

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17515

研究課題名（和文）運動療法による多発性筋炎の軽減に対するオートファジー関連タンパクの役割

研究課題名（英文）Role of autophagy-related proteins in reducing polymyositis with exercise therapy

研究代表者

檜森 弘一（Himori, Koichi）

名古屋市立大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：70896571

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）：本研究は、運動により活性化されるオートファジー基質タンパクp62の新たな機能に着目し、運動による多発性筋炎の軽減に対するp62の役割を検証した。多発性筋炎の実験動物モデルである実験的自己免疫性筋炎（EAM）マウスに走行運動を負荷した結果、p62のリン酸化を増大したが、EAMによる筋量や筋力の低下は改善せず、持久性運動能力の低下のみが改善した。さらに筋特異的p62欠損および野生型マウスにEAMを誘導し走行運動を負荷した結果、両遺伝子型で持久性運動能力が改善し、その程度に違いはなかった。したがって、走行運動はEAMマウスの持久性運動能力を改善するが、その改善にp62は関与しない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、多発性筋炎患者に対する運動療法は、筋炎症状の増悪を危惧し敬遠されてきた。しかしながら近年、欧米諸国を中心として、多発性筋炎患者に対して急性期から運動療法を実施し、筋炎症状の増悪なしに筋力低下を抑制する臨床データが蓄積されつつある。しかし、この分子メカニズムは未だ不明な点が多く、実際の臨床現場において多発性筋炎患者に対して積極的な運動療法を実施するには至っていない。本研究は、運動による多発性筋炎の軽減メカニズムを解明し、科学的根拠を創出することで、当該患者に対する効果的な運動療法の確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the novel function of the autophagy substrate protein p62, which is activated by exercise, and examined the role of p62 in reducing exercise-induced polymyositis. The results showed that in experimental autoimmune myositis (EAM) mice, a model for polymyositis, running exercise increased the levels of phospho-p62 and improved endurance performance but not muscle mass and strength in EAM mice. Moreover, induction of EAM in both muscle-specific p62 knockout and wild-type mice, followed by running exercise, improved endurance exercise performance, without any difference between genotypes. Therefore, although running exercise improves endurance performance in EAM mice, p62 may not be involved in this improvement.

研究分野：筋機能制御学

キーワード：多発性筋炎 オートファジー基質タンパク質 運動療法

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎は、骨格筋が標的となる自己免疫性疾患であり、筋力の低下を引き起こすことで歩行や階段昇降などの日常動作を困難にする。多発性筋炎の治療は、薬物療法が基本的な方法であるが、炎症鎮静後も発症前の筋力まで回復せず日常生活に支障をきたすことが多いため、多発性筋炎を予防や軽減する効果的な方法の確立は生活の質の向上や医療費削減の観点から重要な課題である。多発性筋炎による筋力低下は、骨格筋の酸化ストレスの増大が要因の一つである。多発性筋炎のモデル動物である実験的自己免疫性筋炎 (EAM) マウスを用いた先行研究では、EAM により骨格筋における小胞体ストレスや活性酸素/窒素種合成酵素の発現が増大し、酸化ストレスが増加すること (1) や抗酸化剤を投与すると、EAM に伴う筋力低下が抑制されること (2) が報告されている。これらの報告は、骨格筋の抗酸化機能を向上することで多発性筋炎を軽減できる可能性を示唆している。定期的な運動は抗酸化機能を向上する代表的な方法であり、抗酸化物質の産生を増加することで骨格筋の抗酸化機能を向上する。したがって、運動療法は多発性筋炎の予防や軽減に貢献する可能性が高く、先行研究でも多発性筋炎患者に対する運動療法が筋力を改善することも報告されている (3)。しかしながら、これまでの臨床現場における多発性筋炎患者に対する運動処方、運動による炎症の増大を危惧し十分な根拠なく敬遠されてきた。運動が多発性筋炎による筋力低下を抑制する分子機構を解明できれば、臨床現場における積極的な運動療法の実施への貢献が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内タンパクである p62 の多彩な機能に着目して、運動が多発性筋炎による筋力低下を抑制する新たな分子機構の解明を目指し、「定期的な運動による p62 の活性化は、骨格筋の Nrf2 の核内移行の促進と抗酸化物質の増加を誘導することで多発性筋炎による筋力低下を抑制する」と仮説を立て、これを立証することを目的とした。本研究では、多発性筋炎による筋力低下に対する p62 の役割の立証を課題 1、運動による多発性筋炎の軽減に対する p62 の役割の立証を課題 2 とし、運動療法が多発性筋炎による筋力低下を抑制する科学的根拠の創出を目指す。

