

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282202

研究課題名(和文)細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の制御による筋肥大促進機構の解明/新規筋萎縮予防療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of skeletal muscle hypertrophy by intracellular calcium concentration.

研究代表者

武田 伸一 (TAKEDA, SHIN'ICHI)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・部長

研究者番号：90171644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮はガン、腎不全、エイズ、敗血症および糖尿病を含む様々な疾患により生ずる。また近年、高齢化社会を迎えた我が国では、加齢、寝たきりや骨折に伴う筋活動の低下により生じる筋萎縮は、深刻な問題となっている。申請者は細胞内カルシウム濃度に注目した筋肥大促進機構を明らかにする事により、筋萎縮に対する新規治療/予防法の開発を目指した。その結果、細胞外のATPが細胞内カルシウム濃度を介したmTOR、MAPKの活性化を介して、筋肥大を促進する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle atrophy occurs in ageing, and several pathological conditions including cancer, renal failure, AIDS, sepsis and diabetes. We aim to elucidate the molecular mechanisms of muscle hypertrophy by focusing on the intracellular calcium concentration, which will lead to the development of novel therapy for muscle atrophy. As a results, we elucidated that extracellular ATP promoted muscle hypertrophy by increasing intracellular calcium concentration and subsequent activation of mTOR and MAPK.

研究分野：骨格筋筋肥大・筋萎縮

キーワード：筋肥大 筋萎縮 カルシウム nNOS NO ATP P2Y IP3R

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は自身の活動状態に応じ、環境に適した筋重量を維持している。筋萎縮はガン、腎不全、エイズ、敗血症および糖尿病を含む様々な疾患により生ずる。また近年、高齢化社会を迎えた我が国では、加齢、寝たきりや骨折に伴う筋活動の低下により生じる筋萎縮は、深刻な問題となっている。

骨格筋重量の制御に関する多くの研究が成されてきたが、その多くは遺伝子工学的に細胞内シグナル分子を過剰発現、もしくはノックアウトするものであった。これらの研究は筋肥大、筋萎縮を制御し得る細胞内シグナル経路を大筋として明らかにしたが、筋活動状況を反映し、下流シグナル経路を制御する上流分子・メカノセンサーは未解明な部分が多い。特に、運動・不動に伴う生理的な環境と細胞内シグナル経路の活性化の機構は十分に明らかにされたとは言えない。

申請者は、骨格筋への負荷が TRPV1 を介した細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を制御することで筋肥大を促進することを明らかにした (Ito N *et al*, *Nature Medicine*, 2013)。このことは、 $[Ca^{2+}]_i$  を制御することにより、筋肥大が促進され、新たな筋萎縮予防/治療法が開発され得ることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、 $[Ca^{2+}]_i$  を主点とした、新規筋萎縮予防/治療薬の開発およびその臨床応用にある。そのために 1) 筋小胞体に局在する  $Ca^{2+}$  チャンネルの活性化によっても mTOR が活性化し、筋肥大が促進されることを明らかにし、2)  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇により誘起される転写ネットワークを詳細にし、3) 単一筋線維を用いた *in vitro*  $Ca^{2+}$

イメージングにより新規薬剤候補を探索・およびその治療効果を検討する。

## 3. 研究の方法

1) IP3 受容体の上流に位置する ATP/UTP による  $[Ca^{2+}]_i$  の制御を主点とした筋肥大促進機構の解明を行う。このことにより申請者がこれまでに明らかにした TRPV1 の活性化のみならず、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇により筋肥大が促進されるというより普遍的な  $[Ca^{2+}]_i$  と筋肥大との関係を確立する。

2) TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンによる TRPV1 の活性化、ATP による IP3 受容体の活性化によって起こる遺伝子発現の変化と、運動負荷により生じる遺伝子発現の変化を比較・解析し、 $[Ca^{2+}]_i$  依存的に制御される転写ネットワークを明らかにする。

