

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21769

研究課題名（和文）骨格筋萎縮耐性を獲得させる冬眠誘導性生理活性物質の探索

研究課題名（英文）Hibernation-induced bioactive molecules that contribute resistance to skeletal muscle atrophy

研究代表者

宮崎 充功（Miyazaki, Mitsunori）

広島大学・医系科学研究科（保）・准教授

研究者番号：20632467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで、冬眠動物であるツキノワグマを対象とした検討の結果、冬眠中のクマにおける骨格筋の廃用性変化は、ヒトを含むその他の動物種に比較して極めて限定的であること（PLOS ONE 2019）、冬眠中のクマの骨格筋細胞では、筋肉を構成するタンパク質の合成・分解の制御系の両者ともに顕著に抑制される「省エネモード」にあること（Sci Rep 2022）などを報告した。さらには、実験的に採取したクマ血清をヒト骨格筋培養細胞に添加するという *in vitro* の解析系を用いて、冬眠期クマ血清により骨格筋タンパク質代謝が正に制御されることを明らかとした（PLOS ONE 2022）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬眠動物は、生命維持のために一定程度のエネルギー代謝を維持しながら長期間の不活動・栄養不良を経験し、それでもなお筋肉がほとんど衰えないという、不思議な形質を備えている。本研究により、冬眠期のクマ骨格筋では筋肉を「省エネモード」に変化させることで筋タンパク質代謝を下げ、結果として筋肉量を維持させているということ、冬眠期のクマ血清には筋タンパク質代謝を正に制御する機能が存在することなどが明らかとなった。冬眠動物が有する「使わなくても衰えない筋肉」という未解明の仕組みを明らかにすることで、最終的にはヒトの寝たきり防止や効果的なリハビリテーション手法の開発などが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have reported in our research project on the hibernating black bear that disuse-induced loss of skeletal muscle mass in hibernating bears are very limited compared to other animal species, including human subjects (Miyazaki et al., PLOS ONE 2019). We have also reported that skeletal muscle of hibernating bears is under an "energy-saving mode" in which both the regulatory systems for protein synthesis and degradation that make up muscles are markedly suppressed (Miyazaki et al., Sci Rep 2022). Furthermore, using an *in vitro* analysis system in which experimentally collected bear serum was supplemented to cultured human skeletal muscle cells, we showed that skeletal muscle protein metabolism is positively regulated by hibernating bear serum (Miyazaki et al., PLOS ONE 2022).

研究分野：運動生理学

キーワード：冬眠 骨格筋 タンパク質合成 タンパク質分解 サルコペニア 筋萎縮

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋はヒト身体重量の40%程度を占め、立つ・歩くといった身体運動に必要な力発揮のみならず、エネルギー代謝や熱産生、内分泌器官としての機能など、ヒトの身体機能を制御する最も重要な組織の1つである。骨格筋量の増加(筋肥大)や減少(筋萎縮)といった組織全体の量的変化は、筋細胞内におけるタンパク質の合成・分解の代謝バランスによって規定される(Moriya and Miyazaki, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018)。つまり骨格筋量を維持するためには、「筋細胞内のタンパク質合成量がタンパク質分解量を上回った状態」を保つことが必須であると定義することが出来る。

(2) 冬眠動物にとって「冬眠」は、食物不足や低温といった冬期環境を生き抜くための生存戦略である。驚くべきことに、5-6ヶ月におよぶ不活動状態にも関わらず、冬眠動物の筋肉量や筋力は極めてよく保存される(Harlow et al., *Nature* 2001)。また我々はこれまで、冬眠動物であるツキノワグマでは、冬眠に伴う骨格筋タンパク質代謝の変化が筋量維持に貢献する可能性を報告してきた(Miyazaki et al., *PLOS ONE* 2019)。一方、たとえ冬眠動物であっても、夏季に筋活動量を制限されると筋重量は大きく減少する(Lin et al., *J Exp Biol* 2012)。つまり冬眠動物における骨格筋萎縮耐性とは、冬眠に伴い誘導される何らかの因子が骨格筋タンパク質代謝に影響を与えることで達成される可能性が極めて高い。