3. 研究の方法

課題 1：多発性筋炎による筋力低下に対する p62 の役割の立証

筋特異的に p62 の発現量を欠損したマウス、野生型のマウスを実験的自己免疫性筋炎 (EAM) 群と対照群に分けた。EAM は抗原とフロイント完全アジュバントを等量混合したエマルジョンを 1 週間毎に 3 回投与することで惹起した。最終免疫から 2 週後に握力計による四肢握力とトレッドミルによる持久性運動能力を測定し、足底筋と腓腹筋の筋重量を測定した。

課題 2：運動による多発性筋炎の軽減に対する p62 の役割の立証

【実験 1】C57BL/6J マウスを EAM 群と対照群に分け、さらに運動群と安静群に分けた。EAM は課

題 1 と同様の方法で惹起した。運動群は 4 週間の自発走行運動を行い、安静群は通常飼育した。運動終了 2 日前に四肢握力と持久性運動能力を測定し、運動最終日の影響が消失した運動終了 24 時間後に足底筋と腓腹筋を採取して筋重量を測定し解析に使用した。生化学的解析では、オートファジー基質タンパク質として p62 とリン酸化 p62、ミトコンドリア関連タンパク質として PPAR コアクチベーター (PGC) -1 とチトクローム c オキシダーゼ (COX) IV および筋原線維タンパク質としてミオシン重鎖 (MHC) IIa と IIb の発現をウェスタンブロットで評価した。

【実験 2】筋特異的 p62 欠損マウスと野生型マウスを EAM 群と対照群に分け、さらに運動群と安静群に分けた。EAM の惹起と運動の負荷は実験 1 と同様の方法を用いた。運動終了 2 日前に持久性運動能力を測定した。

4. 研究成果

課題 1：多発性筋炎による筋力低下に対する p62 の役割の立証

野生型マウスでは、EAM により筋量、筋力および持久性運動能力の低下が観察された。一方、筋特異的 p62 欠損マウスでは、野生型マウスと同様に EAM による筋量、筋力および持久性運動能力の低下が観察され、その変動に遺伝子型による差異は認められなかった (図 1)。これらの結果から、EAM による筋量、筋力および持久性運動能力の低下メカニズムに p62 は関与しないことが示唆された。

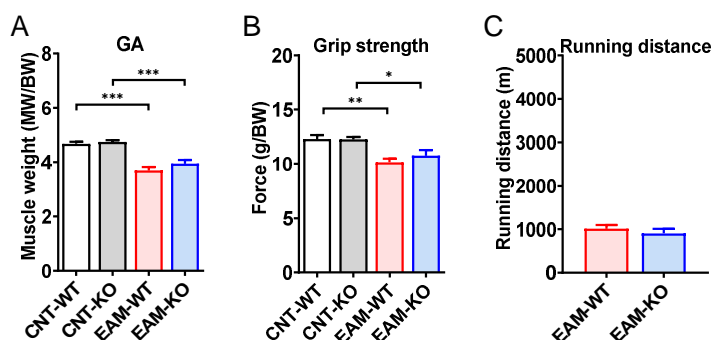


図 1. 筋特異的 p62 欠損が EAM による筋の退行性変化に及ぼす影響。A) 腓腹筋 (GA) の筋重量 (体重で補正)；B) 四肢握力 (体重で補正)；C) 持久性運動能力テストにおける総走行距離。CNT-WT: 野生型対照群, CNT-KO: 筋特異的 p62 欠損対照群, EAM-WT: 野生型実験的自己免疫性筋炎群, EAM-KO: 筋特異的 p62 欠損実験的自己免疫性筋炎群。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

