

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09323

研究課題名(和文) 骨格筋ミトコンドリア異常をきたすエピゲノム変容の修復によるサルコペニア治療の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for sarcopenia by repairing epigenomic alterations of skeletal muscle mitochondria

研究代表者

三石 正憲 (MITSUISHI, Masanori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50468485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：電子キャリア前駆体であるアミノレブリン酸(ALA)のサルコペニアへの影響を検討した。ALAはミトコンドリアを活性化し、アミノ酸代謝を介して骨格筋量を増加させ、効果的に身体能力を向上させた。これらの結果をもとに、ヒトへの応用を目指した研究課題「骨格筋ミトコンドリアとアミノ酸代謝に着目したサルコペニア先制医療の開発」が2018年度AMED事業に採択され、現在進行中である。

次にデキサメタゾン(Dex)投与によるサルコペニアモデルマウスの解析を行った。Dex投与終了後も持続的に著明な耐糖能障害を認めた。末梢血単核球におけるDpp-4プロモーター領域のエピゲノム変容が関与した可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは転倒・骨折のみならず心血管病の強いリスクとなることが知られ、非常に重要な疾患である。従来の治療法は骨格筋量増強に重点が置かれ、心血管病予防の観点からは十分とは言えないものであった。ALAは骨格筋量のみならずミトコンドリアを活性化し、効果的に身体能力を向上させた。この結果を元にヒトへの応用を目指した研究も開始されており、サルコペニア治療において非常に大きな意義を有すると考える。また、ステロイドは実臨床において有効な治療であるが、重大な副作用も知られている。このメカニズムの一部が解明されることは、今後のステロイド治療を安全かつ有効に行う上で非常に意義があることであると考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of an electron carrier precursor, aminolevulinic acid (ALA), on sarcopenia. ALA activated skeletal muscle mitochondria, increased skeletal muscle mass via regulation of amino acid metabolism, and effectively improved physical performance. Based on these results, the human clinical research "Study on the effect of aminolevulinic acid, a natural amino acid which controls mitochondria in the skeletal muscle, on physical performance" was accepted for the 2018 AMED project and is currently underway.

Next, we analyzed a mouse model of sarcopenia treated with dexamethasone (Dex), which showed significant glucose intolerance persistently after the end of Dex treatment. Epigenetic alteration of the Dpp-4 promoter region in peripheral blood mononuclear cells may be involved.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：骨格筋ミトコンドリア サルコペニア アミノ酸代謝 エピゲノム アミノレブリン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

身体能力の低下が心血管病のリスクとなることはこれまでも知られていたが、最近の大規模臨床試験で大腿周囲径の減少すなわちサルコペニアが、心血管病の強いリスクとなることが明らかとされ[1]、サルコペニアへの対応が内科の観点からも注目されるようになった。これまでサルコペニアの治療は、高たんぱく食、アナボリックステロイドの投与など骨格筋量を増やすことを目的とした食事療法や薬物投与が行われてきた。これらの治療は筋肉量増加と筋力増強には有用であるものの、筋肉量を増やすだけでは必ずしも心血管病リスクの低下には至らないことはこれまでも知られていた。そこで申請者は心血管病のリスク低下が期待できる新規治療法として、筋肉量と同様、加齢に伴い減少する骨格筋の構成要素である、ミトコンドリアの活性化に着目した検討を続けてきた[2-5]。そこで申請者はサルコペニア進行過程での骨格筋の変化を、ミトコンドリア機能異常に着目して解析し、筋肉量減少の原因となるミトコンドリア異常に至る、遺伝子のエピゲノム変容を明らかにすることを着想した。その結果を踏まえて、電子キャリア前駆体であるアミノレプリン酸や、エピゲノムを介したミトコンドリア賦活作用を有するホルモンであるグレリンにより、サルコペニア進行過程のミトコンドリア異常を、最適なタイミングで回復させる新治療の開発を目指す研究を着想した。エピゲノム変容の修飾によるミトコンドリア異常の是正により、心血管病リスクの低下をもたらす、より根治的な真のサルコペニア治療が実現できると期待できる。

