

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882024

研究課題名(和文)筋インスリン抵抗性に対するnotch2の作用機序及び運動・食事との相互作用の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of Notch2 for insulin resistance in skeletal muscle and its association with exercise and diet

研究代表者

増田 慎也(MASUDA, Shinya)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・産学官連携研究員

研究者番号：80638403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：最終分化を遂げた筋線維におけるNotch2シグナルの機能を解明するため、筋線維特異的Notch2細胞内ドメイン過剰発現マウス(N2ICD-Tgマウス)を作製した。N2ICD-Tgマウスは糖負荷試験中の血糖値が高い傾向にあり、また速筋に筋萎縮を示した。Notch1-4遺伝子のうち、Notch2のみが筋線維に発現した。Notch2遺伝子はサテライト細胞を枯渇させた単離筋線維にも発現することから、検出されたNotch2遺伝子はサテライト細胞由来ではなく、分化した筋線維由来であることが示された。Notch2シグナルの恒常的活性による骨格筋量の低下は、低い耐糖能につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate functional roles of Notch2 signaling in fully-differentiated myofibers, we generated transgenic mice overexpressing intracellular domain of Notch2 specifically in myofibers (N2ICD-Tg mice). Glucose tolerance test revealed that N2ICD-Tg mice tended to show higher blood glucose level compared to control mice. N2ICD-Tg mice exhibited muscle atrophy in fast-type muscle. We examined the expression of Notch1-4 genes in myofibers isolated from whole muscle tissues, and found that only Notch2 gene was expressed in myofibers. Notch2 gene was also expressed in the isolated myofibers in which satellite cells were depleted, indicating that the detected Notch2 genes derived from differentiated myofibers instead of satellite cells. Constitutively activated Notch2 signaling induced skeletal muscle atrophy, which could be concerned with less glucose tolerance.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：Notch 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

過去のゲノムワイドな疫学研究において、2 型糖尿病患者の *NOTCH2* 遺伝子をコードする DNA 領域近傍に一塩基多型(SNP)が存在し、骨格筋やすい臓で *NOTCH2* 遺伝子発現が非糖尿病患者と異なることから、*NOTCH2* 遺伝子が 2 型糖尿病の発症にかかわる可能性が示唆されてきた。Notch シグナルは幹細胞の維持・分化の調節にかかわることが知られているものの、分化した骨格筋線維の機能における役割は全く分かっていなかった。

骨格筋におけるインスリンによる糖取り込みは、全身の糖取り込みの約 80-90%を占めるとされており、インスリンの血糖降下作用の主要な役割を担う臓器である。生活習慣病である 2 型糖尿病はインスリンの作用が減弱する「インスリン抵抗性」を発端としている。体重の約 4 割を骨格筋が占めることから、骨格筋のインスリン感受性を維持・増強することは、2 型糖尿病の予防に有用な方策であると考えられた。

2. 研究の目的

上記ゲノムワイド疫学研究を鑑み、本研究は、骨格筋特異的 Notch2 遺伝子改変マウスを用い、「Notch2 は骨格筋インスリン感受性の低下させる」という仮説を検証するとともに、運動トレーニングや食事が Notch2 由来のインスリン感受性を改善する可能性を追求することを目的とした。

また、これまで Notch シグナルは幹細胞分野での研究が主となっており、成熟した組織細胞における存在の有無や機能に関しては明らかとなっていない。本研究では現在までに報告されている Notch1-4 のうち、どれが成熟した骨格筋細胞に存在するのか明らかにするとともに、その細胞内での機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖負荷試験: マウスを 16 時間絶食させた後、体重 1g あたり 1mg グルコースを腹腔内投与し、0, 30, 60, 120 分後に尾部から採血し血糖値を測定。

(2) 運動負荷試験: 15 度の上り勾配をつけたトレッドミルでマウスを走行させ、走行可能時間を計測した。トレッドミルの速度は 3 分ごとに 1m/min ずつ増加させた。

(3) グリップテスト: 水平に設置した網上にマウスを置き、尾部を静かに水平に引き、マウスが網に掴めなくなったときに加えた力をマウスの握力とした。10 回連続試行を 3 セット行い、各セットの最大値の平均値を求めた。