課題 2：運動による多発性筋炎の軽減に対する p62 の役割の立証

【実験 1】C57BL/6J マウスに EAM を誘導し、4 週間の自発走行運動を負荷したところ、骨格筋における p62 のリン酸化を増大したが、筋量や筋力は改善しなかった (図 2 A, B)。したがって、筋量や筋力については、そもそも運動効果が得られず、自発走行運動によるリン酸化 p62 の増加は筋量や筋力の改善に寄与しない可能性が高い。一方、EAM による持久性運動能力の低下は、自発走行運動により改善した (図 2 C)。またこれらの運動効果は、ミトコンドリア生合成の活性化 (PGC-1 と COX IV の増加) および筋線維タイプの遅筋化 (MHC IIa の増加と MHC IIb の減少) を伴っていた。

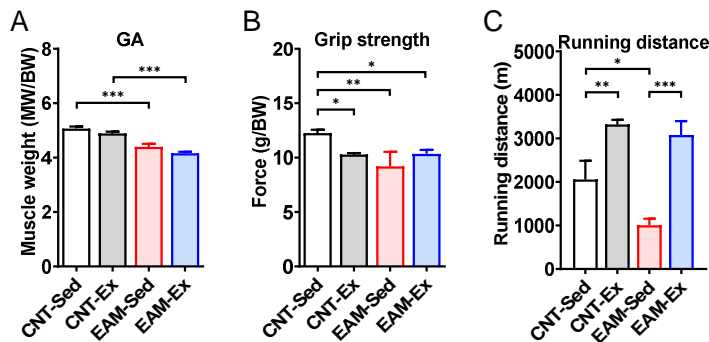


図 2 . 自発走行運動がEAMによる筋の退行性変化に及ぼす影響 . A) 腓腹筋 (GA) の筋重量 (体重で補正) ; B) 四肢握力 (体重で補正) ; C) 持久性運動能力テストにおける総走行距離 . CNT-Sed: 安静対照群, CNT-Ex : 運動対照群, EAM-Sed : 安静実験的自己免疫性筋炎群, EAM-Ex : 運動実験的自己免疫性筋炎群 . *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

【実験 2】 走行運動による持久性運動能力の改善効果が p62 を介するかどうかを確認するため、実験 2 では筋特異的 p62 欠損マウスと野生型マウスに EAM を誘導したうえで自発走行運動を負荷した。その結果、筋特異的 p62 欠損マウスでは、野生型マウスと同様に持久性運動能力は改善したが、その程度に遺伝子型による違いはなかった (図 3)。

本研究の結果から、自発走行運動はミトコンドリア量の増大と筋線維タイプの遅筋化を介して EAM マウスの持久性運動能力を改善する可能性が示唆された。またその運動効果の機序に p62 は関与しないと考えられる。

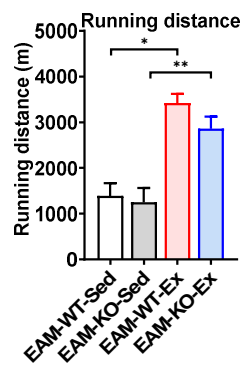


図 3 . EAMマウスにおける筋特異的p62欠損が自発走行運動による持久性運動能力の改善効果に及ぼす影響 . 持久性運動能力テストにおける総走行距離 . EAM-WT-Sed: 野生型安静実験的自己免疫性筋炎群, EAM-KO-Sed : 筋特異的 p62欠損安静実験的自己免疫性筋炎群, EAM-WT-Ex : 野生型運動実験的自己免疫性筋炎群, EAM-KO-Ex : 筋特異的p62欠損運動実験的自己免疫性筋炎群 . *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

<引用文献>

1. Himori K, Ashida Y, Tatebayashi D, Abe M, Saito Y, Chikenji T, et al. Eccentric Resistance Training Ameliorates Muscle Weakness in a Mouse Model of Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol.* 2021; 73(5): 848-857.
2. Meyer A, Laverny G, Allenbach Y, Grelet E, Ueberschlag V, Echaniz-Laguna A, et al. IFN- γ -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. *Acta Neuropathol.* 2017; 134(4): 655-666.