3)  $[Ca^{2+}]_i$  を指標とした薬剤スクリーニングを行うことにより、 $[Ca^{2+}]_i$  の制御を主点とした新規筋萎縮治療法の開発を目指し、その治療効果の検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) 細胞外の ATP は GPCR の一種である P2Y 受容体と結合し、筋小胞体に局在する  $Ca^{2+}$  チャンネルである IP3 受容体を活性化することで、 $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させる。申請者は細胞外の ATP が、IP3 受容体からの  $Ca^{2+}$  放出を促進し、mTOR を活性化し、筋肥大を促進するという仮説を立てた。その結果、マウス筋芽細胞株である C2C12 を ATP および UTP にて処理することにより、IP3R 依存的な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が起こり、 $[Ca^{2+}]_i$  依存的に mTOR が活性化することを明らかにした。また、siRNA 用いた gene knockdown および各シグナル経路の阻害剤を用いた結果、ATP/P2Y/IP3 受容体経路による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇、およびその後の mTOR の活性化は Akt を介するものとは

異なることがわかった。また *in vitro* で得られた ATP の結果を *in vivo* で検証するため、ATP を骨格筋に投与した結果、筋肥大が促進された。また、後肢懸垂・除神経による筋萎縮モデルにおいて ATP を投与した結果、筋萎縮が軽減された。

(2) また申請者は *in vivo* における TRPV1 アゴニストであるカプサイシン投与、また *in vitro* における ATP 処理により、mTOR のみならず、Erk1/2 および p38 MAPK のリン酸化が亢進される結果を得た。このことは、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇により、様々なシグナル経路が同時に活性化されることを示唆しており、mTOR 経路の活性化によるタンパク質合成・翻訳のみならず、MAPK 経路の活性化による mRNA 転写も、 $[Ca^{2+}]_i$  によって制御されることを示唆している。

そこで申請者は、運動負荷依存的な遺伝子発現変化と、カプサイシン投与・ATP 投与により生じる遺伝子変化を網羅的に比較・解析し、 $[Ca^{2+}]_i$  依存的な転写ネットワークの同定を試みた。トレッドミルランニング装置を用いたエクササイズ運動負荷をかけたマウス、または筋肥大誘導モデルである共働筋切除を行ったマウスを運動負荷群とし、カプサイシンまたは ATP を投与したマウスを薬剤投与群とし、負荷・薬剤投与後の遺伝子発現変化を DNA アレイ解析(Agilent)にて網羅的に解析した。その結果、運動負荷依存、カプサイシン、ATP 全てにおいて発現が上昇した遺伝子を同定し、そのいくつかは  $[Ca^{2+}]_i$  依存的な Erk1/2 および p38 MAPK の活性化の下流にあることを *in vitro* において明らかにした。

上記の結果は、 $[Ca^{2+}]_i$  と筋肥大とが密接に結びついていることを示しており、薬理学的手法により  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させることで、人為的に筋肥大を誘導・筋萎縮を軽減できることを示唆している。今後、TRPV1、IP3R 以外に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させ、mTOR を活性化しうる分子を探索することで、より普遍的な  $[Ca^{2+}]_i$  と筋肥大との関係を明らかにしていく。

#### 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 9 件)

1. Shimbo M, 他 37 名, Ito N, Takeda S, Takahashi S: Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Experimental Animals*. 査読有, 2016 Jan 28  
<https://www.jstage.jst.go.jp/result>
2. Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S: Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Reports*. 査読有, 13:302-314, 2015.  
doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.083.
3. Mizuno S, Yoda M, Shimoda M, Tohmonda T, Okada Y, Toyama Y, Takeda S, Nakamura M, Matsumoto M, Horiuchi K: A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Is Indispensable for Maintenance of the Muscle Satellite Cell Pool. *The Journal Biological Chemistry*. 査読有, 290:28456-28464, 2015.  
doi: 10.1074/jbc.M115.653477.
4. Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Ito N,

