

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463095

研究課題名(和文) 成長期におけるIGF-1シグナルを介した骨格筋萎縮の機序解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment of the skeletal muscle atrophy through the IGF-1 signaling in the growth period

研究代表者

川合 暢彦 (KAWAI, Nobuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：40437588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：廃用性萎縮を生じた骨格筋ではユビキチンリガーゼCbl-bがIRS-1をユビキチン化し、IGF-1シグナル伝達阻害が生じている。そこで、IRS-1のアミノ酸配列をもとに競合阻害によりCbl-bによるIRS-1のユビキチン化を阻害する機能性ペプチドを作製し、投与実験を行った。3週齢から10週齢まで軟食飼育を施した野生型マウスの咬筋において機能性ペプチドの投与により萎縮抵抗性を示した。よって、本機能性ペプチドは成長期の咀嚼性刺激の低下による骨格筋萎縮を、IGF-1シグナルを回復することで抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In atrophied skeletal muscles, ubiquitin ligase, Cbl-b, increases and it stimulates the ubiquitination and degradation of IRS-1, resulting in IGF-1 resistance. In this study, we evaluate the efficacy of application of anti-ubiquitination peptide that inhibits the interaction between Cbl-b and IRS-1 into masseter muscles of C57BL/6 wild-type mice fed with soft food from 3 week old to 10 week old. Sectional area of masseter muscles treated with the peptide was larger compared to non-treated muscles. These results suggest that application of anti-ubiquitination peptide could be an effective tool for therapeutic use for muscular atrophy by maintenance of proper IGF-1 signaling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨格筋萎縮 ユビキチン-プロテアソーム経路 IGF-1シグナル Cbl-b 機能性ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

顎顔面の成長発育は、遺伝のみならず環境の影響を大いに受けることが知られている。骨への負荷は主に筋肉の収縮力により生じ、筋肉の収縮張力は骨での外的因子への適応反応を引き起こすと考えられている。そのため、成長期における咀嚼筋機能の低下は筋肉を脆弱化し顎顔面発育異常を引き起こす。よって、健全な顎顔面成長発育のため骨格筋萎縮の機序解明と治療法の開発が急務である。

骨格筋はタンパク質合成と分解のバランスを保つことで一定の筋量を保っているが、骨格筋への機械的負荷が減少すると増殖因子に対する筋細胞の感受性が低下し、タンパク質分解が亢進することにより骨格筋萎縮が起こると考えられている。本研究グループは、ユビキチンリガーゼ Cbl-b (Casitus B-lineagelymphoma-b) がインスリン受容体基質 IRS-1 (insulin receptor substrate-1) をユビキチン化することによる IGF-1 シグナル伝達阻害が筋萎縮の原因であることを見出した。さらに、筋萎縮予防を目的として Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を競合的に阻害する機能性ペプチドを作製した。これは、IRS-1 のアミノ酸配列をもとにリン酸化チロシン部位をミミックしたもので Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化阻害効果を認めた。本ペプチドを骨格筋萎縮モデルマウスに筋肉内投与を行い、本ペプチドによる抗筋萎縮効果を確認している。

### 2. 研究の目的

成長期における筋機能の低下による骨格筋萎縮の機序解明と治療法の開発を目的とする。

はじめに、マウスを軟食飼育することで咀嚼性刺激を減少させ、その病態と IGF-1 シグナルの関与を明らかにする。ついで、機能性ペプチドのマウスへの投与実験を行い、本ペプチドによる筋萎縮抑制効果の検討を行う。本研究結果により、成長期における筋機能の低下による骨格筋萎縮への IGF-1 シグナルの関与を明らかにし、抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮に対する新規治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 機能性ペプチドによる IGF-1 シグナル回復効果の検討

筋萎縮モデルとして低栄養培養を使用した。ペプチドの導入担体にはアテロコラーゲン (AteloGene™, 高研, 東京) を使い、ペプチド/アテロコラーゲン複合体として培地中に添加した。

マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を 35mm dish に  $1.0 \times 10^5$  個/dish で播種し confluent に達した後、分化誘導培地 (2%ウマ血清含有 DMEM) にて 3日間培養後、萎縮刺激として無血清培地 (DMEM) に変更するとともにペプチド/アテロコラーゲン複合体を

添加した。24 時間後に抗 Foxo3a 抗体による免疫蛍光染色を行うとともに、細胞を回収して IRS-1 の蛋白質変動をウエスタンブロット法により検討し、筋萎縮関連遺伝子 (Atrogin-1, MuRF-1) の発現を RT-PCR 法にて検討する。

#### (2) 筋萎縮モデルマウスを用いた機能性ペプチドの抗骨格筋萎縮効果の検討

12 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウスを使用した。偽手術群、切除群、投与群を設定し、右側座骨神経切除を行った。投与群には手術直後および 3 日ごとにペプチド/アテロコラーゲン複合体を前頸骨筋に筋肉内投与を行った。手術 9 日後に、それぞれの群の筋を摘出し組織学的検討を行った。

#### (3) 機能性ペプチドの成長期軟食飼育マウス骨格筋に対する影響

3 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウスを無作為に硬食群と軟食群の 2 群に等分した。軟食群には 1 週間ごとにペプチド/アテロコラーゲン複合体を右側咬筋に筋肉内投与を行った。10 週齢まで飼育したのち両群の咬筋を摘出し組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 機能性ペプチドによる IGF-1 シグナル回復効果の検討

24 時間の低栄養培養により IRS-1 は減少したが、機能性ペプチドは濃度依存的に IRS-1 の分解を抑制する傾向を示した。また、機能性ペプチド単独よりもアテロコラーゲンとの併用により強い IRS-1 分解抑制効果を示した (図 1)。

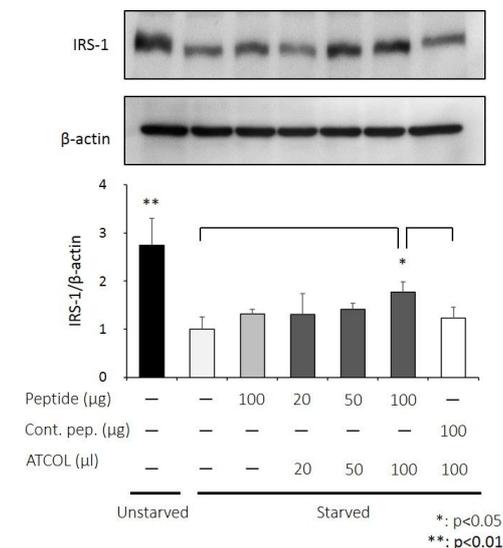


図1 機能性ペプチドによるIRS-1分解抑制

低栄養培養により筋管細胞における Foxo3a の核内移行、筋萎縮関連遺伝子である atrogin-1 と MuRF-1 遺伝子の発現上昇を認めた。これらの現象は機能性ペプチド添加群では認めなかったことから、機能性ペプチドによる抗萎縮効果は IGF-1 シグナルの正常化によることが示された (図 2-1 および図 2-2)。

