

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2022

課題番号：20KK0198

研究課題名（和文）運動と不動化による筋量とエネルギー代謝の制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the Mechanisms Controlling Muscle Mass and Energy Metabolism through Exercise and Immobilization

研究代表者

小川 渉（Wataru, Ogawa）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40294219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスにおいて不動化性筋萎縮の分子機構について解析した。その結果、KLF15を介した筋タンパク異化は、不動化による筋萎縮の重要な病理ステップであることが明らかとなった。不動化性筋萎縮の発症時にKLF15の下流で機能する因子を探索し、IL6を同定した。不動化性筋萎縮では、KLF15-IL6経路によるタンパク異化に続いて、骨格筋に炎症が生じて、更に筋萎縮が進展することを見出した。またこの炎症フェーズの進展にはケモカインCXCL10が重要な役割を担うことも明らかとした。骨格筋の β 2アドレナリン受容体シグナルは運動によるエネルギー代謝の亢進に重要な役割を果たすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では不動化の分子機構を制御する因子としてKLF15やIL6、CXCL10などの分子を同定した。いずれの分子もその機能を抑制することで不動化による筋萎縮が抑制されることから、これらの分子は不動化性筋萎縮の有用な創薬標的分子と考えられた。IL6及びCXCL10についてはその中和抗体が筋萎縮抑制効果をもつことを見出した点は意義が深い。これらの抗体はそれぞれ、ヒトに対して臨床応用、臨床試験が行われているため、今後、創薬展開に繋がる可能性は高い。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the molecular mechanisms of immobilization-induced muscle atrophy in mice. As a result, it became clear that muscle protein degradation mediated by KLF15 is a critical pathological step in muscle atrophy caused by immobilization. We sought factors functioning downstream of KLF15 during the onset of immobilization-induced muscle atrophy and identified IL6. In immobilization-induced muscle atrophy, we found that inflammation occurs in skeletal muscles following protein degradation via the KLF15-IL6 pathway, which further advances muscle atrophy. We also found that the chemokine CXCL10 plays a crucial role in the progression of this inflammatory phase. We have revealed that the β 2-adrenergic receptor signal in skeletal muscle plays a significant role in the enhancement of energy metabolism through exercise.

研究分野：代謝学

キーワード：運動 不動化 骨格筋量 サルコペニア 肥満

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは加齢に伴う骨格筋量の減少と身体活動力の低下に特徴付けられる病態であり、超高齢社会を迎えたわが国における健康寿命短縮の重要な原因である。一方、骨格筋は生体最大の糖処理能を持つ代謝制御臓器であり、筋量減少や身体活動の低下は様々な代謝異常症の原因となる。運動が生体における最重要な筋量増加刺激であり、身体活動低下や不動化が顕著な筋量減少を引き起こすことを踏まえると、運動や不動化による筋量制御のメカニズムを明らかにすることは、運動機能維持を通じた健康寿命の延伸に加え、代謝異常症の予防・治療法の開発にも大きく貢献する、重要な学術的課題といえる。

代表者は過去一貫して、糖尿病や糖尿病に伴う健康障害の発症機構に関する研究に従事してきた。糖尿病がサルコペニアの重要な促進要因の一つであることから、最近、糖尿病による筋量制御の分子機構について解析を行い、骨格筋では高血糖によってE3 コピキチンリガーゼ WWP1 の発現が減弱し、その結果、転写因子 KLF15 のコピキチン化による分解促進が抑制され、骨格筋タンパクの異化亢進が生じて筋減少に至るというメカニズムを明らかとした (JCI Insight. 2019;4(4):e124952.)。また、代表者らは、運動がどのようなメカニズムで筋量増加を促進するかについての解析も進めてきた。その結果、PI-3 キナーゼの下流で機能するタンパクキナーゼ PDK1 を骨格筋特異的に欠損したマウスでは、定常状態において骨格筋量の減少が生じるだけでなく、運動負荷による筋量増加も顕著に抑制されることを見出した。さらに、骨格筋特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) 欠損マウスの解析などを通じて、運動負荷によって筋量が増加する際には PDK1 の上流では $\beta 2$ アドレナリン受容体からのシグナルが重要な役割を果たすことも明らかとしている (Sci Rep. 2021 ;11:3447)。

2. 研究の目的

本研究では、代表者ら明らかとしてきた骨格筋量制御機構に関する知見をもとに筋増加薬や筋減少抑制薬の開発に繋がる知見を得ることを目指す。具体的には主にマウスモデルの解析を通じて筋量制御機構や運動によるエネルギー代謝制御機構について解析し、国際共同研究も活用して得られた知見の妥当性をヒトにおいて検証することを目的とする。

