

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300149

研究課題名（和文）NOを介した不動化による筋萎縮の分子機構の解明と新たな治療法の開発
研究課題名（英文）

The elucidation of the molecular mechanisms of NO-mediated muscle atrophy

研究代表者

武田 伸一（TAKEDA SHIN'ICHI）

独立行政法人国立精神・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

研究成果の概要（和文）：

本研究の成果として、nNOSは筋萎縮のみでなく萎縮からの回復および筋肥大を制御していることが明らかになった。メカニカルストレス直後に活性化されたnNOSは活性酸素産生酵素であるNADPH oxidase 4(NOX4)によって産生された活性酸素と反応することにより、peroxynitriteとして筋肥大を促進することが示された。この成果は、peroxynitriteの制御を視点とした、新たな筋萎縮防止・筋肥大促進薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We found that nNOS was involved in not only in the unload-induced muscle atrophy, but also in the overload-induced muscle hypertrophy. nNOS was immediately activated by mechanical overload, and this activation promoted formation of peroxynitrite, a reaction product of nitric oxide with superoxide, which was derived from NADPH oxidase 4 (NOX4). These findings may develop therapeutics for muscle atrophy by targeting NO/peroxynitrite.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：骨格筋、筋萎縮、一酸化窒素、神経型一酸化窒素合成酵素、筋肥大

1. 研究開始当初の背景

我々は、負荷軽減によってもたらされる筋萎縮に、神経型一酸化窒素合成酵素(neuronal nitric oxide synthase (nNOS))が深く関与していることを明らかにした。すなわち、マウスの尾部懸垂時に筋細胞膜から遊離したnNOSは細胞質に移って一酸化窒素(nitric oxide: NO)を産生し、Forkhead box O

(FoxO) 転写因子のリン酸化を阻害してE3ユビキチンリガーゼの発現を活性化することにより、プロテアソーム系を活性化し、筋タンパク質の分解を促進して、筋萎縮を招いていた(Suzuki N. et al., *J. Clin. Invest.*, 117, 2468-2476, 2007)。

2. 研究の目的

本申請では、(1)マウスの尾部懸垂時に nNOS が活性化されるメカニズムを解明し、(2)活性化された nNOS の標的分子を探索し、FoxO の活性化メカニズムを検討する。(3)更に nNOS が筋萎縮で活性化されるオートファジー (自己消化)によるタンパク質分解にも関与しているかをモデル動物を用いて検証する。nNOS が筋萎縮を誘導する分子メカニズムを解明できれば、廃用や不働化による筋萎縮のみならず、疾患 (癌、感染、慢性疾患に伴うカヘキシア、筋ジストロフィー等) や老化 (サルコペニア) に伴う筋萎縮を阻止あるいは軽減させる治療法の開発に発展すると期待される。

3. 研究の方法

ところが、研究を進めるうち、nNOS は筋萎縮のみでなく萎縮からの回復および筋肥大を制御していることが明らかになった。

nNOS の筋肥大における機能を明らかにする為、nNOS 野生型および欠損型マウスに共働筋切除術を施し、過負荷による代償性筋肥大を誘導した。術後 7 日において筋重量測定および組織学的解析を行い、術後 3 分後において生化学的解析を行った。

4. 研究成果

nNOS はメカニカルストレス直後に活性化された。メカニカルストレス直後に活性化された nNOS は活性酸素産生酵素である NADPH oxidase 4(NOX4)によって産生された活性酸素と反応することにより、peroxynitrite として働くことがわかった。また nNOS 欠損型マウスおよび peroxynitrite 消去剤投与群では、メカニカルストレス後に起こる mTOR の活性化が起こらなかった。これらの結果から、過負荷後に産生される NO/peroxynitrite が、筋肥大を促進する分子であることが明らかになった。この成果は、今後、nNOS/NO を出発点としながらも peroxynitrite の制御を視点とした、新たな筋萎縮防止・筋肥大促進薬の開発に繋がる可能性がある。

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 10 件、全て査読有)

1. Ono Y, Masuda S, Nam H, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:

Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci.* 125:1309-1317, 2012, DOI : 10.1242/jcs.096198

2. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S: Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-3664, 2011, DOI : 10.1242/jcs.086629
3. Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogawa R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H: Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development.* 138:4609-4619, 2011, DOI:10.1242/dev.067165
4. Kondo H, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Sorimachi H, Takeda S, Noda M: MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *J Cell Biochem.* 112(12):3525-30, 2011, DOI : 10.1002/jcb.23327
5. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K: Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. *PLoS One.* 30; 6(3):e18388, 2011, DOI : 10.1371/journal.pone.0018388
6. Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S: Matrix metalloproteinase-2 ablation in

- dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet.* 20:1787-1799, 2011, DOI : 10.1093/hmg/ddr062
7. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 13:170-182, 2011, DOI : 10.1016/j.cmet.2011.01.001
 8. Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12: 143-152, 2010, DOI : 10.1038/ncb2014
 9. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 17:4798-4811, 2009, DOI : 10.1128/MCB.01347-08
 10. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23:1907-1919, 2009, DOI:10.1096/fj.08-123661
- [学会発表] (計 11 件)
1. Takeda S: Molecular mechanism of muscle hypertrophy -NO/peroxynitrite-induced activation of TRPV1-. University of Geneva, Geneva, Switzerland, 3.21, 2012
 2. 伊藤尚基, 工藤 明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は過負荷によって活性化され, タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.16, 2011
 3. N Ito, K. Akira, Y Suzuki, U Ruegg, S Takeda: nNOS is an essential mediator for mechanical overload-induced muscle hypertrophy. International Conference On Muscle Wasting, Ascona, Switzerland, 9.20, 2011
 4. 武田伸一: 骨格筋の幹細胞と再生の分子機構, 第 3 回シグナルネットワーク研究会, 東京, 5.27, 2011
 5. Ono Y, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Identification of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. The molecular and cellular mechanisms regulating skeletal muscle, development and regeneration, EMBO conference series, Wiesbaden, Germany, 5.13, 2011
 6. Takeda S: Isolation and characterization of a long-term self-renewable population in activated satellite cells. 4th International congress of Myology, Lille, France, 5.11, 2011
 7. 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 過負荷によって活性化され, タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している, 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010. 12.8
 8. 武田伸一, 伊藤尚基, 鈴木友子: nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである, 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.7
 9. 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素は過負荷によって活性化され, タンパク質合成・分解の制御を介して筋肥大を促進

する, 第 31 回日本炎症・再生医学会,
新宿, 2010. 8.5

10. 武田伸一: 筋萎縮と筋肥大の分子機構を
巡ってMolecular mechanisms of muscle
atrophy and hypertrophy, 第 3 回上肢
の神経機能回復セミナー, 秋田, 2010.
5.14
11. Ito N, Ampong BN, Kudo
A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Neuronal nitric oxide synthase is an
essential mediator for muscle
hypertrophy. International Congress
of Physiological Sciences, Kyoto,
7.29, 2009

[図書] (計 2 件)

1. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Mechanobiology in skeletal muscle:
conversion of mechanical information
into molecular signal. Mechanosensing
Biology (ed.Masaki Noda), Springer
Japan, 2010
2. 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋. 炎症・
再生医学事典, 朝倉書店, pp453-456,
2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 筋増加剤及び筋増加物質のスクリーニ
ング法

発明者: 武田伸一, 伊藤尚基, Urs T. Ruegg,
鈴木友子

権利者: NCNP

種類: 特許

番号: 特願 2012-063182

出願年月日: 2012. 3. 21

国内外の別: 国内

名称: 筋肥大を促進する物質又は因子のスク
リーニング法

発明者: 武田伸一, 伊藤尚基, Urs T. Ruegg,
鈴木友子

権利者: NCNP

種類: 特許

番号: 特願 2011-200716

出願年月日: 2011. 9. 24

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 伸一 (TAKEDA SHIN' ICHI)

独立行政法人国立精神・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: 80221787

(2) 研究分担者

鈴木 友子 (SUZUKI YUUKO)

独立行政法人国立精神・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

今村 道博 (IMAMURA MICHIHIRO)

独立行政法人国立精神・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: 80221787