

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19720

研究課題名（和文）タンパク分解系に着目した新たなサルコペニア動物モデルの創出

研究課題名（英文）Examination of sarcopenic animal models focusing on the proteolytic system

研究代表者

北嶋 康雄（Kitajima, Yasuo）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：70734416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、任意の時期に骨格筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすことのできるマウスを作出し、骨格筋恒常性維持機構への影響を明らかにすることを目的とした。個体成熟後の骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、プロテアソームを介したタンパク質分解が阻害され、筋萎縮と筋線維のサイズの減少を引き起こした。さらに、プロテアソーム機能不全は壊死細胞や炎症細胞の浸潤などが認められ、疾患との関連も示唆した。今後は、筋プロテアソーム機能不全と老化や疾患との関連をさらに調べていく必要がある。その解明が進むことで、骨格筋の正常な恒常性維持機構の一端を明らかにすることができると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、成体骨格筋におけるプロテアソーム機能不全が筋萎縮を引き起こすことを、マウスモデルで実証した。個体成熟後の骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、プロテアソームを介したタンパク質分解が阻害され、筋萎縮と筋線維のサイズの減少を引き起こした。本研究結果は、筋量を維持するためには正常なプロテアソーム機能が重要であることを示し、タンパク分解系による骨格筋研究の更なる発展につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to generate mice that can undergo muscle-specific proteasome dysfunction at any given time and to elucidate its effects on skeletal muscle homeostasis mechanisms. After individual maturation, skeletal muscle proteasome dysfunction in mice inhibited proteasome-mediated proteolysis, leading to muscle atrophy and reduced myofiber size. Furthermore, proteasome dysfunction was associated with necrotic cells and inflammatory cell infiltration, suggesting a link to disease. In the future, the relationship between muscle proteasome dysfunction and aging and disease should be further investigated. We expect that further elucidation of this relationship will help to elucidate one aspect of the normal homeostatic mechanism of skeletal muscle.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 筋再生 タンパク分解系 老化 筋線維

1. 研究開始当初の背景

日本は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する超高齢社会においてサルコペニア(加齢に伴う骨格筋萎縮)に伴う運動機能低下が多く、要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。2017年に60歳以上の日本人を対象とした調査では、サルコペニアの推定有病者は370万人にのぼり、毎年105万人の高齢者が新しくサルコペニアに罹患していると発表された。そのような背景の元、サルコペニアに関して未だ確固たる解決策には至っていない。

一般的に、骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスで決定されると考えられおり、遺伝子改変マウスなどにより様々な研究が推進されている。申請者は、これまでに骨格筋機能や骨格筋量を調節する機構について、タンパク分解系の主役であるプロテアソーム系の機能不全マウスを作出し、骨格筋量維持にかかわることを証明してきた[1,2]。これまでに、骨格筋では加齢によりプロテアソーム活性が低下することが報告されており、申請者は、骨格筋でのプロテアソーム機能(タンパク分解系)の低下のモデルを作出することができれば、サルコペニア研究が飛躍的に進むと考えた。

上記の考えの元、これまでに申請者は骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全(KO)マウスを作出し、KOマウスでは、有意なプロテアソーム活性の低下および、筋成長不全を示した。しかし、このマウスでは、発生・発育段階からのプロテアソーム機能不全になるため、そもそも個体の成長が阻害され、加齢とともに症状がでるサルコペニアモデルとは異なると考えられた。そこで、テトラサイクリン遺伝子発現調節システムを用いて、実験者の任意のタイミングで時期特異的に遺伝子改変を起こせるモデルが作出できれば、サルコペニアモデルになると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、任意の時期に骨格筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすことのできる(mKO)マウスを作出し、筋量調節機構との関わりについて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1). 実験動物

誘導型の骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全マウスを用いて、若齢マウス(8-12週齢)を対象にドキシサイクリンを飲ませることにより遺伝子欠損を誘導した。すべての実験動物は、温度、湿度が通年一定に保たれた、12時間ごとの照明管理の元で、水分、栄養を十分に与えられて飼育された。

(2). ドキシサイクリンによるノックアウトの誘導

5%スクロース溶液にドキシサイクリン(Sigma)が最終濃度2mg/mlになるように溶解し、マウスの飲料水とした。3日ごと飲料水を調製し、マウスに3週間自発的に摂取させた。ドキシサイクリン溶液を飲水させている期間は、マウスは普通の水を飲むことはできないようにした。

