

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15369

研究課題名（和文）筋萎縮克服を目指す骨格筋量制御シグナルの解明

研究課題名（英文）A study of molecular mechanisms regulating skeletal muscle mass and strength

研究代表者

江口 貴大（Eguchi, Takahiro）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60845056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋はわれわれの運動機能に必須の器官であり、重篤な筋萎縮は筋力低下を惹き起こす。カルシウムイオン（Ca²⁺）は骨格筋収縮に関わるだけでなく、骨格筋量の制御因子としての役割も知られているが、その下流メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究ではCa²⁺によって活性化されるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II（CaMKII）に着目し、CaMKII サブユニット、およびその類縁分子による筋萎縮/筋肥大制御への関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の生命活動において骨格筋は必須の役割を担っており、重篤な筋萎縮は筋力・運動機能の低下を引き起こし生活の質（QOL）を低下させる。本研究ではカルシウムイオン（Ca²⁺）によって活性化されるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II（CaMKII）に着目し、CaMKII サブユニット、およびその類縁分子が筋萎縮/筋肥大の関連因子であることを明らかにした。それゆえ、本研究成果は筋萎縮の分子メカニズムの理解を深め、筋萎縮治療技術の基盤開発を促進したといえる。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle is required for motor function, and severe muscle atrophy leads to reduced muscle strength. Calcium ion (Ca²⁺) is essential for skeletal muscle contraction, and plays a key role in regulating the skeletal muscle mass; however, its underlying mechanisms remain unclear. In the present study, we demonstrated that Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is involved in the muscle atrophy/hypertrophy, suggesting the importance of CaMKII in developing therapeutics aimed at improving muscle atrophy.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋 筋萎縮 筋肥大 CaMKII

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の主な構成単位である筋線維はアクチンとミオシンのフィラメントを主とする筋原線維と Ca^{2+} を貯蔵する筋小胞体を内包する細胞であり、骨格筋の収縮は運動神経により厳密に制御されている。電氣的に興奮した運動神経はその軸索末端から神経伝達物質を放出し、リアノジン受容体を介して筋小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出を誘導する。その結果、アクチンとミオシンのフィラメントの滑り運動、ひいては筋線維の収縮が惹起され、筋力が生み出される。それゆえ、骨格筋量の異常な低下 (筋萎縮) は筋力の低下につながり、運動機能を低下させる一因となる。

上述の通り、 Ca^{2+} は骨格筋の収縮において必須の役割を担う。一方で、骨格筋量の恒常性においても Ca^{2+} は重要な役割を果たす。例えば、骨格筋への機械的負荷の増強により、筋線維内の Ca^{2+} の濃度上昇により、セリンスレオニンキナーゼである mTOR が活性化し、筋肥大が誘導される (*Nature Med.*, 9:101-6, 2012)。他方、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) は Ca^{2+} 結合タンパク質である calmodulin との結合により活性化する Ser/Thr キナーゼとして知られ、細胞質内の Ca^{2+} センサーとして様々なシグナル伝達に関与することが知られているが、CaMKII による骨格筋量の制御機構については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

前項の研究背景を踏まえ、本研究では骨格筋量・筋力における CaMKII の重要性を明らかにし、筋萎縮への治療技術開発基盤となる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

個体の骨格筋量・筋力における CaMKII の重要性を明らかにするために、骨格筋への遺伝子導入にすぐれたアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) を用いて、CaMKII β WT、CaMKII β 活性喪失変異体 (K43M)、あるいは CaMKII β 恒常活性変異体 (T287D) を発現する AAV ベクターを作成した (図 1)。当該ベクター (1.7×10^{10} viral genomes) をマウス (3 ヶ月齢) の後肢左脚の前脛骨筋 (TA) に投与し、投与 3 ヶ月後にマウスの筋重量・筋力を解析した。また、前脛骨筋より total RNA、およびタンパク質を抽出し、qPCR、および Western blotting を実施した。統計解析は Dunnett 検定により実施した。

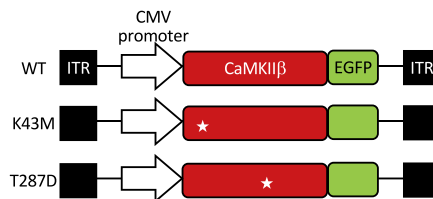


図 1. AAV ベクターの模式図

CaMKII β WT、活性喪失変異体 (K43M)、恒常活性変異体 (T287D) を発現する AAV ベクターを作成した。EGFP をタグとして付加した。★はそれぞれ変異箇所を示す。ITR, inverted terminal repeat. (BBRC 589:192-6, 2022 より)

4. 研究成果

CaMKII β WT、CaMKII β K43M、CaMKII β T287D 発現 AAV ベクターを 3 ヶ月齢マウスの後肢左脚の前脛骨筋に投与し、6 ヶ月齢時点の前脛骨筋における *Camk2b* 遺伝子の発現レベルを解析したところ、AAV を投与していないマウス (NT 群) と比較して、*Camk2b* の高度な発現増強を確認した (図 2)。また、GFP 抗体を用いた Western blotting 解析により、外来性の CaMKII β タンパク質の発現を確認した (図 3)。