(4) Pax7:DTA マウスの作製: タモキシフェンを作用させることで筋サテライト細胞特

異的にジフテリアトキシン A を発現させ、筋サテライト細胞を特異的に死滅させることができるマウス。

(5) Notch2 細胞内ドメイン過剰発現マウス (N2ICD-Tg マウス)の作製: ドキシサイクリンを作用させることで、骨格筋細胞特異的に Notch2 細胞内ドメインを過剰発現させることができるマウス。

(6) 単一筋線維の単離: 両端の腱を切断して摘出した長指伸筋および足底筋をコラゲナーゼを含んだ細胞培養液でインキュベーションし、細胞外マトリクスの主成分であるコラーゲンを分解し、実体顕微鏡下でスポイトを用いて無傷の単一筋線維を採取。

(7) サテライト細胞の採取と筋管細胞への分化誘導: (6)で採取した単一筋線維を培養することでサテライト細胞が筋線維の外に遊走し増殖する。増殖したサテライト細胞を低血清下で培養することで筋管細胞へと分化する。

(8) マウス下肢の除神経: 麻酔下で外側広筋を切開し、坐骨神経を 3mm 除去した後、外側広筋と皮膚を縫合した。対照マウスには擬似手術を行った。

(9) マウス後肢懸垂: マウスを尾部から懸垂し、後肢が着地しない状態で保持した。マウスが前肢のみで自由に行動し、餌と水を自由摂取できるように懸垂器具を調節した。

4. 研究成果

(1) N2ICD-Tg マウスと野生型マウスに糖負荷試験を行ったところ、前者は後者に比べて耐糖能が低い傾向が認められた (Fig. 1)。

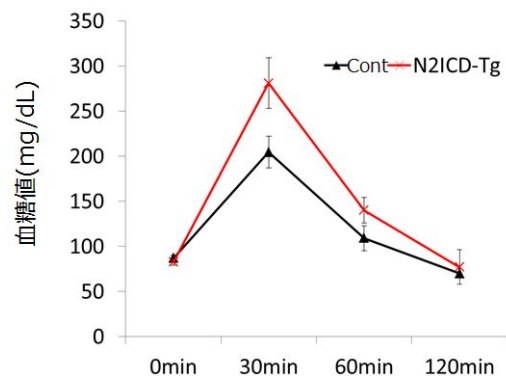


Fig. 1 グルコース負荷試験の結果

(2) N2ICD-Tg マウスと対照マウスに運動負荷試験を行い、走行時間を比較したが、両群の間に有意差は認められなかった。また、グリップテストによって握力を比較したが、両群の間に有意差は認められなかった。

(3) 筋線維特異的 N2ICD-Tg マウスの骨格筋重量を測定したところ、対照マウスに比べて前脛骨筋・咬筋・腓腹筋など速筋線維比率の高い筋に有意な重量の低下が認められた(Fig. 2(a))。一方、速筋線維比率の低いヒラメ筋には筋重量の低下が認められなかった(Fig. 2(b))。N2ICD-Tg マウスの前脛骨筋の筋横断面切片において、ラミニン免疫染色を施し筋線維横断面積を測定したところ、対照マウスの筋線維横断面積に比べて有意に小さかった。さらに、長指伸筋をコラゲナーゼ処理し単一筋線維を採取し、DAPI 染色を行い、筋線維上の細胞核数を計測したところ、N2ICD-Tg マウスと対照マウスとの間で有意差は認められなかった。また、N2ICD-Tg と対照マウスの前脛骨筋横断面の凍結切片に type IIa, IIb ミオシン重鎖免疫組織染色を施し、筋線維組成の計測および形態的特徴の観察を行った。N2ICD-Tg マウスの筋線維組成は type IIb 線維の割合が少なく、type IIa 線維の割合が多い傾向にあった(Fig. 2(c))。また、type IIb 線維が多い筋表層部の面積は N2ICD-Tg マウスでは対照マウスに比べて顕著に小さく、type IIa/x 線維が多い筋深層部の面積については両者で大きな違いがなかった。以上のことから、骨格筋細胞の Notch2 シグナルの恒常的な活性化によって主に type IIb 線維が萎縮することが示唆された。