2. 研究の目的

ヒトにおいて骨格筋ミトコンドリアは20歳から70歳で40%減少し、その機能も大幅に低下することが知られている。ミトコンドリア機能異常が骨格筋量減少に直結することが最近の報告で示され、ミトコンドリア機能低下はサルコペニアの原因の一つと考えられている。肥満・糖尿病の発症は、ミトコンドリア活性低下と相関して増加することから、骨格筋ミトコンドリア機能低下は、サルコペニアと心血管病の共通原因となる可能性がある。申請者のこれまでの検討では、マウスにおける骨格筋ミトコンドリア活性の低下は、筋肉量減少よりも前の段階から認められていた(図1)。しかしながら、これまでのサルコペニア治療は骨格筋量の増悪を目的としており、ミトコンドリア活性化に焦点をあてたサルコペニア治療は提唱されていない。そこで本研究では、新たにミトコンドリア代謝の観点に注目してサルコペニアを解析することで、サルコペニアの早期から末期に至る進行過程をステージングし、また各ステージでの特徴的なエピゲノム変化を明らかにする。申請者が見出したホルモンのミトコンドリアならびにエピゲノムへの作用を応用することで、サルコペニア進行過程のミトコンドリア異常を、最適なタイミングで回復させる、画期的なエピゲノム治療の開発を目指す(図2)。エピゲノムに焦点を当てた解析を進めることにより、サルコペニアの正確な時間経過の把握が可能となり、エピゲノム変容をマーカーとしたサルコペニアのステージングと、各ステージに応じた最適なエピゲノム治療が可能になると期待できる。

申請者らは、骨格筋ミトコンドリアが糖脂質代謝および身体能力に与える影響を検討し、アンジオテンシンなどの循環調節のキープレイヤーとなる心血管ホルモンが、骨格筋のミトコンドリア代謝を制御して生活習慣病発症に関与することを明らかにした。サルコペニアのメカニズムをミトコンドリアの観点から検討し、長期間の高たんぱく食にて骨格筋量が増加するにもかかわらず、ミトコンドリア機能異常により持久力が低下することを見出している。これらの治療を踏まえ、申請者は食事療法と運動療法により骨格筋量の増加を目指すサルコペニア治療には限界があると認識しており、ミトコンドリア電子キャリア前駆体であるアミノレプリン酸や、消化管ホルモンであるグレリンを用いた、ミトコンドリア異常是正の観点からのサルコペニア治療に着目している。薬剤投与によるエピゲノム治療は、共有結合する安定的なクロマチン構造変化をもたらすので、投与終了後も遺伝子発現の変化が一定期間残存する“治療記憶”の形成が期待できる。本研究ではミトコンドリア機能を改善する薬剤の一過性投与によるエピゲノム変化の持続性を検討し、治療記憶の形成に焦点を当てた解析を行うことで、サルコペニアの時間経過を抑制ないしは逆転させる根治的な新治療の実現を目指す。

3. 研究の方法

申請者はこれまで、8,20,50,100週齢のマウスを用いて、骨格筋の退行性変化の機序と治療に関する検討をすすめて、骨格筋ミトコンドリアの生合成と分解を規定する責任分子である

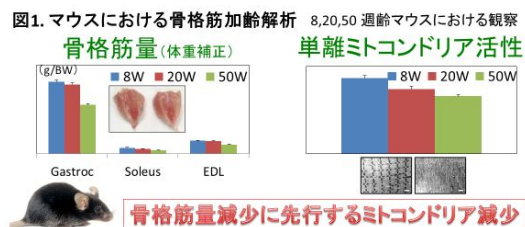
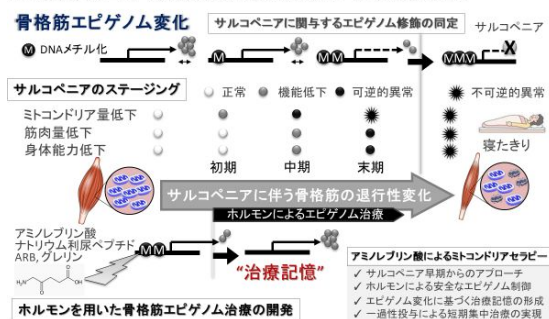


図2. 骨格筋ミトコンドリア代謝の是正を介したサルコペニア治療の開発



Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC)-1 α や Bnip3L の発現変化がサルコペニアに関与すること[3]、長期の高蛋白食は筋量増加をもたらすもののミトコンドリア量を低下させること[4]、コエンザイム Q10 がミトコンドリア活性化を介して運動耐容能を改善すること[5]を報告してきた。最近 PGC-1 の発現がエピゲノム修飾で制御されると報告され、申請者も検討したところ、いくつかのサルコペニア病態モデルにおいて、骨格筋 PGC-1 遺伝子のプロモーター領域シトシンメチル化亢進による PGC-1 発現の低下を見出した。しかしながら、サルコペニアに関与する遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾に関しては未だ不明な点が多い。