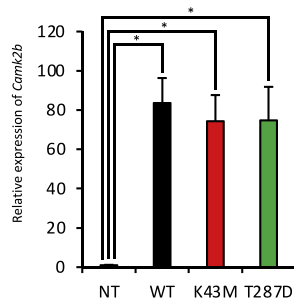


図 2. *Camk2b* 遺伝子の発現レベル

AAV 投与後 3 ヶ月 (6 ヶ月齢) 時点での、前脛骨筋における *Camk2b* 遺伝子の発現レベルを解析した。NT: AAV 非投与群、WT: AAV-CaMKII β WT 投与群、K43M: AAV-CaMKII β K43M 投与群、T287D: AAV-CaMKII β T287D 投与群。
*P<0.05. (BBRC 589:192-6, 2022 より)

次に、CaMKII β の発現増強が筋重量に及ぼす影響を解析するために、前脛骨筋 (TA)、長趾伸筋 (EDL)、ヒラメ筋 (SOL)、腓腹筋 (GA) の重量を解析したところ、NT 群と比較して、AAV-CaMKII β WT 投与群では有意な変化は認められなかった (図 4)。一方、AAV-CaMKII β K43M 投与群では、AAV-CaMKII β WT 投与群と比較して、前脛骨筋、およびヒラメ筋において、有意な筋重量の増加が認められ、長趾伸筋や腓腹筋においても筋重量増加の傾向が認められた (図 4)。さらに、AAV-CaMKII β T287D 投与群では、AAV-CaMKII β WT 投与群と比較して、いずれの筋においても筋重量が有意に低下していた。これらの結果より、骨格筋における CaMKII β K43M の強制発現は筋重量の増加を、CaMKII β T287D の強制発現は筋重量の低下を惹き起こすことが明らかとなった。

CaMKII β 変異体の強制発現が筋重量に影響を及ぼすことから、次にマウス後肢の筋力を解析した。AAV-CaMKII β WT 投与群では、NT 群と比較して、後肢の筋力の有意な変化は認められなかった。一方、AAV-CaMKII β K43M 投与群では筋力の増加が認められ、AAV-CaMKII β T287D 投与群では筋力の低下が認められた。以上の結果より骨格筋における CaMKII β K43M の強制発現は筋重量の増加に加え、筋力を増強し、CaMKII β T287D の強制発現は筋重量・筋力の低下を惹き起こすことが明らかとなった。

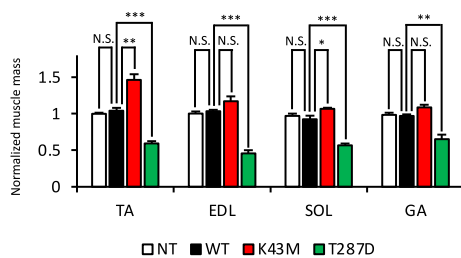


図 4. CaMKII β (WT, K43M, or T287D) の強制発現による骨格筋重量への影響

AAV 投与後 3 ヶ月 (6 ヶ月齢) 時点のマウスの筋重量を解析した。後肢左脚のそれぞれの筋重量を後肢右脚のそれぞれの筋重量で補正した。TA: tibialis anterior muscle, EDL: extensor digitorum longus, SOL: soleus, GA: gastrocnemius muscle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. N.S., 有意差なし。(BBRC 589:192-6, 2022 より)

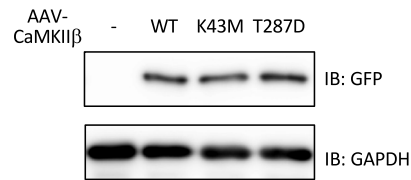


図 3. 外来性の CaMKII β タンパク質の検出
AAV 投与後 3 ヶ月 (6 ヶ月齢) 時点での、前脛骨筋の溶解液を用いて、CaMKII β -GFP、および GAPDH の検出を実施した。IB, Immunoblotting。(BBRC 589:192-6, 2022 より)

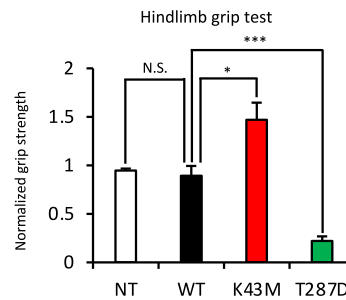


図 5. CaMKII β (WT, K43M, or T287D) の強制発現による筋力への影響

AAV 投与後 3 ヶ月 (6 ヶ月齢) 時点のマウスの後肢筋力を測定した。後肢左脚の筋力を後肢右脚の筋力で補正した。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. N.S., 有意差なし。(BBRC 589:192-6, 2022 より)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eguchi Takahiro, Yamanashi Yuji	4. 巻 589
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated expression of an inactive CaMKII mutant enhances muscle mass and strength in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 192 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.027	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 -

〔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 江口貴大、范文蘭、山梨裕司
2. 発表標題 骨格筋における変異型CaMKII の強制発現は筋肥大を誘導する
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口貴大、范文蘭、山梨裕司
2. 発表標題 A study of therapeutic interventions aimed at enhancing neuromuscular junction innervation and skeletal muscle mass
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口貴大、依田実朗、山梨裕司
2. 発表標題 CDK5活性化因子p35を起点とした神経筋シナプス形成・維持制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------