

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300224

研究課題名(和文) 運動によるサルコペニア予防・改善に関わるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Effect of exercise on histone modification in the aged-related muscle loss, sarcopenia

研究代表者

町田 修一 (Machida, Shuichi)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・准教授

研究者番号：40421226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、身体活動量の増減による骨格筋での後天的な遺伝子発現制御(エピジェネティクス)に着目して検討した。そして、持続的トレーニングを課した骨格筋やギプス固定による萎縮筋では、エピジェネティクス制御に変化が認められ、身体活動の増減による遺伝子発現制御が変化する可能性を見出した。また、単離した筋サテライト細胞の筋分化能が加齢に伴い変化する際、筋分化のマスター転写因子のMyoDと筋サテライト細胞の未分化性維持に関わるPax7の発現が後天的な遺伝子発現制御によって調整されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is the age-related loss of skeletal muscle mass and strength leading to physical frailty, loss of independent daily living, increased lifestyle-related disease, and high health care costs. However, the mechanisms of sarcopenia remain unclear. Exercise is well established as the most effective non-pharmacological intervention to prevent sarcopenia. This study examined the effect of physical activity or inactivity on histone modification in the skeletal muscle. Our results suggest that physical activity or inactivity induce epigenetic modification in the skeletal muscle.

研究分野：運動生理学

キーワード：エピジェネティクス 骨格筋幹細胞 筋萎縮 身体活動

## 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症機序の詳細については十分に解明されていない。サルコペニアは ADL (日常生活動作) や QOL (生活の質) の低下に加えて、基礎代謝の低下から生活習慣病に罹りやすくなるおそれがある。2014 年には 4 人に 1 人が 65 歳以上の本格的な高齢社会を迎える本邦において、ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するためには、ひとりひとりが高齢になっても自由に自立した生活を営めることが鍵となる。したがって、加齢に伴うサルコペニア発症のメカニズムを解明し、その改善および予防のための対策を講じることは今後益々重要になると思われる。

骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし、加齢に伴い筋再生能は低下する。サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷からの再生が補いきれないために顕在化するという考えがある。骨格筋は、多核の筋線維から構成されているが、筋線維の筋筋質膜と基底膜の間には筋サテライト細胞と呼ばれる単核の細胞が存在する。骨格筋が損傷等を受けると、筋サテライト細胞は増殖因子やサイトカイン等の刺激で活性化されて増殖を開始し、筋前駆細胞(筋芽細胞)となる。増殖した筋サテライト細胞は、互いに、あるいは既存の筋線維と細胞融合することによって筋再生を促す。そのため、筋の再生能力の大半は筋サテライト細胞によって担われていると考えられ、骨格筋の再生において重要な役割を担っている。しかし、筋サテライト細胞は加齢に伴い数(量的)および諸機能(質的)が低下することが知られており、現時点では、筋サテライト細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構は多くが未解明である。

我々はこれまで、ヒトのサルコペニアと類似した表現型を示す加齢実験動物(ラットやマウス)を用いて、筋サテライト細胞の増殖および分化能が加齢に伴い低下することや、高齢期の骨格筋では、筋損傷後の再生過程で脂肪蓄積が顕著に認められることを報告してきた。さらに、高齢期の骨格筋より単離した筋サテライト細胞では、若年期筋サテライト細胞と比較して、脂肪細胞に分化転換する可能性が高いことを *in vitro* レベルで報告してきた。

加齢に伴う骨格筋量の低下は、身体活動量レベルや栄養摂取状況といった環境要因が重要であることを言うまでもない。また、最近では、サルコペニアと関連する遺伝子多型が報告され、骨格筋量に及ぼす遺伝的要因についても注目されている。その一方で、身体活動や栄養環境などの外的要因(環境因子)

によって、塩基配列の変化を伴わない後天的なゲノム修飾(DNA メチル化やヒストンアセチル化など)によるエピジェネティックな遺伝子発現制御のメカニズムが注目されている。介護・寝たきり予防改善の観点から、中高齢者における運動トレーニングが積極的に推奨されている。我々の最近の研究成果も含め(1)、多くの先行研究によって、筋サテライト細胞数が運動トレーニングによって量的に増加することが報告されている。しかし、運動トレーニングが筋サテライト細胞数を増加させるメカニズム、さらに増殖能、筋分化能、多分化能(脂肪細胞への分化転換)等の諸機能に及ぼす影響については明らかにされていない。筋細胞が分化し多核の筋管細胞を形成する際に、グローバルな脱メチル化が生じ、骨格筋分化誘導マスター制御因子である MyoD が発現されることが分かっている。そのため、骨格筋の幹細胞である筋サテライト細胞が、加齢や運動の環境因子によってどのように影響されるのか、エピジェネティックな遺伝子発現制御の観点から検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