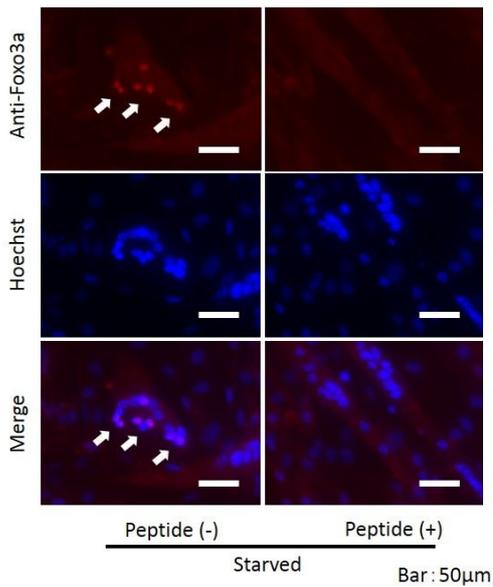


図2-1 Foxo3aの細胞内局在

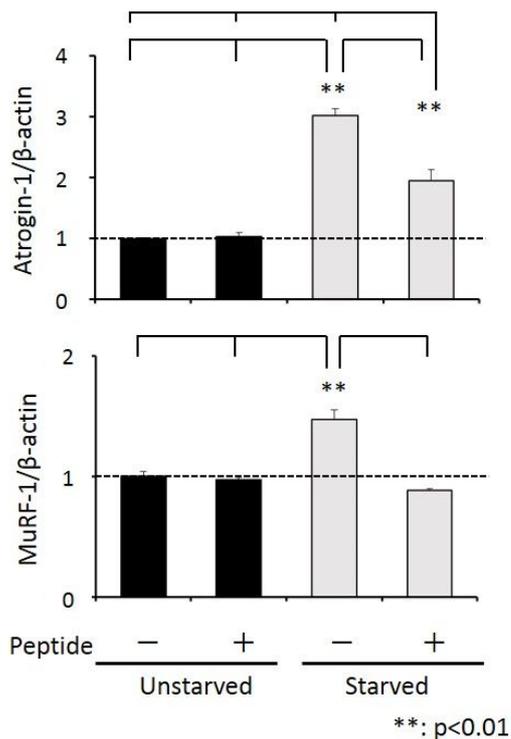


図2-2 筋萎縮関連遺伝子の発現様相

(2) 筋萎縮モデルマウスを用いた機能性ペプチドの抗骨格筋萎縮効果の検討

坐骨神経切除 9 日後において、切除群では偽手術群に対して筋線維の萎縮を認めたが、投与群では健全な組織像を認め、萎縮に対し抵抗性を示した (図 3)。

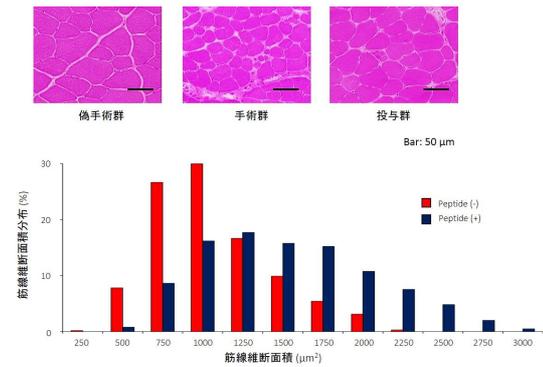


図3 筋萎縮モデルマウスにおける機能性ペプチドの抗萎縮効果

(3) 機能性ペプチドの成長期軟食飼育マウス骨格筋に対する影響

軟食群では硬食群と比較して、軟食飼育により筋線維の萎縮傾向を示したものの、機能性ペプチドの投与によりの萎縮に抵抗性を示す傾向が見られた (図 4)。

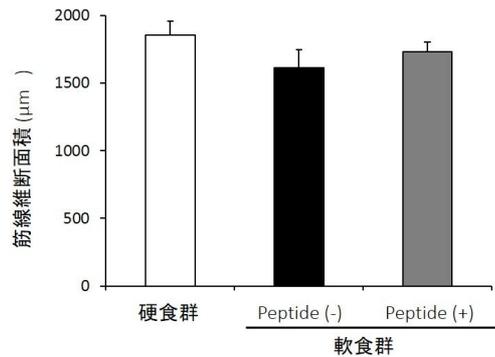


図4 軟食飼育マウスにおける機能性ペプチドの抗萎縮効果

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6件)

Bayarsaikhan O, Kawai N, Mori H, Kinouchi N, Nikawa T, Tanaka E. Co-administration of Myostatin-Targeting siRNA and ActRIIB-Fc Fusion Protein Increases Masseter Muscle Mass and Fiber Size. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, in press, 査読有.

