

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32672

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19737

研究課題名(和文) 培養筋管細胞と探索的RNA干渉による骨格筋形態制御因子のスクリーニング法開発

研究課題名(英文) Development of a screening procedure for muscle hypertrophy/atrophy related molecules by using myotube cells and comprehensive gene knockdown

研究代表者

中里 浩一 (Nakazato, Koichi)

日本体育大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00307993

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)：加齢時の全身性の炎症亢進は血中炎症性サイトカイン(TNF などの増加を介して骨格筋萎縮を誘発する。我々は炎症に関わるリン脂質代謝酵素群を対象に低分子干渉RNA(RNAi)を用いた網羅的ノックダウン(KD)を行い、骨格筋形態に強い影響を与えるNsmaf(neutral sphingomyelinase activation associated factor)を発見した。NsmafKDは骨格筋タンパク合成は増加させるが筋線維径を減少させたがNsmaf過剰発現は影響を与えなかった。網羅的siRNAは骨格筋形態制御因子探索に有効であり、Nsmafは新規骨格筋形態制御因子であると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う骨格筋萎縮(サルコペニア)は日常生活動作に支障をきたす。身体動作のみならず骨格筋は代謝や内分泌にも影響を与えるため、骨格筋萎縮は加齢や慢性疾患に伴う代謝異常の促進にも関与する。したがって加齢時や慢性時の骨格筋萎縮を予防することが重要である。慢性的な炎症がこれら骨格筋萎縮に影響を与えることが知られており、今後炎症反応に影響を与える様々なタンパク質を網羅的にノックダウンすることで慢性炎症による骨格筋萎縮に影響を与えるタンパク質の抽出が可能になることが期待できることを示した初めての研究成果である。この方法論は慢性炎症時の骨格筋萎縮のみならず多くの疾患に対して有効なアプローチになる。

研究成果の概要(英文)：Systemic hyperinflammation during ageing induces skeletal muscle atrophy via an increase in blood inflammatory cytokines (e.g. TNF). We performed comprehensive knockdown (KD) using small interfering RNA (RNAi) on phospholipid metabolic enzymes involved in inflammation and discovered Nsmaf (neutral sphingomyelinase activation associated factor), which has a strong effect on skeletal muscle morphology. Nsmaf KD increased skeletal muscle protein synthesis but decreased muscle fibre diameter, while Nsmaf overexpression had no effect. We conclude that comprehensive siRNA is effective in the search for skeletal muscle morphogenetic regulators. We also concluded that Nsmaf is a novel regulator of skeletal muscle morphology.

研究分野：筋生理・生化学

キーワード：siRNA 骨格筋 NSMAF

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疾患、加齢時の全身性の炎症亢進は血中炎症性サイトカイン(TNF, IL1 など)の増加を介して骨格筋萎縮を誘発するとされる。細胞膜を構成するリン脂質であるスフィンゴミエリンはセラミドに代謝(スフィンゴミエリン経路)され、TNF シグナルを活性化することでインスリン抵抗性を導く。従って、リン脂質代謝は慢性炎症時の骨格筋量維持において重要なターゲットとなりうる。

RNA 干渉はターゲット遺伝子の mRNA を分解することでその遺伝子のタンパク質発現を抑制(ノックダウン)する。ごく最近、網羅的 RNA 干渉が筋芽細胞の筋管分化に関与する遺伝子の一次スクリーニングに利用されるようになった(Methods in Molecular Biology2019)。これを応用し、我々は筋管を形成した培養骨格筋細胞 C2C12 に対して複数のリン脂質代謝関連遺伝子(Smpd1-4, Nsmf など)を探索的にノックダウンし、筋管の形態変化を指標とする一次スクリーニングを行った。当初、これら遺伝子のノックダウンは TNF シグナル活性化阻害による筋管肥大/萎縮抑制をもたらすと予想した。その中で Nsmf (neutral sphingomyelinase activation associated factor)のノックダウンは筋管萎縮を誘発するという予想外の結果をもたらした。我々はさらに複数のデータベース(MuscleDB、GeneCard、GeneXX、MetaMEx など)を用いて Nsmf タンパク質の in silico 解析を試みた。その結果、Nsmf タンパク質の骨格筋における機能として、運動・不活動への適応による速筋肥大・萎縮への関与が推定された。