2. 研究の目的

(1) 冬眠動物であるツキノワグマを対象とした検討の結果、冬眠中のクマにおける骨格筋の廃用性変化は、ヒトを含むその他の動物種に比較して極めて限定的であることを報告してきた(Miyazaki et al., *PLOS ONE* 2019)。その一方で、ツキノワグマの骨格筋にどのような適応変化が生じることで筋肉の衰えを防いでいるのか、その詳細は全く解明されていない。活動期・冬眠期におけるツキノワグマ骨格筋を採取し、比較分析することで、冬眠に伴う適応変化の詳細を明らかにすることを目的とした。

(2) また我々は予備的検討として、冬眠期に採取したクマ血清をヒト骨格筋培養細胞に添加したところ、活動期血清に比較して有意な筋タンパク質量の増加を確認した。これは、クマ血清中には冬眠誘導性に分泌される生理活性物質が存在し、骨格筋タンパク質代謝を正に制御する可能性を強く示唆している。そこで本研究では、クマ血清中に存在する冬眠誘導性の生理活性物質の探索とその機能解析、さらには筋萎縮抵抗性を保障するための十分性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ツキノワグマの飼養、および生体組織・血液サンプルの採取

本研究には、秋田県に所在する北秋田市くまぐま園にて飼養されているツキノワグマ(雌、6-23歳までの成獣、非妊娠)を用いた。サンプリングに際しては、塩酸ゾラゼパム/塩酸チレタミン混合薬(麻酔薬)およびメデトミジン(鎮静薬)投与による麻酔導入および動物身体の拘束(不動化)処置の後、内頸静脈からの採血および大腿四頭筋からの筋バイオプシーを行った。ツキノワグマへの麻酔および外科的処置は、全て獣医師の資格を有する研究分担者の管理下において実施した。サンプリングの時期は活動期(7月-8月)および冬眠期(1月-2月)とし、それぞれの季節において同一個体(n=8)から採材した。

(2) クマ血清添加によるヒト骨格筋培養細胞におけるタンパク質代謝制御機構の解析

ヒト骨格筋培養細胞にはHuman Skeletal Muscle Myoblasts (LONZA #CC-2580)を使用し、10%ウシ胎児血清を含む増殖培地にて4日間増殖させたのち、2%ウマ血清を含む分化培地にて5日間の分化誘導を行った。筋管細胞への十分な分化が認められた後、5%クマ血清(活動期/冬眠期)を添加した培地にて24時間の培養を行い、その後の解析に使用した。5%ウマ血清を添加した培地をリファレンスとして採用し、筋細胞内タンパク質合成/分解活性の測定やWestern Blotによるシグナル伝達系解析を行った。

4. 研究成果

(1) 冬眠中のツキノワグマの骨格筋は全く衰えていない

冬眠期(2月下旬)ツキノワグマの片脚から大腿四頭筋を採取し、活動期(7月中旬)に同一個体の対側脚から採取した筋肉との比較分析を行ったところ、体重や骨格筋線維サイズ、遅筋・速筋線維のタイプ割合などに全く変化は認められなかった(Miyazaki et al., *Sci Rep* 2022)。骨格筋を採取した活動期(7月)および冬眠期(2月)は、それぞれツキノワグマの体重の増加期および減少期に相当するため単純な比較は難しいが(Hashimoto & Yasutake, 1999)、少なくともこの2点間を比較した場合、冬眠期のツキノワグマ骨格筋は活動期と比べて廃用性変化(骨格筋線維サイズ減少や速筋への線維タイプ移行)を全く示していない。