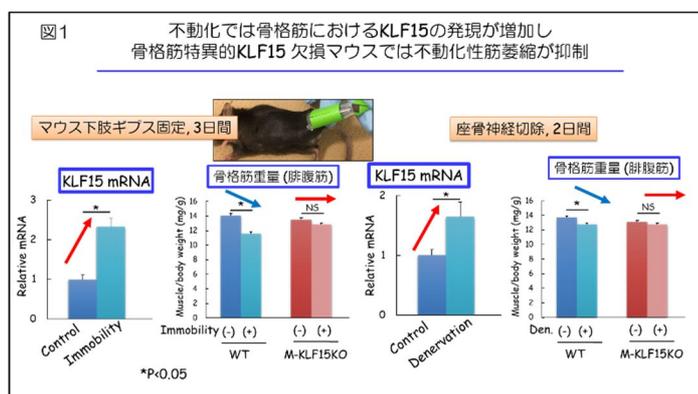
3. 研究の方法

骨格筋不動化実験は、C57BL/6 マウスの後脚をプラスチックチューブを用いたギプスで固定することによって、または、両後脚の運動神経の神経切除によって行った。機械刺激による筋肥大実験は協働筋切除法で行った。具体的には、C57BL/6 マウスの腸腰筋及びヒラメ筋を切除し、2週間後に代償性肥大が生じた足底筋を評価した。マウスで得られた知見のヒトにおける妥当性の検証は運動負荷刺激後の骨格筋生検試料、及びギプス固定による不動化筋生検試料を用いて行った。運動負荷刺激後の骨格筋生検試料は、国際共同研究によって Juleen Zierath 博士のヒト骨格筋データベースを用いた。また、骨折によってギプス固定を行った後に外科的固定術を行う例で固定術中に生検試料を得て、不動化筋生検試料とした。24 例のギプス固定患者 (固定期間 6.9 ± 3.5 日) 及 27 例の対象者の収集し、骨折部位(上肢または下肢) 及び年齢で傾向スコアマッチングを行い、患者 15 例、対象 18 例を抽出し、比較検討を行った。

4. 研究成果

【不動化性筋萎縮における KLF15 の役割】

マウスのギプス固定や運動神経切除による不動化処理により、ヒラメ筋や腸腰筋などの骨格筋量は3日以内に5-10%程度減少した。この時骨格筋では Foxo3a や Fbxo32、Trim63 などの筋萎縮関連遺伝子、Bnip3 などのオートファジー関連遺伝子、Alt2 や、Prodh、Tdo2、Bckdha などのタンパク・アミノ酸異化系遺伝子の発現が増強するとともに、転写因子 KLF15 の遺伝子・タンパク発現が約2倍に増強していた。骨格筋特異的

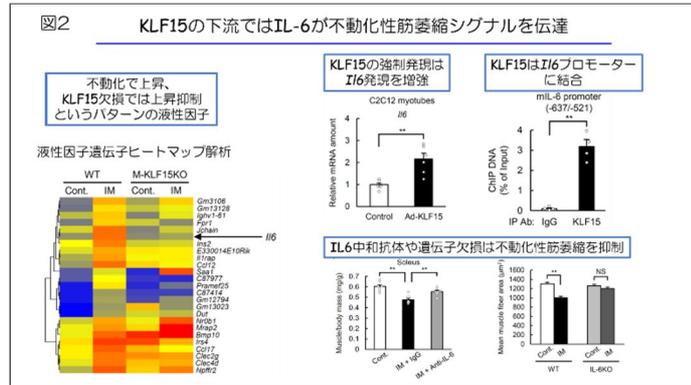


KLF15 欠損マウスは定常状態での筋肉量や筋萎縮、のタンパク・アミノ酸異化系遺伝子の発現量は野生型マウスと比べて差はなかったが、ギプス固定や運動神経切除を行った際の筋量減少が有意に抑制されていた。一方、協働筋切除による代償性筋肥大の過程では過負荷の加わった足底筋において筋重量が約1.5倍に増加し、筋萎縮関連遺伝子、オートファジー関連遺伝子、アミノ酸異化系遺伝子の発現は低下していたが、KLF15 の発現には有意な変化はなかった。さらに、

骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスに協働筋切除を行っても、代償性筋量増加の程度は野生型マウスと差はなかった。以上から、KLF15 を介した筋タンパク異化は、不動化による筋萎縮の重要な病理ステップであるものの、機械刺激による筋肥大における役割は限定的なものであると考えられた。