### 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は探索的 RNA 干渉によって抽出された Nsmf の速筋肥大・萎縮への関与を実験的に証明することであった。また、今回の試みにより培養筋管細胞の探索的 RNA 干渉が筋形態制御分子基盤解析の一次スクリーニングになる可能性が示されたため、本研究の第二の目的は培養筋管細胞と探索 RNA 干渉を用いた骨格筋形態制御因子抽出法の開発とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

C2C12 マウス筋細胞株 [European Collection of Authenticated Cell Cultures(ECACC, lot 15E026)] をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; 048-29763; Fujifilm Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan)に 10% ウシ胎児血清(FBS; 12483-020; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を添加し、成長培地(GM)として用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。分化誘導時には 6 ウェルプレート(3335; Corning, Corning, NY)に植え替え 48 時間後に約 90% 増殖させた細胞に対して DMEM に 2% ウマ血清(16050122; Thermo Fisher Scientific Waltham, MA)を加えた分化培地(DM)に培地交換した。

#### (2) siRNA トランスフェクション

筋芽細胞では、GM で培養された C2C12 筋芽細胞(培養後 70 時間)に 100nM の siRNA を、Lipofectamine RNAiMAX(13778150, Invitrogen, MA)を用いてトランスフェクションした。siRNA 投与 48 時間後に細胞を回収した。また、筋管細胞では同様の方法で、成熟に成長した筋管細胞(培養後 144 時間)に行った。すべての siRNA (siNsmf; 4390815, siScr; ネガティブコントロール; AM4635)は Ambion 社(テキサス州オースチン)で購入した。

#### (3) ライブセルイメージング

細胞を PBS で 2 回洗浄し、メーカーの指示に従って蛍光色素(核:Hoechst 33342 [excitation (Ex): 342 nm/emission (Em): 461 nm, 346-07951, Dojindo Molecular Technology Inc., Kumamoto, Japan], 全細胞:カルセイン AM 溶液(Ex: 490 nm / Em: 515 nm, C396, Dojindo Molecular Technology Inc.))で染色した。その後共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV3000; Olympus, Tokyo, Japan)で画像を撮影した。

#### (3) ウエスタンブロッティングと mRNA 分析

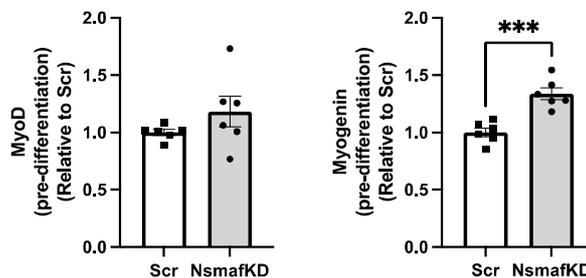
ウエスタンブロッティングおよび mRNA 分析は定法に従って行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Nsmf 発現抑制は筋芽細胞の分化を促進する

siRNA 導入により発現抑制された Nsmf が筋芽細胞に与える影響を検討するため、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて筋芽細胞を撮影した。その結果、対照群である Scr に比べて NsmfKD において筋芽細胞に特徴的な円に近い紡錘状の形態の細胞以外に細胞融合を示唆するような細長い形態の細胞が観察された。この結果は、筋分化への誘導をかけていないにも関わらず siRNA 処理によって筋細胞の分化が開始されたことを示唆している。

