

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15629

研究課題名（和文）SIRT1活性化薬による骨格筋膜修復の促進

研究課題名（英文）Activation of SIRT1 promotes membrane resealing

研究代表者

岩原 直敏（Naotoshi, Iwahara）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00613085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：SIRT1の活性化薬であるレスベラトロールは、筋ジストロフィー症とそのモデルマウスの症状を改善することが、我々を含め複数のグループから報告されている。今回我々は、レスベラトロールの膜修復に対する効果を検討した。レスベラトロールは、C2C12細胞を用いたアッセイにて、膜修復を促進することを確認した。また、その効果は、CTTNの脱アセチル化を介している可能性が示唆された。次にレスベラトロールを摂取したマウスから分離した骨格筋単繊維では膜修復が促進していることを確認した。レスベラトロールは、SIRT1/CTTNを介して骨格筋の膜修復を改善していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSIRT1活性化薬であるレスベラトロールが、筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患に対して有用であるメカニズムに骨格筋の細胞膜修復が関与する可能性が示された。現在、膜修復を標的とした薬剤の臨床応用はされておらず、新規メカニズムの薬剤開発において重要な知見であると考えられる。特に今回使用したレスベラトロールについては、我々が既に筋ジストロフィー患者への安全性および効果について報告した薬剤であり、今後は、大規模での臨床試験実施が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Resveratrol, an activator of SIRT1, ameliorates muscular function in muscular dystrophy patients, although its mechanism is still not fully elucidated. Here, we investigated the effects of resveratrol on membrane resealing. We found that resveratrol promoted membrane repair in C2C12 cells via the activation of SIRT1. Treatment with resveratrol promoted actin accumulation at the injured site. We also examined the role of cortactin in membrane resealing. Cortactin accumulated at the injury site, and cortactin knockdown suppressed membrane resealing and reorganization of the cytoskeleton. Additionally, SIRT1 deacetylated cortactin and promoted the interaction between cortactin and F-actin, thus possibly enhancing the accumulation of cortactin at the injury site. Finally, we performed a membrane repair assay using single fiber myotubes from control and resveratrol-fed mice. These findings suggest that resveratrol promotes membrane repair via the SIRT1/cortactin axis.

研究分野：骨格筋

キーワード：細胞膜修復 SIRT1 CTTN 骨格筋 筋ジストロフィー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SIRT1 は、酵母の寿命を延長する NAD 依存性タンパク質脱アセチル化酵素 Sirtuin の哺乳類ホモログである。SIRT1 は様々な標的タンパク質のアセチル化修飾を脱アセチル化し、分子の機能調節を行うことによって細胞の生存を図る。我々は Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウス (mdx マウス) に SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールが有用であることを明らかにした (Hori et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; Kuno et al. *J Biol Chem.* 2013; Sebori et al. *Oxid Med Cell Longev.* 2018)。

次に、SIRT1 を骨格筋特異的に欠損したマウス (SIRT1-MKO) を作製したところ、筋力低下や病理学的所見に乏しいにもかかわらず、運動負荷による筋の破壊が著しかった。以上の結果から、SIRT1 と細胞膜修復との関与が推測された。

2. 研究の目的

本研究の目的は (1) SIRT1 による細胞膜修復機構の分子メカニズムを解明し、(2) SIRT1 活性化薬が骨格筋の細胞膜の修復を促進するかを検証することである。SIRT1 活性化薬は、これまでに開発されてきた治療薬とは全く異なる薬理作用を有する可能性がある。細胞膜の修復は筋ジストロフィー症のみならず、正常の骨格筋でも見られる現象である。現在のところ筋組織そのものの修復を促進する薬剤は存在せず、一度低下した筋力の改善にはリハビリテーション療法以外に選択肢がない。SIRT1 活性化薬は筋力改善を図るための新たな選択肢となりうる。

3. 研究の方法

SIRT1 の標的タンパク質の同定し、実際に SIRT1 活性化薬が細胞および動物モデルにおいて細胞膜修復を促進するかを明らかにする。また SIRT1 の標的タンパク質がどのような機序で細胞膜修復を促進するかを検討する

(1) SIRT1 による細胞膜修復機構の分子メカニズムを解明

分子メカニズムの解明のため、SIRT1 の標的タンパク質を同定し、レーザー刺激を用いた細胞モデルで SIRT1 と標的タンパク質の動態を解析する。

SIRT1 標的タンパク質の同定：細胞膜損傷モデルを用い、細胞膜修復時に SIRT1 と結合するタンパク質を同定する。

レーザー膜損傷モデル：筋芽細胞 (C2C12 細胞)、またはマウスから分離した長趾伸筋を用い、レーザーによる細胞膜損傷後の動態を生細胞イメージング技術を用いて解析する。
生化学定検討：C2C12 細胞および、マウス骨格筋を用いて、標的タンパク質の発現量、アセチル化修飾、局在の変化などを生化学的に検討する。

(2) SIRT1 活性化薬による細胞膜修復促進作用の検討

SIRT1 活性化薬が細胞膜修復を促進するかを細胞モデルおよび、骨格筋損傷マウスモデルを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) レスベラトロールは SIRT1 の活性化を C2C12 細胞の細胞膜修復を促進する

C2C12 細胞にレスベラトロール (50 μ M) を処置し、レーザー刺激による膜損傷を誘発した際の、修復の程度を FM1-43 色素の細胞内への流入から計測した。その結果、レスベラト

ールを処置した細胞において、優位に FM1-43 色素の流入が抑えられた。この結果は、レスベラトロールを処置した細胞ではより早く、損傷部位の穴が塞がったことを示唆する (Fig1)。