3. Nader GA, Dastmalchi M, Alexanderson H, Grundtman C, Gernapudi R, Esbjörnsson M, et al. A longitudinal, integrated, clinical, histological and mRNA profiling study of resistance exercise in myositis. *Mol Med*. 2010; 16(11-12): 455-64.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 檜森 弘一	4. 巻 44
2. 論文標題 運動が炎症誘発性筋力低下を抑制する分子機序の解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 デサントスポーツ科学	6. 最初と最後の頁 104-111
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 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 Ashida Y, Himori K, Tokuda N, Naito A, Yamauchi N, Takenaka-Ninagawa N, Aoki Y, Sakurai H, Yamada T.	4. 巻 323
2. 論文標題 Dissociation of SH3 and cysteine rich domain 3 and junctophilin 1 from dihydropyridine receptor in dystrophin-deficient muscles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C885-C895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00163.2022.	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 Yamada T, Ashida Y, Tamai K, Kimura I, Yamauchi N, Naito A, Tokuda N, Westerblad H, Andersson DC, Himori K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-022-02846-2.	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 Ashida Y, Himori K, Tamai K, Kimura I, Yamada T.	4. 巻 131
2. 論文標題 Preconditioning contractions prevent prolonged force depression and Ca ²⁺ -dependent proteolysis of STAC3 after damaging eccentric contractions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Appl Physiol	6. 最初と最後の頁 1399-1407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jappphysiol.00463.2021.	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 Himori K, Ashida Y, Tatebayashi D, Abe M, Saito Y, Chikenji T, Westerblad H, Andersson DC, Yamada T.	4. 巻 73
2. 論文標題 Eccentric Resistance Training Ameliorates Muscle Weakness in a Mouse Model of Idiopathic Inflammatory Myopathies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol	6. 最初と最後の頁 848-857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41594. Epub 2021 Mar 25.	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 芦田 雪, 渡邊 大輝, 宮田 浩文, 檜森 弘一, 玉井 勝是, 木村 伊織, 阿部 真佐美, 今井 富裕, 山田 崇史	4. 巻 24
2. 論文標題 ストレッチは脱神経後早期における骨格筋の興奮性低下を軽減する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 基礎理学療法学	6. 最初と最後の頁 1-10
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 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 1件)

1. 発表者名 檜森弘一, 山田麻未, 奥津光晴
2. 発表標題 骨格筋におけるNrf2の欠損は多発性筋炎によるT細胞の浸潤と筋量の低下を軽減する
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 檜森弘一, 山田麻未, 奥津光晴
2. 発表標題 骨格筋特異的Nrf2欠損が多発性筋炎による筋量や筋力の低下に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜森弘一, 山田麻未, 奥津光晴
2. 発表標題 持久性運動が多発性筋炎による持久性運動能力の低下を改善するメカニズムの解明
3. 学会等名 第6回基礎理学療法学若手研究者ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜森弘一, 芦田雪, 館林大介, 山下敏彦, 山田崇史
2. 発表標題 高強度伸張性収縮トレーニングは特発性炎症性筋疾患モデルマウスの筋機能を改善する
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 檜森弘一, 山田麻未, 奥津光晴
2. 発表標題 多発性筋炎による筋力低下に対するNrf2の役割
3. 学会等名 第76回日本体力医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Himori K, Yamada M, Okutsu M
2. 発表標題 Nrf2 regulates skeletal muscle mass and function in a mouse model of experimental autoimmune myositis
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------