- Kikura N, Fukada SI, Okano H, Takeda S, Akazawa C: Muscle Satellite Cell Protein Teneurin-4 Regulates Differentiation During Muscle Regeneration. Stem Cells. 査読有, 2015 May 26.  
doi: 10.1002/stem.2058.
5. Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schütz G, Takeda S, Tanaka H: A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodeling. Nature Communications. 査読有, 6: 6693, 2015  
doi: 10.1038/ncomms7693.
  6. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, Kusumoto D, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, Endo J, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K: G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. Nature Communications. 査読有, 6: 6745, 2015  
doi: 10.1038/ncomms8295.
  7. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca<sup>2+</sup>シグナルが筋肥大を促進する. 日本生理人類学会誌, 査読無 19(3) :179-183, 2014.  
[http://ci.nii.ac.jp/vol\\_issue/nel/AN1052804X/ISS0000506195\\_ja.html](http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nel/AN1052804X/ISS0000506195_ja.html)
  8. 伊藤尚基, 武田伸一: 神経型一酸化窒素により誘起される TRPV1 を介した Ca<sup>2+</sup>シグナルは骨格筋肥大を促進する. 月刊実験医学, 査読無, 31(6) 901-904, 2013  
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100946/index.html>.
  9. Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Capsaicin mimics mechanical load-induced intracellular signaling events: Involvement of TRPV1-mediated calcium signaling in induction of skeletal muscle hypertrophy. Channels (Austin). 査読有, 2013 May-Jun;7(3):221-4.  
doi: 10.4161/chan.24583. Epub 2013 Apr 12.
- 〔学会発表〕(計 25 件)
1. 伊藤尚基, 清水宣明, 田中廣壽, 武田伸一: 負荷依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および mTOR の活性化が筋肥大を促進する. 第 29 回宇宙生物科学学会大会, 東京, 9.26, 2015
  2. 谷端 淳, 永田哲也, 伊藤尚基, 青木吉嗣, 齊藤 崇, 中村昭則, 武田伸一: 筋ジストロフィー病態における細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態の解明と新たな治療法の開発. 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山, 9.18, 2015
  3. Tanihata J, Takeda S: Cytosolic Ca<sup>2+</sup> dynamics through the SR is associated with pathology of muscular dystrophy. 12th Meeting of Bone Biology Forum, Chiba, 8.22, 2015
  4. 谷端 淳, 永田哲也, 伊藤尚基, 齊藤 崇, 青木吉嗣, 武田伸一: 筋ジストロフィー病態における筋小胞体を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態の解明. 第 1 回日本筋学会学術集会, 東京, 8.8, 2015
  5. 伊藤尚基, 清水宣明, 田中廣壽, 武田伸一: Ca<sup>2+</sup>シグナルによって誘起される