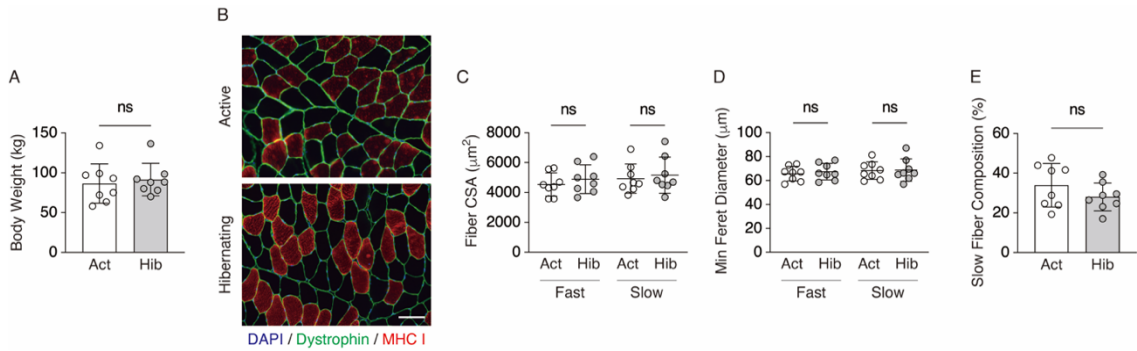


図1 活動期/冬眠期におけるツキノワグマの体重および骨格筋組織の形態特性. A: 体重、B: 筋線維横断面の免疫組織染色像 (赤色; 遅筋線維、黒色; 速筋線維、緑色; ジストロフィン)、C: 筋線維横断面積、D: 筋線維の短径、E: 遅筋線維の比率、活動期 (Act) と冬眠期 (Hib) を比較した場合、体重 (A) や筋線維の大きさ (B, C, D)、筋線維タイプの比率 (E) などに全く変化が認められない。

(2) タンパク質合成・分解制御系の両者とも、冬眠に伴い顕著に抑制される

筋タンパク質の合成制御系である Akt/mTOR 系や MEK/ERK 経路の活性化状態を測定したところ、冬眠期の骨格筋では顕著に抑制されていた。またタンパク質分解制御機構の指標となる Ub-Proteasome 系およびオートファジー系に関連する各因子の遺伝子発現量を測定したところ、こちらも冬眠期の骨格筋では大きく抑制されることが明らかとなった。つまり冬眠期のクマ骨格筋では、「タンパク質を作る」「タンパク質を壊す」という命令系統の両者ともに、顕著に抑制されていることになる。これは、長期の絶食を伴う冬眠期において、「省エネモード」に入ることによってエネルギーの無駄遣いを防ぎ、冬季環境を生き抜くための適応戦略であろうと考えられる。

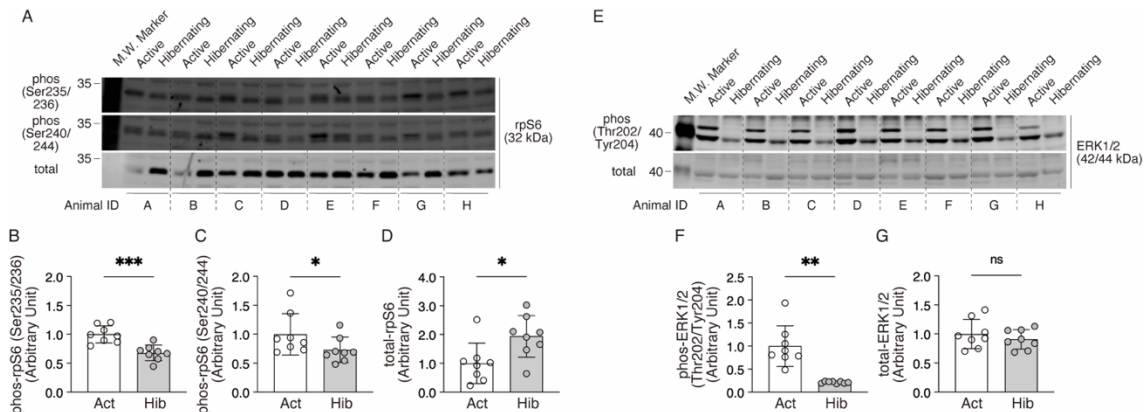


図2 骨格筋タンパク質合成を制御するシグナル伝達系の活性化状態の変化. (A-D) mTOR 経路の下流に存在する ribosomal protein S6 のリン酸化および総タンパク質量の変化、(E-G) ERK1/2 のリン酸化および総タンパク質量の変化、いずれの指標も活動期 (Act) に比較し、冬眠期 (Hib) の骨格筋において顕著に抑制される。