Bayarsaikhan O, Kawai N, Mori H,

Kinouchi N, Nikawa T, Tanaka E. Effects of Co-Transfection with Myostatin-Targeting siRNA and ActRIIB-Fc Fusion Protein on Skeletal Muscle Growth. *Journal of Oral Health and Biosciences*, in press, 査読有.

Kawai N, Hirasaka K, Maeda T, Haruna M, Shiota C, Ochi A, Abe T, Kohno S, Ohno A, Teshima-Kondo S, Mori H, Tanaka E, Nikawa T. Prevention of skeletal muscle atrophy in vitro using anti-ubiquitination oligopeptide carried by atelocollagen. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1853: 873-880, 2015. 査読有, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.024.

Shiota C, Abe T, Kawai N, Ohno A, Teshima-Kondo S, Mori H, Terao J, Tanaka E, Nikawa T. Flavones inhibit LPS-induced atrogen-1/MAFbx expression in mouse C2C12 skeletal myotubes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61: 188-194, 2015, 査読有, doi: 10.3177/jnsv.61.188.

Hichijo N, Tanaka E, Kawai N, van Ruijven LJ, Langenbach GE. Effects of Decreased Occlusal Loading during Growth on the Mandibular Bone Characteristics. *PLoS One*. 10: e0129290, 2015, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0129290.

Hichijo N, Kawai N, Mori H, Sano R, Ohnuki Y, Okumura S, Langenbach GE, Tanaka E. Effects of the masticatory demand on the rat mandibular development. *Journal of Oral Rehabilitation* 41: 581-587, 2014, 査読有, doi: 10.1111/joor.12171.

〔学会発表〕(計6件)

川合暢彦, 二川健, 田中栄二. 抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮抑制. 第4回骨格筋生物学研究会(長野県・松本市:松本大学), 2016年3月4-6日

川合暢彦. 骨格筋萎縮におけるユビキチンリガーゼ Cbl-b の役割. 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8) 西野班 班会議(東京都・小平市:国立精神・神経医療研究センター), 2015年12月6-7日

川合暢彦. 抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮抑制. 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8) 西野班 班会議(東京都・千代田区:JA 共済ビル), 2014年12月5-6日.

川合暢彦, 平坂勝也, 七條なつ子, 塩田智子, 森 博世, 木内奈央, 二川健, 田中

栄二. アテロコラーゲンを担体とした抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮抑制法の開発. 第73回日本矯正歯科学会大会(千葉県・千葉市:幕張メッセ), 2014年10月20-22日.

Mori H, Kawai N, Bayarsaikhan O, Hichijo N, Kinouchi N, Ishida T, Noji S, Tanaka E. Effectiveness of myostatin knockdown on jaw muscle activity. 7th IADR/PER Congress, Dubrovnik, Croatia: Valamar Lacroma Dubrovnik Hotel, September 10-13, 2014.

Kawai N, Hirasaka K, Shiota C, Nikawa T, Tanaka E. The inhibition of skeletal muscle atrophy with anti-ubiquitination oligopeptide. 7th IADR/PER Congress, Dubrovnik, Croatia: Valamar Lacroma Dubrovnik Hotel, September 10-13, 2014.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川合暢彦 (KAWAI, Nobuhiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 40437588

### (2) 研究分担者

二川健 (NIKAWA, Takeshi)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 20263824

田中栄二 (TANAKA, Eiji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 40273693

### (4) 研究協力者

野地澄晴 (NOJI, Sumihare)  
木内奈央 (KINOUCHI, Nao)  
森博世 (MORI, Hiroyo)  
平坂勝也 (HIRASAKA, Katsuya)