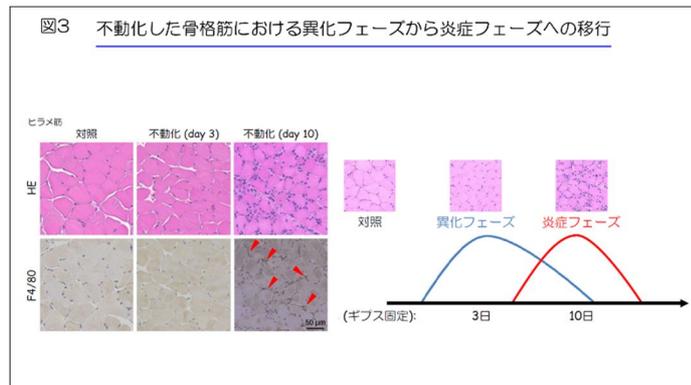
【不動化性筋萎縮における IL6 の役割】

KLF15 の下流で機能する因子を探索するため、野生型あるいは骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスに対して、ギプス固定による不動化処理を行い、骨格筋の遺伝子発現を網羅的に解析した。遺伝子発現変動データから、野生型マウスではギプス固定によって変化を生じるものの、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスではその変動が抑制される遺伝子を抽出し、その中でも液性因子をコードする遺伝子について更なる解析を行った。その結果、そのような条件を満たす遺伝子として IL6 遺伝子が同定された。培養筋肉細胞に KLF15 を強制発現すると IL6 の遺伝子発現が増強し、ChIP アッセイにより KLF15 は IL6 遺伝子のプロモーター領域に直接結合することも明らかとなった。さらに、IL6 の中和抗体をあらかじめ投与したマウスではギプス固定を行っても、タンパク・アミノ酸異化系遺伝子や筋萎縮関連遺伝子の発現は増加せず、骨格筋量の減少も抑制されていた。また、IL6 の遺伝子欠損マウスでもギプス固定による筋萎縮関連遺伝子の発現増加や骨格筋量減少が抑制されていた。以上から、IL6 は不動化による筋萎縮の過程で KLF15 の下流で機能し、筋萎縮を制御する因子であると考えられた。



【不動化性筋萎縮における炎症シグナルの役割】

不動化による筋萎縮の病理過程を経時的に検討した。ギプス固定による不動化では処理後3日をピークに異化シグナルの活性化が起こる、これは KLF15-IL6 経路によって制御されることが明らかとなった。異化シグナルの活性化の後、筋間質にはマクロファージ時の浸潤が生じ、各種の炎症性サイトカインを中心として炎症関連遺伝子の発現も増加することが明らかとなった。この炎症フェーズにおいて重要な機能を果たす液性因子を探索する目的で、網羅的遺伝子発現の検討を行ったところ、サイトカイン CXCL10 が最も発現が強く増強する因子であることが明らかとなった。あらかじめマウスに CXCL10 の中和抗体を投与しておく、ギプス固定を行った際の骨格筋への炎症細胞の浸潤や筋量の減少は抑制された。このことから、CXCL10 は不動化による骨格筋炎症惹起に関わる制御因子の一つと考えられた。



【運動の骨格筋 β アドレナリンシグナルの役割の解析】

C57BL/6 マウスにトレッドミル運動を2時間負荷したところ、骨格筋では PGC1α を始めとしたエネルギー消費系遺伝子の発現が亢進した。マウスに β2 アドレナリン受容体刺激薬を投与した際には、骨格筋に運動負荷後と同様なエネルギー消費系遺伝子の発現亢進が認められた。一方、肥満を誘導したマウスでは、骨格筋における β2 アドレナリン受容体遺伝子の発現は低下し、運動負荷あるいは β2 アドレナリン受容体刺激による骨格筋のエネルギー消費系遺伝子の発現の増強は抑制されていた。このことから、肥満は運動による骨格筋のアドレナリン感受性を減弱させると考えられた。骨格筋特異的に β2 アドレナリン受容体を欠損したマウスではトレッドミル運動による骨格筋のエネルギー消費系遺伝子の発現増強は抑制され、トレッドミル運動時の骨格筋の温度上昇も抑制されていた。以上から運動では骨格筋で β2 アドレナリン受容体シグナルが活性化し、エネルギー消費を増強させることが生体恒常性の維持に重要と考えられた。また肥満ではこのような機構の破綻が生じていること示唆された。

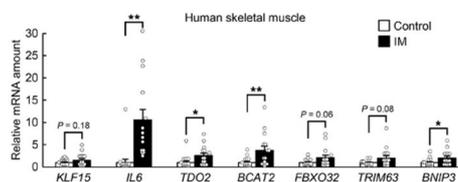
【マウス実験で得られた知見のヒト試料を用いた妥当性の検討】

骨折によるギプス固定を行った患者の骨格筋では、Tdo2 や Bcat2 などのタンパク・アミノ酸異化関連遺伝子、及び Bnip3 などのオートファジー関連遺伝子の発現は優位に増加し、IL6 の遺