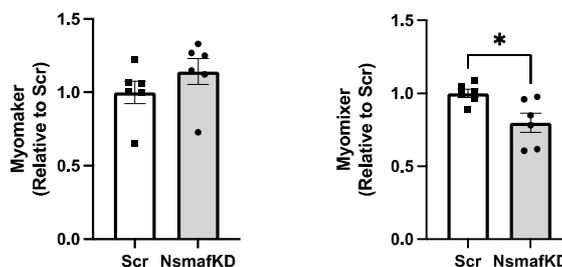
siRNA 処理による分化誘導をさらに確認するため、筋分化に關与する特異的なタンパク質 (myoD、myogenin) を分析した。MyoD は有意な変化は觀察されなかった。しかし、myogenin は対照群である Scr に比べて NsmafKD で有意に増加した (右図)。以上の結果は siRNA 処理によって筋芽細胞において筋分化が誘発された可能性を強く支持するものである。



### (2) Nsmaf 発現抑制は筋管細胞の融合を抑制することで直径を減少させる

siRNA 導入により発現抑制された Nsmaf が筋管細胞に与える影響を検討するためまず形態觀察を行った。その結果、対照群である Scr に比べて NsmafKD で筋管が細くなった傾向が觀察された。ImageJ を用いて筋管の直径を測定した結果、Scr に比べて NsmafKD で直径の有意な減少を示した。

NsmafKD 筋管細胞における形態変化をさらに検討するため、分化後発現する筋特異的タンパク質である Myosin Heavy Chain slow (MyHC slow) および、fast (MyHC fast) を分析した。また筋特異的細胞膜タンパク質である myomaker と myomixer も分析した。その結果、MyHC slow と fast では対照群である Scr に比べて NsmafKD で有意な増加が觀察された。また、myomaker はいずれも有意な変化は觀察されなかったが、myomixer は対照群である Scr に比べて NsmafKD で有意な減少が觀察された。

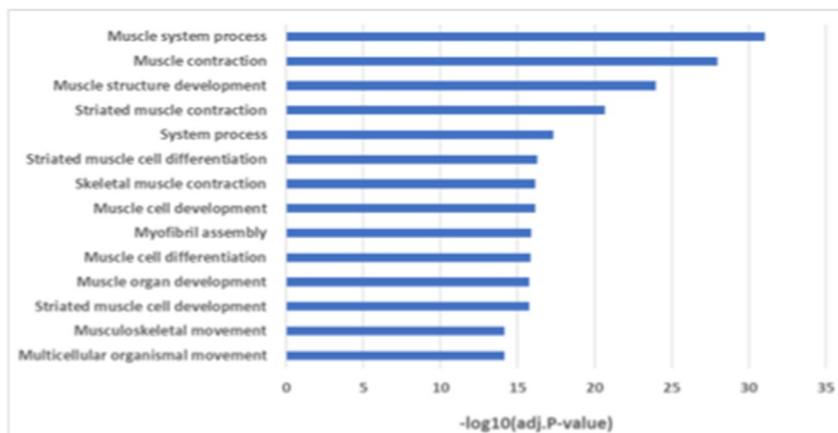


以上から、myomixer の有意な減少が筋形態に關与している可能性が強く示唆された。

### (3) Nsmaf ノックダウンは骨格筋形成を強力に誘導する

ここまでの検討により Nsmaf ノックダウンは筋細胞の分化を促進するが、筋管融合は抑制する可能性が示された。Nsmaf ノックダウンの影響をさらに確認するために RNAseq による転写物質の網羅解析を試みた。

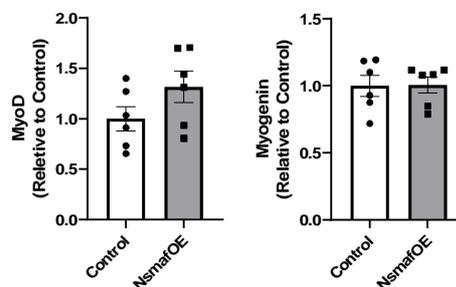
網羅解析の結果をもとにパスウェイ解析を行ったところ骨格筋形成に關わるパスウェイが軒並み増加している様子が確認できた (下図)。以上から Nsmaf は骨格筋形成に強い影響を与える因子であることを示唆している。