高齢期骨格筋の特徴として、骨格筋量の低下と共に、筋肉内脂肪量が増加することが知られている。本研究では、高齢期骨格筋で認められる筋損傷後の再生能の低下や脂肪蓄積に対する事前の運動トレーニングの予防効果について、骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞の後天的な遺伝子発現制御(エピジェネティクス)に着目して検討する。すなわち、運動習慣の有無が筋サテライト細胞にトレーニング効果として塩基配列の変化を伴わない遺伝情報として記憶(メモリー)されていることにより、筋再生能の改善に寄与するという仮説について分子、細胞、組織レベルで検討し、高齢者における運動機能の低下予防に役立てようとするのが本研究の主たる目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、筋サテライト細胞を用いて遺伝子発現制御を検討するための培養条件の確立と筋サテライト細胞数を増加させる走トレーニング条件について若年期ラットを用いて検討した。走トレーニングは雄性ラットに週 5 日の頻度で 10 週間実施させ、トレーニング終了後、足底筋を摘出し、凍結切片を作成し、筋サテライト細胞(Pax7)やマクロファージ(ED1)を特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。また、不活動のモデルとして、ギプス固定を施すことにより筋萎縮を誘導し、摘出した骨格筋から細胞質および核タンパク質を分画抽出し、

HDAC4, 5 および 6 のそれぞれの発現量を分析した。

運動トレーニングが筋サテライト細胞の増殖能を改善するメカニズムを明らかにするために、運動によって骨格筋から分泌されると予想される因子、IL-6 が筋サテライト細胞の増殖能に及ぼす影響について、in vitro レベルで検討した。若年期ラットの下肢筋（下肢骨筋（腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋、前頸骨筋、長趾伸筋、大腿四頭筋））を摘出し、プロテアーゼ処理後、低速にて遠心した上清画分から低接着性の細胞を回収し、培養実験に用いた。筋サテライト細胞単離後、異なる濃度の IL-6 をそれぞれ培地に添加し、BrdU 法および細胞数によって細胞増殖能を評価した。

さらに、高齢期骨格筋で認められる筋肉内脂肪蓄積における性差の影響について、筋サテライト細胞の機能、特に多分化能に着目して検討した。脂肪細胞への分化転換能については脂肪分化誘導条件下（デキサメタゾン、IBMX、インスリンを含む）6 日間培養後の細胞の形態変化、オイルレッド-O 染色像を雌雄間で比較した。筋分化能については筋分化誘導条件下（2% 馬血清を含む）7 日間培養後の形態変化、ミオシン重鎖の免疫染色像で検討した。また、筋サテライト細胞の筋分化能に関わる転写因子の発現様式について、筋分化や未分化性維持に関わる転写因子の発現は免疫染色法によって検討した。

#### 4. 研究成果

10 週間の運動トレーニングによって、足底筋の筋サテライト細胞数が有意に増加した。しかし、免疫細胞であるマクロファージの数については、10 週間の運動トレーニングの影響は認められなかった。これらの研究成果より、ランニングトレーニングによって筋サテライト細胞数が増加するトレーニング条件（運動強度や運動時間）を確立できた。

次に、持久的トレーニングを課した骨格筋やギプス固定による萎縮筋から核タンパク質を抽出し、ヒストン脱アセチル化酵素タンパク質（HDAC4）が身体活動の増減による遺伝子発現制御に寄与する可能性を見出した。

単離した筋サテライト細胞を脂肪細胞分化誘導条件下で培養すると、典型的な脂肪細胞様の形態を示し、細胞内にオイルレッド-O で染色される脂肪滴を蓄積する細胞の割合が増加した。筋サテライト細胞は雌雄共に脂肪細胞への分化転換能を有していること、脂肪細胞への分化転換率は同等もしくは雌性でやや高いことが確認された。筋サテライト細胞を筋分化条件下で培養すると、細胞間の融合が起こり多核の筋管様の形態を示す細胞が増加した。これらはミオシン重鎖を発現

しており筋分化した細胞であることを確認した。単位面積あたりの筋管細胞数は雌性よりも雄性で多かった。また、単離した筋サテライト細胞の筋分化能が加齢に伴い変化する際、筋分化のマスター転写因子の MyoD と筋サテライト細胞の未分化性維持に関わる Pax7 の発現が後天的な遺伝子発現制御によって調整されている可能性が示唆された。特に、筋分化培地培養 16 時間後における筋分化や未分化性維持に関わる転写調節因子の発現の結果、MyoD は雄性細胞で発現している割合が多く、筋芽細胞の分化に関わる myogenin の発現には明瞭な性差が認められないこと、さらに、筋サテライト細胞の未分化性維持に関わる Pax7 は雄性細胞よりも雌性細胞で高い割合で発現していた。