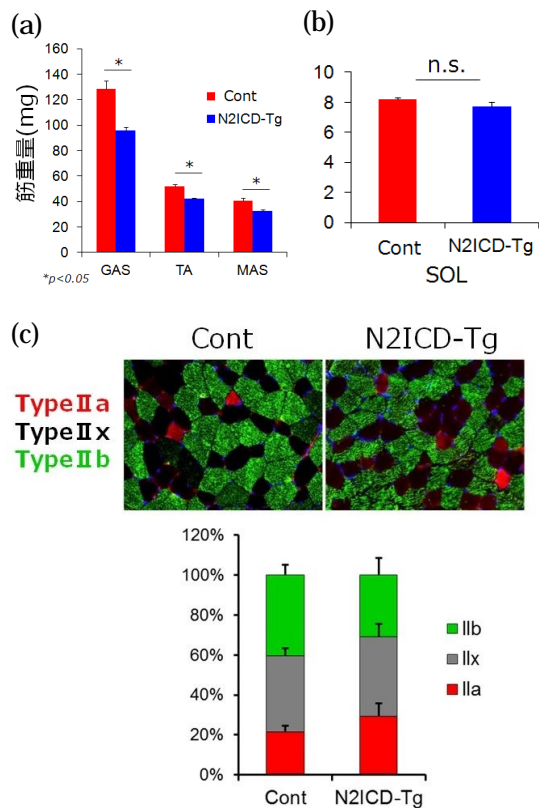


Fig. 2 (a) 腓腹筋(GAS)・前脛骨筋(TA)・咬筋(MAS)の筋重量 (b) ヒラメ筋(SOL)の筋重量 (c) TAの筋線維タイプ比率

(4) 対照マウスの解剖直後に凍結処理した足

底筋の Notch1-4 遺伝子発現の有無を調べたところ、全ての Notch 遺伝子が検出された。ところが、対照マウスの足底筋をコラゲナーゼ処理して採取した単離筋線維では Notch2 遺伝子のみが検出された。また、Pax7:DTA マウス(サテライト細胞枯渇マウス)の単離筋線維においても Notch2 遺伝子のみ発現が確認された(Fig. 3(a))。ところが、単離筋線維の Notch2 タンパク質は検出されなかった(Fig. 3(b))。以上のことから、成熟骨格筋線維においては、Notch1-4のうち Notch2 遺伝子のみが発現しているが、タンパク質レベルでは存在していないことが示唆された。

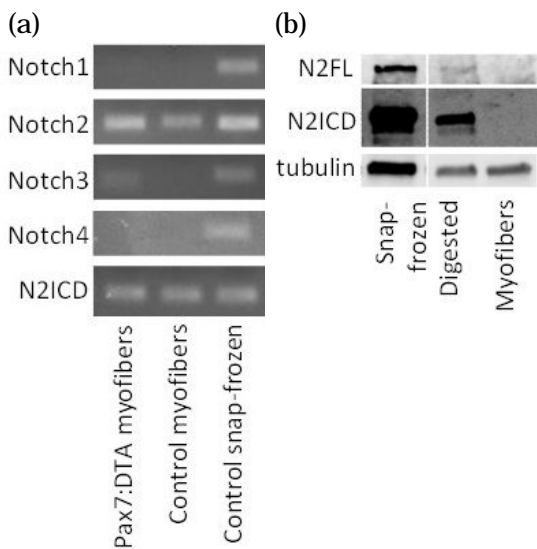


Fig. 3 (a) 対照マウスの足底筋全体(右) 対照マウスの単離筋線維(中) サテライト細胞枯渇マウス(左)の単離筋線維の Notch1-4 mRNA の検出 (b) 凍結保存した足底筋全体(左) コラゲナーゼ処理した足底筋全体(中) 単離筋線維(右)の全長 Notch2(N2FL)および Notch2 細胞内ドメイン(N2ICD)タンパク質の検出

(5) ここまでの結果から、成熟骨格筋線維の Notch2 シグナルは通常は不活性化状態であるものの、筋萎縮を惹起する条件で活性化される可能性が考えられた。そこで N2ICD-Tg マウスと対照マウスの前脛骨筋から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイで遺伝子発現網羅解析を行ったところ、N2ICD-Tg マウスに Gdf11 (Growth differentiation factor) mRNA の顕著な増加を認めた。腓腹筋・前脛骨筋・咬筋・ヒラメ筋の Gdf11 mRNA 発現量を qPCR によって定量したところ、N2ICD-Tg マウスで萎縮していた腓腹筋・前脛骨筋・咬筋では Gdf11 mRNA は有意に増加した。一方、N2ICD-Tg マウスで萎縮が認められなかったヒラメ筋の Gdf11 mRNA 発現量には有意な差はなかった。このことから、Notch2 シグナル活性化による筋萎縮には Gdf11 が関与している可能性が推察された。