### (4) Nsmaf 過剰発現は筋管形態に影響を与えない

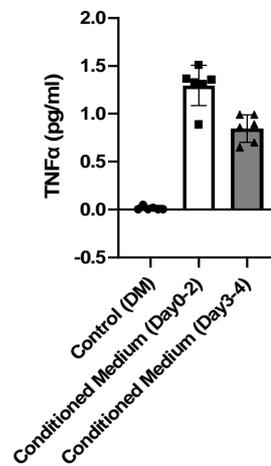
ここまでの検討で今回の研究によって新たに見出された Nsmaf は筋形態制御に強い影響を与えることが示唆された。Nsmaf が筋形態に与える影響を検討するため Nsmaf 過剰発現を行いその影響を検討した。過剰発現により骨格筋分化は強く抑制されるはずである。

SV40 プロモーター下流にマウス Nsmaf を連結したプラスミドを作成し C2C12 筋芽細胞に遺伝子導入を行った。結果的に Nsmaf mRNA 発現は約 40 倍増加したものの、筋転写因子 MyoD、Myogenin の発現は変化しなかった (右図)。



(5) 筋細胞培養上清中の TNF 濃度は亢進している

Nsmaf は炎症性サイトカイン TNF シグナルの下流にある。TNF は骨格筋を萎縮する作用があることが知られており、Nsmaf は TNF シグナルに関与することで骨格筋形態制御する可能性がある。そこで培地中の TNF 量を測定した。その結果、分化前 (Day0-2) および分化後 (Day3-4) においてともに TNF が上昇していることを確認した (右図)。したがって Nsmaf は TNF シグナルに関与することで骨格筋形態を制御している可能性が示唆された。



以上まとめると siRNA を用いた網羅的ノックダウンによってみつかった Nsmaf は TNF シグナルに関与することで骨格筋形態を制御する因子であることがわかった。その制御の様式は発現量が低下することで骨格筋分化を強く誘導するが、発現量が増加しても作用は起きないことが示唆され、自分自身が分化調節活性を持つというより TNF シグナルが存在するときに骨格筋分化作用といった表現系を表出させることが想定された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Uno Hiroyuki, Kamiya Shohei, Akimoto Ryuji, Hosoki Katsu, Tadano Shunta, Kouzaki Karina, Tamura Yuki, Kotani Takaya, Isemura Mako, Nakazato Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Low-frequency electrical stimulation of bilateral hind legs by belt electrodes is effective for preventing denervation-induced atrophies in multiple skeletal muscle groups in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-022-25359-z	査読の有無 無
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 Kotani Takaya, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kato Hikaru, Isemura Mako, Nakazato Koichi	4. 巻 133
2. 論文標題 Percutaneous electrical stimulation-induced muscle contraction prevents the decrease in ribosome RNA and ribosome protein during pelvic hindlimb suspension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 822 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00204.2022	査読の有無 無
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 Jee Eunbin, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 47
2. 論文標題 Effect of different types of muscle activity on the gene and protein expression of ALDH family members in C57BL/6J mouse skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	6. 最初と最後の頁 775 ~ 786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2022-0005	査読の有無 無
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 Jee Eunbin, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effect of different types of muscle activity on the gene and protein expression of ALDH family members in C57BL/6J mouse skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2022-0005	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 Kasai Akane, Jee Eunbin, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 322
2. 論文標題 Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency promotes skeletal muscle atrophy in aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R511 ~ R525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00304.2021	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中里浩一
2. 発表標題 NsmafはTNF シグナルによる筋形成抑制に関与する
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jung J, Sumi K, Kouzaki K, Tamura Y, Kotani T, Nakazato K.
2. 発表標題 Effects of neutral sphingomyelinase activation associated factor (Nsmaf) gene knock-down on myogenesis in murine C2C12 myoblast.
3. 学会等名 Experimental Biology
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
---------	---------