(3). 体重、骨格筋重量、握力および組織学的な評価

すべての実験においてサンプリング時にマウスの体重、筋重量(速筋主体の腓腹筋、前脛骨筋および遅筋主体のひらめ筋)、握力を測定した。単離した骨格筋は、可能な限り脂肪、結合組織、腱を取り除いた。その後、凍結組織包埋剤を用いて、液体窒素により冷却したイソペンタンにて凍結した。凍結した骨格筋はクライオスタットによって-20°C下で10μmの厚さにスライスし、シリコンコーティングスライドガラスに接着し、解析まで-80°Cで保存した。保存切片は室温で解凍後に、4%Paraform Aldehyde (PFA)/PBS またはアセトンにより固定した。その後5% goat serum/PBSで室温30分間のブロッキングを行いPBSで洗浄後、一次抗体と4°Cで一晩インキュベートした。翌日PBSで洗浄後、一次抗体に適切な二次抗体で室温1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、VECTASHIELD(Vector Labs, Peterborough, UK)により封入した。

(4). 遺伝子発現解析

Total RNAはRNeasy(Qiagen)を用いて単離した。リアルタイムPCRのために、オリゴdTプライマーを用いて第一鎖cDNAを合成した。選択した遺伝子の発現レベルは、マニュアルに従ってBio-Rad CFX96システムを使用して分析し、定量PCR分析は、特定のプライマーを使用して実施した。

(5). プロテアソーム活性

プロテアソーム活性試薬は、Proteasome-Glo™ Assay kit (Promega)を用いた。タンパク質の抽出には、20 mM Tris HCl (pH 7.2), 0.1 mM EDTA, 5 mM ATP, 1 mM β-mercaptoethanol, 20% glycerol and 0.04% Nonidet P40の抽出液を用い、Varioskan luminometer (Thermo Scientific)により発光強度を測定した。

4. 研究成果

mKO マウスの骨格筋(前脛骨筋、腓腹筋)を対象にプロテアソーム構成遺伝子(Rpt3)の遺伝子発現を調べたところ、コントロールに比べて90%以上有意に抑制されていた。また、他のプロテアソーム構成遺伝子に関しては、mKO マウスにおいて上記とは逆に増加している遺伝子も存在し、代償的な影響が考えられた。

体重に関しては、mKO マウスとコントロールマウス間に有意な差は認めなかった。前脛骨筋および腓腹筋の筋重量に関しては、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。一方で、ひらめ筋に関しては、両者に差は認めなかった。つまり速筋線維主体の骨格筋では筋萎縮を呈し、遅筋線維主体の骨格筋では筋萎縮が認められなかった。これはサルコペニアの現象と一致しており、今後の更なる解析が必要である。また、筋機能評価として握力を調べたところ、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。

mKO マウスおよびコントロールマウスの筋横断面を用いて免疫染色を行った。mKO マウスにおいて、コントロールマウスと比較して、筋線維 Type2a、2b、2x いずれにおいても有意に筋横断面積が筋萎縮していた。また、HE 染色により筋横断面を観察したところ、mKO マウスのみには壊死した細胞や炎症細胞が確認された。これにより、骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、恒常的な筋の維持にプロテアソーム系が関与していることを示唆した。また、筋損傷再生時の筋細胞や炎症細胞の関与なども今後の検討課題である。

プロテアソーム活性の検討に関しては、予想に反して、mKO マウスがコントロールマウスと比較して活性の増加を呈した。上記にも記述したように、mKO マウスの骨格筋ではコントロールマウスと比較してターゲット遺伝子 Rpt3 は有意に減少していたが、他のプロテアソームコンポーネントの遺伝子発現は増加していた。そのため、mKO マウスでのプロテアソーム活性の増加は、プロテアソームコンポーネントの代償的な活性化によるものである可能性が考えられた。また、mKO マウスにおいて、ユビキチン化タンパク質の蓄積も確認できたため、タンパク質分解が機能不全になっていることを示した。さらに、mKO マウスの骨格筋では、コントロールマウスと比較して、オートファジー関連の LC3 や p62 のタンパク質蓄積も起こっていた。

本研究では、成体骨格筋におけるプロテアソーム機能不全が筋萎縮を引き起こすことを、マウスモデルで実証した。個体成熟後の骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、プロテアソームを介したタンパク質分解が阻害され、筋萎縮と筋線維のサイズの減少を引き起こした。

プロテアソーム機能不全を起こした骨格筋の組織観察では、壊死した細胞や炎症細胞の浸潤など、筋線維の変性が確認された。プロテアソーム系は、正常および異常な細胞内タンパク質のほとんどを分解することが知られている[3]。特に骨格筋では、プロテアソーム系によるタンパク質分解が筋原線維タンパク質の主要な分解機構である[4]。また、骨格筋においては、プロテアソーム機能異常と筋疾患の関連性が報告されている[5]。したがって、筋プロテアソーム機能不全と疾患に関するさらなる研究が必要であり、そのために本研究で用いたマウスモデルが有用であると考えられる。

mKO マウスでは、Rpt3 以外のプロテアソーム関連遺伝子の発現が上昇していた。また、プロテアソーム活性についても mKO マウスの骨格筋で上昇が認められた。これらの知見は、ミスfoldしたタンパク質をより効率的に除去するための代償機構の存在を反映しているのかもしれない。今後は、上記の現象について老化マウスで共通する事象があるのか、さらには運動モデルでの検証などを進めることが課題である。