本研究ではサルコペニアに関連したミトコンドリア機能異常を明らかにし、ミトコンドリア機能異常のステージに合わせたエピゲノム修飾をもたらす分子の同定を目指す。ALA のサルコペニア治療への応用可能性を検討する目的で 8 週から 100 週齢のマウスに ALA の投与を行い、加齢に伴うサルコペニア進展の各ステージにおいて、ALA によるミトコンドリア賦活化の効果を検討する。また ALA によるミトコンドリア賦活化がエピゲノム修飾を介して骨格筋量の増加をもたらす可能性を培養骨格筋細胞を用いて検討する。

また、サルコペニアをきたす骨格筋ミトコンドリア機能異常におけるエピゲノム変容の解析を培養骨格筋細胞およびマウスを用いて検討する。糖尿病はサルコペニアを悪化させる要因であるが、申請者らはこれまでの検討で、培養骨格筋細胞において高血糖にてミトコンドリア機能異常が惹起され、cGMP ないし ARB の投与により改善することを報告している[5,6]。糖尿病の発症および合併症進行にエピゲノム変容が関与しているとの報告がなされていることから、本研究においても高血糖に伴うミトコンドリア機能不全にエピゲノム変容が関与する可能性を検討する。また、ALA、グレリン、ARB がミトコンドリア関連遺伝子のエピゲノムに与える影響を検討し、糖尿病患者におけるサルコペニア治療への応用可能性を検討する。

4. 研究成果

ミトコンドリアで作られる ALA によるサルコペニアならびに身体能力改善効果を検討した。ALA はミトコンドリア電子伝達系の電子担体であるヘムやシトクロムの原料となる重要分子で、加齢性疾患の発症原因となる可能性が注目されている。C57b16 マウスに ALA 含有飼料を 8 週間与え身体能力(筋力・持久力)を評価した。評価終了後に骨格筋量および骨格筋のミトコンドリア関連分子ならびに骨格筋量制御因子の発現を評価した。

ALA 投与マウスでは骨格筋ミトコンドリアの増加と持久力・筋力の向上、さらには骨格筋量の増加を認めた。定量的 PCR 法では、ミトコンドリア活性化因子(PGC-1 α , UCP3, ATPsyn, Cox4i1)の発現亢進、筋肉分解因子(Atrogin1, Murf1)の発現低下を認め、筋肉量制御の重要因子である target of rapamycin complex-1 (TORC-1)は活性化していた。メタボローム解析にて、TORC1 を活性化することが知られているロイシンやイソロイシンなどの分枝鎖アミノ酸 branched-chain amino acids(BCAA)が、ALA 投与マウスで増加していた。定量的 PCR 法では、BCAA の分解酵素である branched chain aminotransferase (BCAT)の発現が低下していた。以上の結果より、ALA は骨格筋ミトコンドリアを活性化するのみならず、BCAT の発現低下による BCAA の分解抑制を介して筋肉量を増加させたと考えられた[8]。ALA 投与による筋肉の量と質の改善により、筋力・持久力が効果的に改善すると示唆された。これらの結果をもとに、ヒトへの応用を目指した研究課題である「骨格筋ミトコンドリアとアミノ酸代謝に着目したサルコペニア先制医療の開発」が 2018 年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業に採択され、現在進行中である。

これらの結果は、骨格筋量増加を主目的とした従来の治療法とは異なり、骨格筋量増加のみならずミトコンドリア活性化を介して身体能力向上が認められており、心血管疾患リスクの低下も見据えたサルコペニアの根本的な治療法となりうる点が高く評価されている。