次に、SIRT1 をノックダウンした C2C12 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、レスベラトロールの効果は消失した (Fig2)。この結果より、レスベラトロールは、SIRT1 を介して、細胞膜の修復を促進したと推察された。

- (2) レスベラトロールは損傷部位へのアクチンの集積を促進する

GFP 結合アクチンを強制発現させた C2C12 細胞に、レーザー刺激による膜損傷を誘発した際の、アクチンの集積を検討した。その結果、膜損傷部位にアクチンが集積し、レスベラトロール

処置を行った細胞ではその集積が増強された (Fig3)。この結果より、レスベラトロールは、損傷した細胞膜でのアクチン骨格の再構築を促進することによって、細胞膜修復を促すと推測された。また、アクチンの集積は SIRT1 の阻害薬、SIRT1 のノックダウンによって阻害されることから、SIRT1 がアクチンの再構築に関与することが想定された。

- (3) CTTN は細胞膜修復に関与する

CTTN はアクチンの再構築に関わる分子であり、SIRT1 との結合が報告されている。そこで、GFP 結合 CTTN を強制発現させた細胞に、レーザー刺激による膜損傷を誘発した。その結果、CTTN が膜損傷部位に集積することが確認された (Fig4)。また、CTTN をノックダウンした細胞では、膜損傷部位へのアクチンの集積が減少し、FM1-43 色素の流入も増加した。この結果より、CTTN もまた細胞膜の修復に重要であることが示唆された。

- (4) SIRT1 と CTTN は結合する

免疫沈降法を用いて、SIRT1 と CTTN および Phalloidin を用いたアクチンとその結合分子の沈降を行った。その結果、SIRT1 と CTTN が結合することと、SIRT1 を強制発現することにより CTTN とアクチンとの結合が強くなることが確認された。また、レスベラトロールを処置した細胞では、レーザー刺激による膜損傷部位への CTTN の集積が強くなった (Fig5)。この結果より、レスベラトロールは、SIRT1/CTTN の軸を介して細胞膜修復を促進していると推察された。

- (5) レスベラトロールは Exvivo でも細胞膜の修復を促進する

最後に、野生型マウスおよび SIRT1 ノックアウトマウスに対してレスベラトロールを投与し、マウスから単離した骨格筋単繊維の膜修復能力を検討した。その結果、野生型マウスでは、レスベラトロールの投与によって、修復が促進されたが、SIRT1 ノックアウトマウスではその効果が確認できなかった (Fig6)。この結果より、Exvivo においてもレスベラトロールは、骨格筋の修復を促進することがわかった。

Fig1

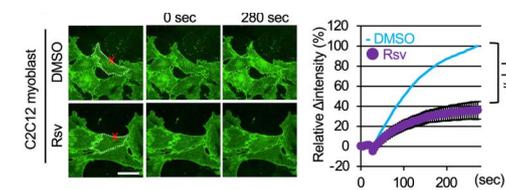


Fig2

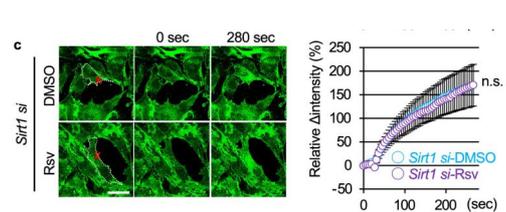


Fig3

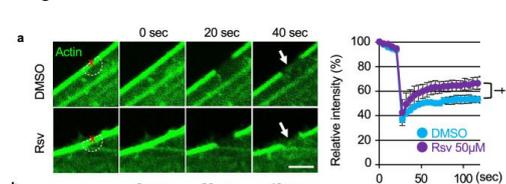


Fig4

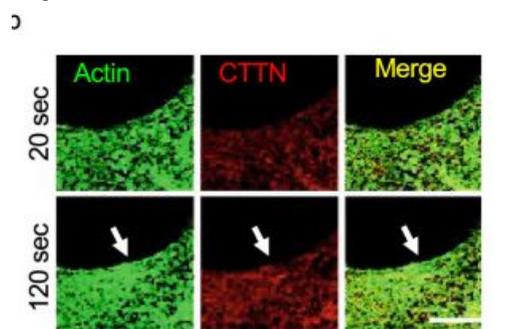


Fig5

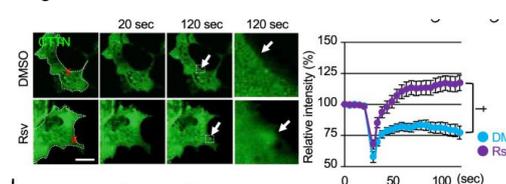
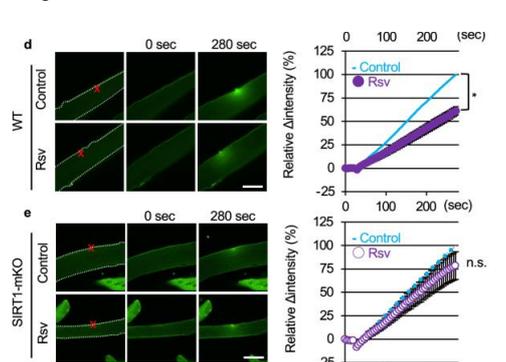


Fig6



野生型マウスでは、レスベラトロールの投与によって、修復が促進されたが、SIRT1 ノックアウトマウスではその効果が確認できなかった (Fig6)。この結果より、Exvivo においてもレスベラトロールは、骨格筋の修復を促進することがわかった。

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 Iwahara Naotoshi, Azekami Kuya, Hosoda Ryusuke, Nojima Iyori, Hisahara Shin, Kuno Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of SIRT1 promotes membrane resealing via cortactin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19136-1	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------