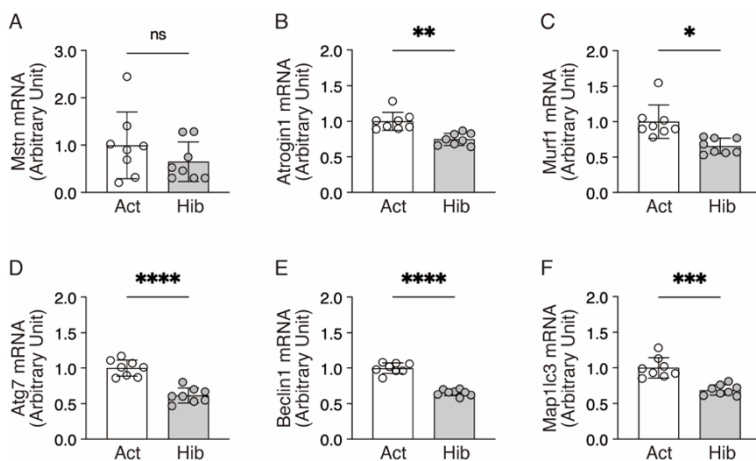


図3 骨格筋タンパク質分解系制御因子の遺伝子発現変化. 骨格筋タンパク質合成を制御するシグナル伝達系の活性化状態の変化骨格筋タンパク質分解系の制御因子のうち、Ub-Proteasome 系に含まれる Atrogin1 (B) や Murf1 (C)、オートファジー系に関連する各因子 (D-F) の遺伝子発現量の変化。いずれの指標も活動期 (Act) に比較し、冬眠期 (Hib) の骨格筋において顕著に遺伝子発現が抑制される。

(3) 冬眠期クマ血清の添加によりヒト骨格筋培養細胞の総タンパク質量が増加する

実験的に採取したツキノワグマ血清をヒト骨格筋培養細胞に添加するという *in vitro* の解析系を用いた検討を行ったところ、冬眠期クマ血清の添加により、骨格筋細胞における総タンパク質量が増加することを確認した。また冬眠期クマ血清の添加は、タンパク質合成系の制御系である Akt/mTOR 系の制御に関与する可能性があること、またタンパク質分解系因子の一つである MuRF1 の発現量を転写因子 FOXO3a の制御系を介して調節することなどを明らかにした。

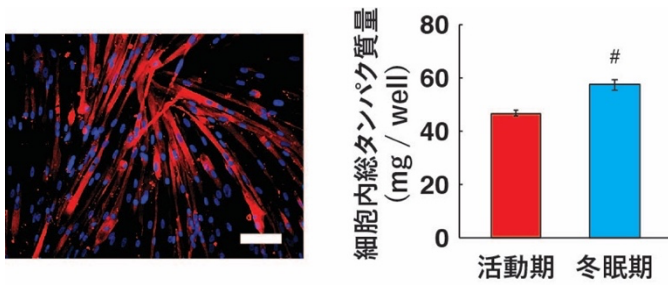


図4 冬眠期クマ血清の添加によるヒト骨格筋培養細胞の総タンパク質量の増加。分化したヒト骨格筋由来培養細胞、分化マーカーであるミオシン(筋タンパク質の一種)が赤く蛍光染色されている(左図)。冬眠期クマ血清を5%濃度で培地に添加すると、活動期血清に比較して筋肉を構成するタンパク質量が増加する(右図)。