続いて、サルコペニアの発症機構を詳細に検討するため、筋肉量の減少をきたす代表的なホルモンであるデキサメサゾン(Dex)の投与によるサルコペニアモデルマウスを解析し、そのエピゲノム変容を調べることにした。皮下埋め込み型徐放性ペレットを用いて Dex を C57b16 マウスに 21 日間投与したところ、骨格筋量の減少と握力・持久力の低下を認め、糖負荷試験で耐糖能の悪化が顕著であった。Dex 投与マウスでは投与終了 35 日後においても、経口糖負荷試験での耐糖能の悪化が顕著であった。このことから、経口投与された糖に反応して腸管から分泌され、インスリン分泌と血糖降下に関与するホルモンであるインクレチンレベルの低下が、Dex 投与終了後も遷延する血糖上昇に関与する可能性を着想した。腸管から分泌される代表的なインクレチンである GLP-1 およびインスリンの血中レベルと、GLP-1 の分解酵素であり血糖上昇に関与するホルモンである DPP-4 の活性を検討したところ、DPP-4 の活性亢進が Dex 中止 35 日後も継続していた。以上より DPP-4 の活性亢進ならびに GLP-1 レベルの低下がステロイド糖尿病での血糖上昇に関与する可能性が考えられた。ヒトを対象としたこれまでの観察研究で、ステロイド糖尿病がステロイド中止後も遷延することから、ステロイド投与の“メモリー現象”がステロイド終了後も持続すると認識されている。記憶現象にエピゲノムを介した遺伝子発現制御が関与することが知られているので、Dex 投与マウスにおいて *Dpp-4* 遺伝子のエピゲノム変容を検討したところ、末梢血単核球において *Dpp-4* プロモーター領域におけるヒストンアセチル化の亢進が、Dex 中止 35 日後まで顕著に認められた。培養細胞を用いた検討においても、培地への一過性の

Dex 添加により、*Dpp-4* 遺伝子の発現亢進を動物実験同様に再現可能であり、さらにはヒストンアセチル化を抑制する薬剤添加で、*Dpp-4* 発現を抑制できた。以上の結果から、*Dpp-4* プロモーター領域におけるヒストンアセチル化の亢進が、Dex 投与終了後も遷延する血中 DPP-4 活性の上昇、GLP-1 レベルの低下と、相対的なインスリン分泌不全ならびに耐糖能悪化に關与する可能性が考えられた。

実臨床においてステロイド治療は広く用いられており、有用な治療法と認識されているが、耐糖能障害やサルコペニア増悪など副作用が多いことが問題となっている。副作用出現のメカニズムが解明され、その予防法が確立されることは、今後のステロイド治療における有効性・安全性の向上につながる点で大きな意義があると考えられる。今回の検討で、ステロイドによる耐糖能障害の“メモリー現象”にエピゲノム変容の關与が示唆され、薬剤により抑制できたことは、非常に意義のあるものと考えている。

引用文献

- [1] Heitmann BL et al. *BMJ*. 339:b3292 2009.
- [2] Tamaki M et al. *Endocrinology*. 156:3638-3648. 2015.
- [3] Tamaki M et al. *Kidney Int*. 85:1330-1339. 2014.
- [4] Mitsuishi M et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305:E776-E784. 2013.
- [5] Muraki A et al. *Appl Physiol* 113:479-486. 2012.
- [6] Mitsuishi M et al. *Diabetes*. 58:710-717. 2009.
- [7] Mitsuishi M et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 367:840-845. 2008.
- [8] Fujii C et al. *Sci Rep* 7:1-12. 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujii Chikako, Miyashita Kazutoshi, Mitsuishi Masanori, Sato Masaaki, Fujii Kentaro, Inoue Hiroyuki, Hagiwara Aika, Endo Sho, Uto Asuka, Ryuzaki Masaki, Nakajima Motowo, Tanaka Tohru, Tamaki Masanori, Muraki Ayako, Kawai Toshihide, Itoh Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Treatment of sarcopenia and glucose intolerance through mitochondrial activation by 5-aminolevulinic acid	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-03917-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇都 飛鳥, 宮下 和季, 竜崎 正毅, 押田 卓磨, 三石 正憲, 木内 謙一郎, 伊藤 裕
2. 発表標題 ステロイド糖尿病モデルマウスにおけるDpp-4遺伝子発現変容の解析
3. 学会等名 第24回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都飛鳥、宮下和季、遠藤翔、藤井千華子、萩原あいか、井上博之、藤井健太郎、竜崎正毅、三石正憲、伊藤裕
2. 発表標題 長寿関連遺伝子Sirt3による糖代謝制御機構の解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇都飛鳥、宮下和季、遠藤翔、井上博之、藤井健太郎、竜崎正毅、三石正憲、伊藤裕
2. 発表標題 高血圧関連ヒストン脱アセチル化酵素Sirt3はDPP-4とGLP-1を介して糖代謝に関与する
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----