伝子発現も増加していた。一方、KLF15 や Fbxo32 や Trim63 の遺伝子発現は増加する傾向にあった。またギプス固定患者の骨格筋では、KLF15 の遺伝子発現と Prodh、Bcat2、Foxa3a、Bnip3 などの筋萎縮に関連する遺伝子の発現は有意な正の相関を示したが、对照患者の骨格筋ではこのような相関は認められなかった。また、CXCL10 の発現も对照患者に比べて、ギプス固定患者で有意に高かった。以上から、マウスで見出された不働化性筋萎縮における KLF15-IL6 経路の関与はヒト試料でも一定程度妥当性が確認されたと考えられた。

図4 ヒト不働化骨格筋資料における萎縮関連遺伝子の発現変化

骨折によるギプス固定患者（固定期間6.9 ± 3.5 日）24例及び对照27例から受傷部位（上肢または下肢）及び年齢で傾向スコアマッチングを行い患者15例、対象18例を抽出して両群を比較検討



Juleen Zierath 博士のヒト骨格筋データベースの中から各種の肥満度、及び異なった強度の自転車エルゴメーター運動負荷後の生検試料について解析した。その結果、骨格筋における $\beta 2$ アドレナリン受容体の遺伝子発現は BMI と負の相関を示すこと、また、運動強度とは正の相関を示すことが明らかとなった。すなわち、ヒトにおいても骨格筋の $\beta 2$ アドレナリン受容体シグナルは運動によるエネルギー消費と関連し、肥満ではそのシグナルが減弱する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuramoto N, Nomura K, Kohno D, Kitamura T, Karsenty G, Hosooka T, Ogawa W.	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of PDK1 in skeletal muscle hypertrophy induced by mechanical load.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83098-z	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 Hirata Y, Nomura K, Kato D, Tachibana Y, Niihara T, Uchiyama K, Hosooka T, Fukui T, Oe K, Kuroda R, Hara Y, Adachi T, Shibasaki K, Wake H, Ogawa W.	4. 巻 132
2. 論文標題 A Piezo1/KLF15/IL-6 axis mediates immobilization-induced muscle atrophy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI154611.	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11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小川渉
2. 発表標題 高血糖および不動化における筋量制御のメカニズム.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、加藤大輔、橘吉寿、内山奏、細岡哲也、和氣弘明、安達貴弘、小川渉.
2. 発表標題 骨格筋生体イメージングを活用した不動化性筋萎縮の発症メカニズムの解析.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、加藤大輔、橘吉寿、内山奏、細岡哲也、原雄二、安達貴弘、柴崎貢志、和氣弘明、小川渉
2. 発表標題 不働化はPiezo1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する.
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内山奏、平田悠、野村和弘、北岡志保、古屋敷智之、小川
2. 発表標題 C/EBP-KLF15経路はストレスによる筋萎縮に関与する.
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村和弘、小川渉.
2. 発表標題 運動による代謝改善とその破綻メカニズム -ヒト骨格筋のエピゲノム解析も踏まえて-
3. 学会等名 64回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、新倉隆宏、橘吉寿、加藤大輔、内山奏、福井友章、大江啓介、細岡哲也、和氣弘明、黒田良祐、小川渉
2. 発表標題 不働化はCa ²⁺ シグナルの減弱を通じて筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、加藤大輔、橘吉寿、内山奏、細岡哲也、原雄二、安達貴弘、柴崎貢志、和氣弘明、小川渉。
2. 発表標題 不動化はPiezo1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会。
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、小川渉
2. 発表標題 高血糖および不動化における筋量制御のメカニズム
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高血糖および不動化における筋量制御のメカニズム。
2. 発表標題 平田悠、小川渉
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内山奏、平田悠、野村和弘、Hendy Wijaya、谷口将之、北岡志保、古屋敷智之、小川渉
2. 発表標題 脳内炎症は骨格筋のC/EBP経路を介してストレス性筋萎縮を促進する
3. 学会等名 第43回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内山奏、平田悠、野村和弘、Hendy Wijaya、谷口将之、北岡志保、古屋敷智之、小川涉
2. 発表標題 ストレスは骨格筋のC/EBP経路を介して筋萎縮を促進する
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>動かないと筋肉が減少するメカニズムを解明 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2022_03_15_01.html</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	野村 和弘 (Kazuhiro Nomura) (70450236)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教 (14501)	
研究分担者	平田 悠 (Yu Hirata) (70846352)	神戸大学・医学部附属病院・医学研究員 (14501)	

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			
スウェーデン	Karorinska Insituute			
米国	Columbia University			
英国	Leeds University			