(6) N2ICD-Tg マウスから採取したサテライト細胞を培養し N2ICD を過剰発現させたところ、筋管細胞サイズが減少したが、さらに Gdf11 siRNA を導入したサテライト細胞では筋管細胞サイズが元のレベルに戻った。以上の結果から、Notch2 シグナル活性化は Gdf11 遺伝子発現を亢進させ、その結果筋萎縮が引き起こされることが示唆された。

(7) Gdf11 が Notch2 シグナルのターゲット遺伝子が否かを明らかにするため、N2ICD-Tg マウスのサテライト細胞から分化させた筋管細胞の Gdf11 プロモーター領域に対し、Notch2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、Notch2 の Gdf11 プロモーター領域への結合の有無を調べたが、現時点では結合が確認できなかった。

(8) 骨格筋組織における Notch シグナルの機能についていくつかの先行研究が存在する。しかし、いずれの先行研究においても、検出した Notch が骨格筋組織のどの細胞の Notch であるか特定していない。すなわち、それらの先行研究で対象としている Notch シグナルが骨格筋線維のものか、サテライト細胞のものか、非筋細胞のものであるか厳密に特定されておらず、データから得られる結論には疑問の余地が多い。本研究は Notch1-4 のうち Notch2 遺伝子のみが骨格筋線維に発現し、筋萎縮・筋線維タイプの変換を惹起しうることを初めて明らかにした研究である。ただし、野生型マウスにおいて Notch2 タンパク質は少なくとも Western blotting で検出できるレベルではなく、成熟筋線維においてどのような条件で Notch2 シグナルが活性化するののかについては今後の検討課題である。また、Notch2 シグナルによる筋萎縮の細胞内メカニズムは明らかではなく、今後さらに研究を進めてそのメカニズムを明らかにしていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

増田慎也、浦田芳重、後藤信治、西中村隆一、李桃生、小野悠介・骨格筋再生における Notch1 および Notch2 の役割 . 第 13 回日本再生医療学会総会 . 2014 年 3 月 4 日 ~ 3 月 6 日 . 京都国際会館 (京都市)

増田慎也、小野悠介・Notch シグナルの筋萎縮およびエネルギー代謝調節における役割 . 第 69 回日本体力医学会総会 . 2014 年 9 月 19 日 ~ 9 月 21 日 . 長崎大学文教キャンパス (長崎市)

増田慎也、浦田芳重、後藤信治、西中村

隆一、李桃生、小野悠介・Notch シグナルによる骨格筋サイズおよび筋線維タイプの調節機構 . 第 69 回日本体力医学会総会 . 2014 年 9 月 19 日 ~ 9 月 21 日 . 長崎大学文教キャンパス (長崎市)

増田慎也・Notch2 シグナルによる myokine 発現調節の可能性 . 第 3 回骨格筋生物学研究会 . 2015 年 3 月 6 日 ~ 3 月 8 日 . 東北大学星陵キャンパス (仙台市)

Daiki Seko, Shinya Masuda, Tsubasa Hisamatsu, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tao-Sheng Li, Akihiro Taimura, Yusuke Ono. Notch signaling in myofibre controls muscle mass and fibre types. 2014 FASEB Science Research Conference Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. 7/20/2014 - 7/25/2014. Steamboat Springs, Colorado, USA.

Tsubasa Hisamatsu, Shinya Masuda, Daiki Seko, Ryuichi Nishinakamura, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tao-Sheng Li, Yusuke Ono. Notch1 and Notch2 play an indispensable role in maintenance of the satellite cell pool in adult muscle. 2014 FASEB Science Research Conference Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. 7/20/2014 - 7/25/2014. Steamboat Springs, Colorado, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 慎也 (MASUDA, Shinya)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・産学官連携研究員

研究者番号 : 80638403