- mTOR の活性化が筋肥大を促進する. 第33回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会企画シンポジウム 筋・腱・靭帯シンポジウム, 東京, 7.25, 2015
6. Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Low intensity training of mdx mice skeletal muscle: impact on protein expression, carbonylation and inflammatory statute. EMBO Workshop, Molecular mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease, Ascona, Switzerland, 9. 22, 2015
  7. Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Aoki Y, Nakamura A, Takeda S: Cytosolic Ca<sup>2+</sup> dynamics through the SR is associated with pathology of muscular dystrophy. New advances in treatments of neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology, 10<sup>th</sup> Japanese-French Workshop, Paris, France, 7.2, 2015
  8. 武田伸一: 運動器としての骨格筋の肥大と萎縮の分子機構. 第15回徳島 Bone Forum, 徳島, 10.29, 2015
  9. 武田伸一: 日本の骨格筋学の過去、現在、そして未来. 第1回日本筋学会学術集会会長講演, 東京, 8.8, 2015
  10. Takeda S: Therapeutic approaches to muscle diseases. Hommage à François Gros 90<sup>ème</sup> anniversaire, Paris, France, 4.24, 2015
  11. 武田伸一: 筋萎縮と筋肥大の新たな分子機構 - nNOS/NO の役割. 愛媛大学プロテオサイエンスセンター PROS セミナー & 大学院特別講義, 愛媛, 2.5, 2015
  12. 武田伸一, 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 伊藤尚基, 青木吉嗣, 中村昭則: Exon45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンは nNOS の局在を変化させ RyR1 をニトロシル化し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させる. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5「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」(主任研究者: 武田伸一) 平成 26 年度班会議, 千代田, 東京, 12.3, 2014
  13. Urs Ruegg, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Activation of calcium signalling by nNOS and TRPV1 as key triggers of skeletal muscle hypertrophy. WCP 2014 17<sup>th</sup> World Congress of Basic & Clinical Pharmacology. poster presentation, Cape Town, South Africa, 7.13, 2014
  14. 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療法の現状. 第6回東海神経筋疾患懇話会, 名古屋, 愛知, 10.31, 2014
  15. Takeda S: The molecular mechanisms of skeletal muscle hypertrophy and atrophy -nNOS is a physiological regulator of muscle mass-. 11th Meeting of Bone Biology Forum, Fuji Institute of Education and Training, 8.22, 2014
  16. Takeda S: Molecular mechanism of muscle hypertrophy; our current attempt to do exon skipping clinical trial. Seminar at The Ohio State University College of Medicine, Columbus, Ohio, USA, 5.27, 2014
  17. 武田伸一, 伊藤尚基, Urs Ruegg, 鈴木友子: Ca<sup>2+</sup>シグナルによって誘起される mTOR の活性化が筋肥大を促進する. 国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費 25-5「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」(主任研究者: 武田伸

- 一)平成 25 年度班会議,東京,12.9, 2013
18. 伊藤尚基, Urs Ruegg, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca<sup>2+</sup>シグナルが筋肥大を促進する. 第 8 回筋ジストロフィー治療研究会合同発表会, 有馬, 11.2, 2013
19. 伊藤尚基, 工藤 明, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca<sup>2+</sup>シグナルが筋肥大を促進する. 第 36 回分子生物学会, 神戸, 12.4, 2013
20. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素により誘起される Ca<sup>2+</sup>シグナルが筋肥大を促進する. 日本生理人類学会第 69 回大会, 京都, 10.27, 2013
21. 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) により誘起される Ca<sup>2+</sup>シグナルが筋肥大を促進する. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 9.22, 2013
22. 鈴木友子: 「NO (一酸化窒素) は骨格筋の肥大及び委縮の制御因子である」. 第 68 回日本体力医学会「第 30 回筋肉の会」, 東京, 9.20, 2013
23. Ito N, Kudo A, Suzuki Y, U Ruegg, Takeda S: Activation of calcium signalling through TRPV1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. EMBO Workshop Molecular mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease, Ascona, Switzerland, 9.18, 2013
24. Takeda S: The molecular mechanism of muscle hypertrophy;

- roles of TRPV1. The 91<sup>st</sup> Annual meeting of the physiological Society of Japan, Kagoshima, Japan, 3.17, 2014
25. Takeda S: The molecular mechanism of muscle hypertrophy; roles of nNOS/NO, peroxynitrite and TRPV1. EMC 2013 42nd European Muscle Conference, Amsterdam, Netherland, 9.21, 2013
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)  
名称: 筋増加剤及びそれを含む医薬組成物  
発明者: 武田伸一, 伊藤尚基, Urs Ruegg, 鈴木友子  
権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/052016  
出願年月日: 2014 年 1 月 30 日  
国内外の別: 外国

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武田 伸一 (TAKEDA SHIN'ICHI)  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長  
研究者番号: 90171644

##### (2) 研究分担者

鈴木 友子 (SUZUKI YUUKO)  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長  
研究者番号: 00342931

青木 吉嗣 (AOKI YOSHITSUGU)  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 室長  
研究者番号: 80534172