引用文献

- [1] Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci.* 127:5204-17, 2014.
- [2] Kitajima Y, Suzuki N, Nunomiya A, Osana S, Yoshioka K, Tashiro Y, Takahashi R, Ono Y, Aoki M, Nagatomi R. The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle. *Stem Cell Reports.* 11(6):1523-1538, 2018.
- [3] Collins GA and Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell.* 169:792-806, 2017.
- [4] Attaix, D, Aurousseau E, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Ralliere C, Souweine B, Taillandier D, Tilignac T. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 153-165, 1998.
- [5] Fratta, P, Engel W, McFerrin J, Davies K, Lin S, Askanas V. Proteasome inhibition and aggregates formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers. *Am. J. Pathol.* 167, 517-526, 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Murayama Kazutaka, Takada Hiroaki, Tabuchi Ayaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 238
2. 論文標題 The aminopeptidase LAP3 suppression accelerates myogenic differentiation via the AKT TFE3 pathway in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2103 ~ 2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.31070	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 Shitaoka Kiyomi, Higashiura Akifumi, Kawano Yohei, Yamamoto Akima, Mizoguchi Yoko, Hashiguchi Takao, Nishimichi Norihisa, Huang Shiyu, Ito Ayano, Ohki Shun, Kanda Miyuki, Taniguchi Tomohiro, Yoshizato Rin, Azuma Hitoshi, Kitajima Yasuo, Yokosaki Yasuyuki, Okada Satoshi, Sakaguchi Takemasa, Yasuda Tomoharu	4. 巻 6
2. 論文標題 Structural basis of spike RBM-specific human antibodies counteracting broad SARS-CoV-2 variants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04782-6	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 Kitajima Yasuo, Tsukahara Ryoka, Nakamoto Shohei, Yasuda Tomoharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient Isolation of Lymphocytes and Myogenic Cells from the Tissue of Muscle Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1754 ~ 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11111754	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 Tamura Yumi, Yamane Keita, Kawano Yohei, Bullinger Lars, Wirtz Tristan, Weber Timm, Sander Sandrine, Ohki Shun, Kitajima Yasuo, Okada Satoshi, Rajewsky Klaus, Yasuda Tomoharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Concomitant Cytotoxic Effector Differentiation of CD4+ and CD8+ T Cells in Response to EBV-Infected B Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4118 ~ 4118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14174118	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 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Takada Hiroaki, Murayama Kazutaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 634
2. 論文標題 Little involvement of recycled-amino acids from proteasomal proteolysis in de novo protein synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.113	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 Azuma Hitoshi, Kawano Yohei, Shitaoka Kiyomi, Kawahara Takahiro, Ito Ayano, Higashiura Akifumi, Kitajima Yasuo, Ohki Shun, Yasuda Tomoharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Vaccination with the Omicron spike RBD boosts broadly neutralizing antibody levels and confers sustained protection even after acquiring immunity to the original antigen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac055	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 Hirano Kotaro, Tsuchiya Masaki, Shiomi Akifumi, Takabayashi Seiji, Suzuki Miki, Ishikawa Yudai, Kawano Yuya, Takabayashi Yutaka, Nishikawa Kaori, Nagao Kohjiro, Umemoto Eiji, Kitajima Yasuo, Ono Yusuke, Nonomura Keiko, Shintaku Hirofumi, Mori Yasuo, Umeda Masato, Hara Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202201783	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 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Takada Hiroaki, Kubota Takahiro, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 236
2. 論文標題 Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 5293 ~ 5305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30237	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 Yoshioka Kiyoshi, Nagahisa Hiroshi, Miura Fumihito, Araki Hiromitsu, Kamei Yasutomi, Kitajima Yasuo, Seko Daiki, Nogami Jumpei, Tsuchiya Yoshifumi, Okazaki Narihiro, Yonekura Akihiko, Ohba Seigo, Sumita Yoshinori, Chiba Ko, Ito Kosei, Asahina Izumi, Ogawa Yoshihiro, Ito Takashi, Ohkawa Yasuyuki, Ono Yusuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Hoxa10 mediates positional memory to govern stem cell function in adult skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd7924	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5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋恒常性の維持のための プロテアソーム系の役割
3. 学会等名 第76回日本体力医学会 (シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 新しい骨格筋幹細胞解析ツールによる 新規Pax7標的遺伝子の同定
3. 学会等名 第76回日本体力医学会 (シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋再生組織からのリンパ球および筋細胞の効率的な単離方法の確立
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋幹細胞の維持と 免疫細胞による筋再生機構
3. 学会等名 第38回筋肉の会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋再生におけるB細胞の役割解明
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1件

1. 著者名 北嶋 康雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 227
3. 書名 健康寿命の鍵を握る骨格筋	

〔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
---------	---------