(4) 冬眠誘導性生理活性物質の探索

冬眠期クマ血清の添加が骨格筋細胞の Akt/mTOR 系を活性化させること、転写因子 FOXO3a の制御を介して MuRF1 の発現量を調節する可能性が示されたことから、冬眠期クマ血清中に含まれる生理活性物質の候補因子としてインスリン様成長因子 1(IGF-1)の関与が考えられる。冬眠期クマ血清中の IGF-1 含有量を測定しところ、血清 IGF-1 濃度は、夏期活動期に比較し、冬眠期血清中で有意に上昇していた。しかし、血清タンパク質総量も増加しており、このタンパク質総量で IGF-1 濃度を補正したところ、有意差は認められていない。冬眠によって特異的に誘導される生理活性物質の探索は、その候補物質の機能解析を含め、引き続き検討している。

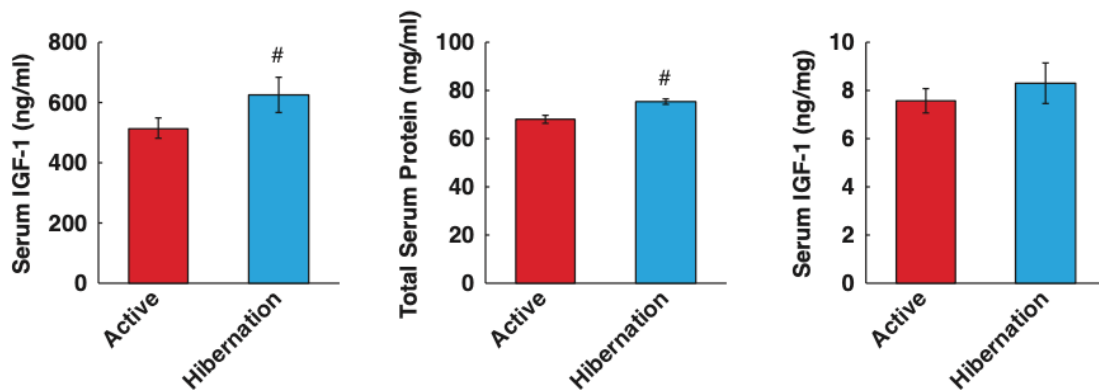


図5 クマ血清中の IGF-1 濃度と総タンパク質量。(A) ELISA アッセイによるクマ血清中の IGF-1 濃度の定量化。(B) クマ血清中の総タンパク質量の定量化。(C) IGF-1 濃度をクマ血清中の総タンパク質量で補正した場合、活動期・冬眠期に有意な変化は認められない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 宮崎 充功	4. 巻 81
2. 論文標題 ツキノワグマにおける冬眠期の筋肉量維持機構の探索	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 191 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/lowtemsci.81.191	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 Miyazaki Mitsunori, Shimozuru Michito, Kitaoka Yu, Takahashi Kenya, Tsubota Toshio	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation of protein and oxidative energy metabolism are down-regulated in the skeletal muscles of Asiatic black bears during hibernation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24251-0	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 Miyazaki Mitsunori, Shimozuru Michito, Tsubota Toshio	4. 巻 17
2. 論文標題 Supplementing cultured human myotubes with hibernating bear serum results in increased protein content by modulating Akt/FOXO3a signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263085	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 Kitaoka Yu, Miyazaki Mitsunori, Kikuchi Shin	4. 巻 9
2. 論文標題 Voluntary exercise prevents abnormal muscle mitochondrial morphology in cancer cachexia mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15016	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 Nishida Kazuhei, Shimozuru Michito, Okamatsu-Ogura Yuko, Miyazaki Mitsunori, Soma Tsukasa, Sashika Mariko, Tsubota Toshio	4. 巻 191
2. 論文標題 Changes in liver microRNA expression and their possible regulatory role in energy metabolism-related genes in hibernating black bears	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology B	6. 最初と最後の頁 397 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00360-020-01337-7	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 Klionsky Daniel J., Mitsunori Miyazaki., et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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 Miyazaki Mitsunori, Moriya Nobuki, Takemasa Tohru	4. 巻 8
2. 論文標題 Transient activation of mTORC1 signaling in skeletal muscle is independent of Akt1 regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14599	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 Sawamura Daisuke, Tanabe Yoshinobu, Sakuraba Satoshi, Cui Jiahong, Miura Hiroshi, Saito Ryuji, Sugi Masaaki, Watanabe Akihiro, Tokikuni Yukina, Sugawara Kazuhiro, Miyazaki Mitsunori, Miyamoto Reiko, Sakai Shinya	4. 巻 101
2. 論文標題 The impact of visual cross-modal conflict with semantic and nonsemantic distractors on working memory task: A functional near-infrared spectroscopy study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e30330 ~ e30330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000030330	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18件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsunori Miyazaki
2. 発表標題 Muscle Atrophy Resistance to Prolonged Physical Inactivity in Hibernating Animals
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物の骨格筋タンパク質代謝の制御機構と筋萎縮耐性の獲得
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 がん悪液質に伴う筋タンパク質合成抵抗性の分子機構
3. 学会等名 第86回日本体力医学会中国・四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎充功、下鶴倫人、坪田敏男
2. 発表標題 冬眠期クマ血清添加に伴う ヒト培養骨格筋細胞のタンパク質代謝制御機構の変化
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 がん悪液質による筋タンパク質合成抵抗性とmTORC1経路の機能不全
3. 学会等名 第29回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru, Toshio Tsubota
2. 発表標題 HIBERNATING BEAR SERUM LEADS TO INCREASED PROTEIN CONTENT IN HUMAN SKELETAL MUSCLE CELLS
3. 学会等名 International Hibernation Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 骨格筋の量的変化を制御する情報伝達機構とがん悪液質に伴う機能不全
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物における骨格筋萎縮耐性獲得機構の探索
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsunori Miyazaki
2. 発表標題 Biological Strategy for the Maintenance of Skeletal Muscle Mass
3. 学会等名 3rd Joint Muscle Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎充功、深澤楓
2. 発表標題 骨格筋衛生細胞の増殖機構におけるAkt1遺伝子の役割
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 がん悪液質に対する運動療法介入効果と骨格筋タンパク質代謝制御
3. 学会等名 第39回日本臨床運動療法学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsunori Miyazaki
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying anabolic resistance to muscle protein synthesis in cancer cachexia.
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsunori Miyazaki, Michito Shimozuru, Yu Kitaoka, Kenya Takahashi, Toshio Tsubota
2. 発表標題 Regulation of protein and oxidative energy metabolism are down-regulated in the skeletal muscles of Asiatic black bears during hibernation
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物における骨格筋量維持機構の探索
3. 学会等名 第9回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎充功、下鶴倫人、坪田敏男、北岡祐
2. 発表標題 ツキノワグマ骨格筋における冬眠に伴うタンパク質代謝制御機構の変化
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 シンポジウム7 がん悪液質に対する理学療法を基礎から臨床まで考える 「がん悪液質に対する運動療法効果に関する基礎研究」
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 寒冷暴露に伴うハムスター骨格筋の萎縮耐性プログラムの発現
3. 学会等名 第30回 日本運動生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠動物の筋肉はなぜ衰えないのだろう？
3. 学会等名 日本基礎理学療法学会 第6回若手研究者ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mitsunori Miyazaki	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 578
3. 書名 Physical Therapy and Research in Patients with Cancer	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【研究成果】冬眠期のツキノワグマ血清にはヒトの筋肉細胞量を増やす効果があることを発見 https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/69055</p> <p>【研究成果】ツキノワグマは冬眠期に筋肉を省エネモードに変化させることで筋肉の衰えを防止していることを発見 https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/74265</p>

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	坪田 敏男 (Tsubota Toshio) (10207441)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	下鶴 倫人 (Shimozuru Michito) (50507168)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

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