今回得られた結果は、筋サテライト細胞の筋分化刺激への応答能に認められる雌雄間の差が、筋分化制御に関わる転写因子群の発現の違いに起因している可能性が考えられた。特に、雌性細胞で観察された Pax7 を発現している細胞では、筋分化を促進する同一培養条件下にも関わらず分化抑制の状況を維持していることが考えられ、性ホルモン以外の要因が骨格筋幹細胞における筋分化能の性差に寄与している可能性を示唆した。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci.* 66: 337-343, 2016. (査読有)

Itaka T, Agemizu K, Aruga S, Machida S. The G allele of the IGF2 Apal polymorphism is associated with judo status. *J Strength Cond Res.* 30: 2043-2048, 2016. (査読有)

町田修一, 船越智子. 骨格筋再生と老化制御 筋サテライト細胞の役割. サテライト細胞とサルコペニア. *基礎老化研究* 40: 13-17, 2016. (査読有)

Ozaki H, Abe T, Mikesky AE, Sakamoto A, Machida S, Naito H. Physiological stimuli necessary for muscle hypertrophy. *J Phys Fitness Sports Med.* 4: 43-51, 2015. (査読有)

Kurosaka M, Machida S. Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated through induction of signal downstream target Cyclin D1 of JAK2/STAT3 signaling pathway. *Cell Proliferation*, 46: 365-373, 2013.

Kurosaka M, Naito H, Ogura Y,

**Machida S**, Katamoto S. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. Acta Physiologica, 205: 159-166, 2012.

Kurosaka M, **Machida S**. Exercise and skeletal muscle regeneration. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 1: 537-540, 2012.

〔学会発表〕(計 25 件)

〔招待講演〕

**町田修一**, サルコペニアのメカニズム解明とその対策 - 骨格筋幹細胞からのアプローチ -, 第 38 回日本基礎老化学会大会シンポジウム, 横浜, 2015 年 6 月.

**町田修一**, 培養細胞から見てきた骨格筋の性差, 第 70 回日本体力医学会大会シンポジウム, 和歌山, 2015 年 9 月.

**町田修一**, サルコペニアの分子メカニズム解明と新規予防法の開発, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」班会議, 東京, 2015 年 12 月.

〔国際学会〕

Nozaki R, Takagi K, Nakano D, Fujii T, **Machida S**. Differential protective effects of radix astragali, herbal medicine, on immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. 2016 Advances in Skeletal Muscle Biology in Health and Disease Conference, Florida, USA, 2016 年 1 月.

Funakoshi T, Otsuka Y, Izumo T, Shibata H, **Machida S**. Quercetin inhibits the adipogenesis of muscle satellite cells. The 6th International Conference on Food Factors, Seoul, Republic of Korea, 2015 年 11 月

Yoshihara T, **Machida S**, Kurosaka Y, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T, Takamine Y, Sugiura T, Naito H. Immobilization-induced rat skeletal muscle atrophy enhances histone modification through HDAC4. Experimental Biology 2015, Boston, USA, 2015 年 3 月

Yoshihara T, Kurosaka M, Kakigi R, Takamine Y, **Machida S**, Sugiura T, Naito H. Alterations in HDACs expressions in response to endurance training in rat plantaris muscle. The American College of Sports Medicine 61th Annual Meeting, Florida, USA, 2014 年 5 月

〔国内学会〕

吉原利典, 柿木亮, 関根紀子, 都築孝允, 高嶺由梨, **町田修一**, 内藤久土. 発育期の運動がラット骨格筋の HDAC 発現量に及ぼ

す影響. 第 22 回日本健康体力栄養学会, 千葉, 2015 年 3 月

〔図書〕(計 2 件)

**町田修一**(分担執筆). 運動, 老化の生物学(石井直明編集). p273-286, 化学同人, 東京, 2014 年 8 月.

内藤久土, **町田修一**, 吉原利典(分担執筆). Section 5 運動と筋 - 4 骨格筋の肥大と萎縮, ニュー運動生理学(I) (宮村実晴編). p224-33, 真興交易株式会社医書出版部, 東京, 2014 年 9 月.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:筋脂肪化抑制剤

発明者:町田修一, 他 2 名

種類:特許

番号:特願 2015-090580

出願年月日:2015 年 4 月 27 日

国内外の別:国際特許分類 A61K

取得状況(計 1 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 修一(MACHIDA, Shuichi)

順天堂大学大学院・スポーツ健康科学研究科・先任准教授

研究者番号:40421226

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし