの候補を抽出し、実際に細胞内で制御に関わっているかを検証するために以下のような解析を行った。

(1) 筋代謝が活性化され、代謝遺伝子の発現が変わるような状況での骨格筋 RNA-seq データの取得

(2) 取得した RNA-seq データを利用したトランスクリプトーム比較による筋代謝制御パスウェイ・遺伝子の抽出

(3) 機能欠失実験による代謝制御遺伝子の同定

(1) 筋代謝が活性化され、代謝遺伝子の発現が変わるような状況での骨格筋 RNA-seq データの取得

運動・食餌・寒冷刺激という3種の筋代謝変化が起きるような刺激を与え、マウスの腓腹筋を採材、RNA 抽出、RNA-seq 解析を行い、様々な筋代謝変化時のトランスクリプトームデータを取得した。運動はトレッドミルによる強制走行、寒冷刺激は4°Cで放置、食餌は高脂肪食(HFD)を食べさせた後の骨格筋のトランスクリプトーム変化を解析した。野生型マウスだけでなく、代謝性ミオパチーとシビアな筋量減少を呈する SFPQ という RNA 結合タンパク質の骨格筋特異的 KO マウス (*Sfpq*-KO マウス)へも HFD を食餌させ、筋量への影響を確認後、RNA-seq データを取得した。強制走行は代謝変化のマーカーとして利用している PGC1 $\alpha$  の発現を指標に採材までのタイムコースや運動強度などの条件検討を行い、最も PGC1 $\alpha$  の発現変化の大きい条件の RNA-seq データを取得した。

(2) 取得した RNA-seq データを利用したトランスクリプトーム比較による筋代謝制御パスウェイ・遺伝子の抽出

上記で取得したデータからトランスクリプトーム比較を行った。具体的には、①代謝変化時に共通して発現変動のあった遺伝子の抽出、②パスウェイエンリッチメント解析、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を利用した筋代謝と筋量を結ぶ新たな遺伝子やパスウェイの同定、③遺伝子発現制御因子、特に RNA 結合タンパク質で代謝変化により発現の上昇する遺伝子を抽出、以上の3つの解析を行うことで筋代謝制御パスウェイ・遺伝子の候補を抽出した。

(3) 機能欠失実験による代謝制御遺伝子の同定

候補遺伝子の機能欠損(ノックダウン)を培養細胞で行い、遺伝子発現変化やフラックスアナライザーによる細胞内ミトコンドリア活性を解析した。

各解析において、筋の代謝制御に重要な転写制御因子である PGC1 $\alpha$  の発現量や Isoform 変化に注目し、PGC1 $\alpha$  の発現や Isoform の切り替えに関与している因子は他の代謝制御因子の発現も調整しているという仮説の基、代謝変化のマーカーとして使用した。

### 4. 研究成果

## (1) トランスクリプトーム比較解析により明らかになったこと

マウスの運動後(トレッドミルによる強制走行後)の遺伝子発現変化データはこれまでも取得されてきたが、今回はこれまでの私たちの解析の中で、代謝遺伝子の発現異常をもつ *Sfpq*-KO マウスの筋量減少を始めとする表現型が最も顕著に現れ始める時期である4週齢前後(成長期)を解析ポイントとして設定し、全ての解析を同週齢、同じ部位の骨格筋から RNA を抽出することにより、余計なバイアスを排除したトランスクリプトーム比較を可能にした。

HFD を食餌させたマウスの骨格筋は脂質代謝系やミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇などが見られ、運動後におきる現象とオーバーラップする部分もあり、有用なデータとなった。しかし、遺伝子発現変化が小さく、今回の摂食期間では筋量への影響もほとんど見られなかったことから、さらに大きく代謝遺伝子の変化が起きることを予想し、代謝性ミオパチーとシビアな筋量減少を呈する *Sfpq*-KO マウスへ HFD を食餌させ、そのトランスクリプトーム変化も解析した。HFD を食餌した *Sfpq*-KO マウスは4週齢において、Control マウスと同程度まで筋量の回復が見られ、筋代謝変化に加え、筋量変化も起きるモデルとして、トランスクリプトーム比較に加えた。

トランスクリプトーム比較の際、まずは本研究でマーカーとしている PGC1 $\alpha$  の発現変動、Isoform 変化を確認した。Cold exposure や HFD 食餌では代謝遺伝子発現変化は見られたが、PGC1 $\alpha$  の発現は変化しなかった。しかし、*Sfpq*-KO マウスに HFD を食餌させた時には、運動と同様に大きく PGC1 $\alpha$  の発現が上がった。また、この時の発現上昇は通常骨格筋で発現している Isoform とは違う Isoform の発現が上昇していた(図1)。この結果からも、この PGC1 $\alpha$  の別 Isoform の発現上昇は筋代謝の活性化だけでなく、筋量変化を伴うような筋代謝活性化時に発現が上がることを示唆され、今後、運動模倣薬の標的を見つけるための制御因子の評価をする際のマーカーとして利用できることが示唆された。上記のような特徴が見られたために、詳細に HFD を食餌させた *Sfpq*-KO マウスと運動のトランスクリプトーム比較を行ったところ、これら二つはトランスクリプトームレベルで遺伝子発現変化が相関することが GSEA により明らかになり、*Sfpq*-KO マウスに HFD 食餌は、運動模倣のモデルとなることが示唆された(図2)。さらに共通して発現変化しているパスウェイを解析したところ、筋代謝に重要な PPAR signaling pathway 関連因子の発現増加・筋の発生に重要なパスウェイの発現増加などが共通していることが明らかとなった。

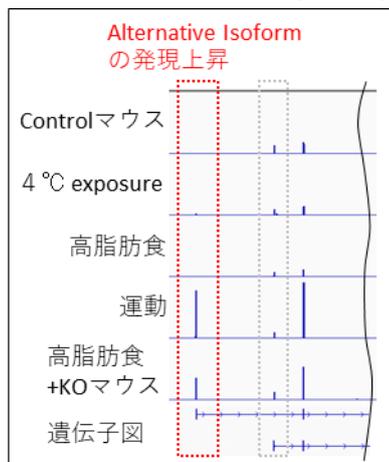


図1. PGC1 $\alpha$  Alternative Isoform の発現上昇

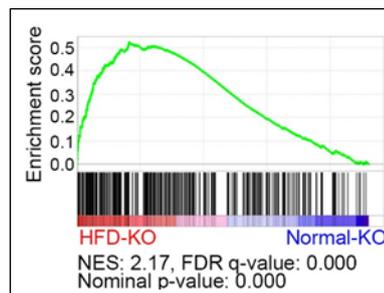


図2. *Sfpq*-KOマウス+HFDと運動の遺伝子発現変化の相関性

## (2) 機能欠損アッセイによる筋代謝制御候補遺伝子の解析

*Sfpq*-KO マウスに HFD 給餌実験が筋代謝と筋量の関連性を探るための解析モデルになりうることを示されたので、SFPQ の制御標的代謝経路について、改めて解析を行った。先行研究では、KO マウスから樹立した Primary myoblast を使用して、様々な代謝関連遺伝子が制御標的であることは明らかにしたが、KO マウスの骨格筋のトランスクリプトーム解析を

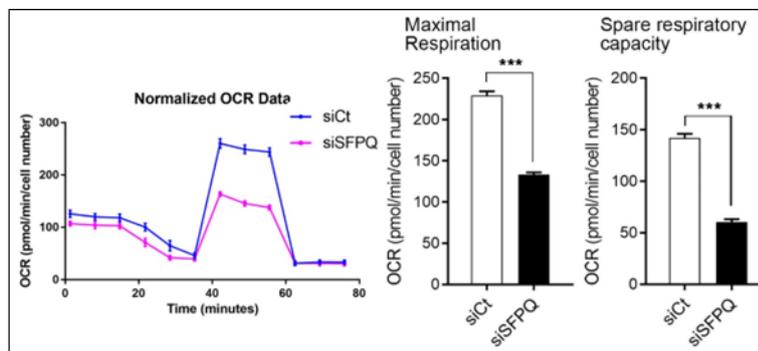


図3. フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸能の評価

行うことにより、代謝の経路の中で、どの代謝を積極的に制御しているかを解析した。その結果、代謝経路の中でもミトコンドリア関連の遺伝子群の発現減少が顕著であることが分かった。そこで、筋系の培養細胞を用いて、SFPQ 欠損によるミトコンドリア呼吸能を測定したところ、SFPQ 欠損によりミトコンドリアの呼吸能が減少していることが明らかになった(図3)。SFPQ が筋代謝の中でもミトコンドリアを中心に制御していることが示唆されたので、これまでの解

析から抽出した遺伝子に加え、最近、別プロジェクトで行った SFPQ の網羅的相互作用因子解析の結果からも筋代謝・筋量の制御因子を探していく方針を追加することができた。

以上に記載したことから抽出した遺伝子に過去の文献の情報を基に抽出した遺伝子を加えた RNA 結合タンパク質や遺伝子発現制御因子を筋代謝制御候補因子とし、siRNA を準備、ノックダウン実験を行っている。現在、条件検討や解析を進めている最中であるが、いくつかの RNA 結合タンパク質については、マウス筋芽細胞である C2C12 を用いて、筋分化とともに行ったノックダウンにおいて、PGC1 $\alpha$  の発現が変化する RBP を同定している (図 4)。

当初の計画に加え、さらに多くの代謝変化時におけるトランスクリプトームデータを取得し、筋代謝活性化-筋量制御関連のモデル系の確立、いくつかの新規制御遺伝子・経路の同定を行った。本結果を基にさらに研究を進めることで、より安全な運動模倣薬を開発できる標的が見つかることが期待される。

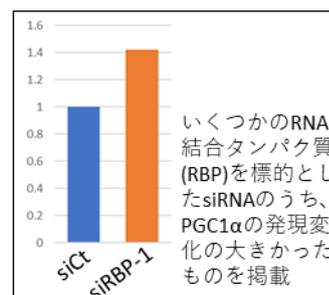


図 4. 分化後筋芽細胞でのノックダウン実験における PGC1 $\alpha$  の発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 3件）

1. 著者名 Mariko Okubo, Satoru Noguchi, Tomonari Awaya, Motoyasu Hosokawa, Masatoshi Hagiwara, Katsuhisa Ogata, Ichizo Nishino., et al.	4. 巻 142
2. 論文標題 RNA-seq analysis, targeted long-read sequencing and in silico prediction to unravel pathogenic intronic events and complicated splicing abnormalities in dystrophinopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 59-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-022-02485-2	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 Eisho Kanemitsu, Xiangdong Zhao, Keiko Iwaisako, Asuka Inoue, Akihide Takeuchi, Shintaro Yagi, Hidetoshi Masumoto, Hiroaki Ohara, Motoyasu Hosokawa, Tomonari Awaya, Junken Aoki, Etsuro Hatano, Shinji Uemoto, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 255
2. 論文標題 Antagonist of sphingosine 1-phosphate receptor 3 reduces cold injury of rat donor hearts for transplantation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational research	6. 最初と最後の頁 26-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trsl.2022.11.003	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 細川 元靖, 萩原 正敏	4. 巻 72
2. 論文標題 RNA制御機構の解析で明らかとなるRNA病の病態解明と新規治療法開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 577-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hiroaki Ohara, Motoyasu Hosokawa, Tomonari Awaya, Atsuko Hagiwara, Ryo Kurosawa, Yukiya Sako, Megumu Ogawa, Masashi Ogasawara, Satoru Noguchi, Yuichi Goto, Ryosuke Takahashi, Ichizo Nishino, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 33
2. 論文標題 Branchpoints as potential targets of exon-skipping therapies for genetic disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy-Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 404-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2023.07.011	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 Motoyasu Hosokawa, Ryuta Mikawa, Atsuko Hagiwara, Yukiko Okuno, Tomonari Awaya, Yuki Yamamoto, Senye Takahashi, Haruka Yamaki, Mitsujiro Osawa, Yasuhiro Setoguchi, Megumu K Saito, Shinji Abe, Toyohiro Hirai, Shimpei Gotoh, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 26
2. 論文標題 Cryptotanshinone is a candidate therapeutic agent for interstitial lung disease associated with a BRICHOS-domain mutation of SFTPC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107731	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

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 筋エネルギー代謝制御-筋量制御連関の解析モデルの作成
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023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 筋エネルギー代謝制御-筋量制御連関の解析モデルの作成
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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 Takeuchi Akihide, Motoyasu Hosokawa, Masayoshi Kamon, Koshi Imami
2. 発表標題 Deciphering the RNA-binding protein dependent crosstalk in Multi-Dimensional gene regulation
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武内 章英、細川 元靖、加門 正義、今見 考志、川上 良介、今村 健志
2. 発表標題 RNA結合タンパク質依存性の高次遺伝子発現クロストーク制御機構の解明
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武内 章英、細川 元靖、加門 正義、今見 考志、川上 良介、今村 健志
2. 発表標題 神経細胞におけるRNA結合タンパク質複合体による高次遺伝子発現制御機構と、その破綻により発症する神経発生異常、神経変性疾患、精神疾患の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023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
---------	---------