

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17733

研究課題名（和文）ミトコンドリアの品質向上による筋萎縮の軽減に対する運動の役割

研究課題名（英文）Role of exercise for improving mitochondria quality to protect muscle from atrophy

研究代表者

山田 麻未（Yamada, Mami）

名古屋市立大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：30932587

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）：定期的な運動は、ミトコンドリアの品質を向上することで骨格筋量の維持に貢献する。しかしながら、運動がミトコンドリアの恒常性を維持する決定的な分子やメカニズムは明らかにされていない点が多い。本研究では、筋萎縮を予防する因子として運動により活性化するオートファジータンパクに着目し、筋特異的な遺伝子組換えマウスを用いて骨格筋量の制御効果を検証した。その結果、オートファジータンパクの欠損はミトコンドリアの機能不全による筋萎縮を促進したが、発現を増強することで筋萎縮を抑制した。これらの結果より、骨格筋のオートファジータンパクがミトコンドリアの恒常性を維持することで骨格筋の萎縮を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定期的な運動は、ミトコンドリアの量や質を向上することで骨格筋の量や機能を維持するために重要な適応である。しかしながら、運動がミトコンドリアの品質を管理し骨格筋の恒常性を維持するメカニズムは未解明な点が多い。本研究では、オートファジータンパクとミトコンドリア膜タンパクの結合によるマイトファジー制御に着目し、骨格筋のオートファジータンパクが骨格筋の恒常性維持に重要であることを明らかにした。したがって本研究の成果は、骨格筋の萎縮を予防する新たな治療薬や予防方法の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Regular exercise training protects against mitochondria dysfunction-induced muscle atrophy. However, the key factors and molecular mechanism by which exercise maintains mitochondrial homeostasis remain unclear. In this study, we examined the importance of autophagy adaptor proteins in muscle for the protection of mitochondria dysfunction and muscle atrophy. Using a gain of function and loss of function model mice, we found that autophagy adaptor proteins in muscle contribute to improving mitochondria quality and quantity. In addition, these autophagy adaptor proteins also contribute to maintaining muscle mass and function. These results suggested that autophagy adaptor in muscle is a key factor in maintaining muscle homeostasis.

研究分野：筋生理学

キーワード：筋萎縮 運動 ミトコンドリア マイトファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動は、ミトコンドリアの質や量を向上することで骨格筋の恒常性を維持するために重要な適応である。これまで申請者らは、運動によるオートファジータンパクのリン酸化が筋萎縮の予防に貢献する可能性を報告している。しかしながら、運動によりリン酸化したオートファジータンパクがミトコンドリアの品質管理に貢献するか遺伝子組換えマウスを用いて検証した報告はない。そこで申請者らは、骨格筋におけるオートファジータンパクの発現やリン酸化の意義を立証するため、オートファジータンパクのリン酸化を恒常的に誘導した筋特異的オートファジータンパク発現増強マウスを作製した。作製したマウスから採取した骨格筋を用いて免疫沈降し、オートファジータンパクに結合するタンパクを質量分析から網羅的に探索した。その結果、オートファジータンパクはミトコンドリアの膜上に発現するタンパクに結合することが明らかになった。このタンパクは、マイトファジーを制御することでミトコンドリアの品質を制御し骨格筋量を制御する重要な因子であることが報告されている。これらの背景から、オートファジータンパクがミトコンドリアの機能を制御し骨格筋の恒常性維持に貢献する可能性は高い。そこで本研究では、ミトコンドリアの機能や発現量を低下させ筋萎縮を誘導することが報告されているドキシソルピシンを使用し、骨格筋のオートファジータンパクがミトコンドリアの品質を保持することで筋量の維持に貢献するか検証した。

2. 研究の目的

運動は、ミトコンドリアの質や量を向上することで骨格筋の量や機能を維持するために重要であることが報告されている。しかしながら、運動がミトコンドリアの恒常性を維持する決定的な分子やメカニズムは明らかにされていない点が多い。そこで本研究では、この制御因子としてオートファジータンパクに着目した。オートファジータンパクは、タンパクの分解機構を調節する他、さまざまな因子と相互作用することで細胞内情報伝達経路を制御することが明らかにされつつある。これまで申請者らは、運動が骨格筋のオートファジータンパクをリン酸化することを報告しているが、運動でリン酸化したオートファジータンパクはミトコンドリアの品質管理に貢献するかは明らかでない。そこで本研究では、骨格筋のオートファジータンパクがミトコンドリアの恒常性を維持することで骨格筋量の維持に貢献するか検証し、骨格筋における重要性を立証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には雄性 C57BL/6 マウスを使用した。マウスには、運動効果を得ることができマウスに対するストレスが少ないランニングディッシュ (マウス用ワイヤレス運動量測定装置、Med Associates, Fairfax, VT, USA) を使用し 4 週間の自発走行運動を実施した。安静群は運動群の運動期間が終了するまで通常飼育した。飼育期間終了後、一過性の運動による影響を取り除くためにランニングディッシュを止め、一晩飼育した。各マウスには、ミトコンドリアの機能低下による筋萎縮を誘導することが報告されているドキシソルピシンを腹腔に投与した。投与した 5 日後、マウス用握力測定装置を使用し最大筋力を測定した後に解剖し、ヒラメ筋、足底筋と腓腹筋を採取した。採取した骨格筋は、微量重量計にて重量を測定し、液体窒素にて急速に凍結させた。採取した骨格筋は、オートファジータンパクとミトコンドリアタンパクの結合を評価するため、免疫沈降にてオートファジータンパクを抽出した後、ミトコンドリアタンパクの発現をウェスタンブロットにて測定した。また、オートファジータンパク、リン酸化タンパクとマイトファジー関連タンパクの発現変動を評価するため、ウェスタンブロットにて測定した。次に、特異的オートファジータンパク欠損マウス (mKO) 、発現増強マウス (mTg) とそれぞれの野生型同腹子 (WT) を使用し、運動を実施したマウスと同様の方法で筋萎縮を誘導し最大筋力と筋重量を測定した。

4. 研究成果

自発走行運動による筋萎縮への抑制効果を検討するため、4 週間の自発走行運動を実施したマウスにドキシソルピシン投与による筋萎縮を誘導した。その結果、自発走行運動はドキシソルピシン投与による最大筋力の低下を有意に回復し、複数の骨格筋の萎縮を有意に軽減した (図 1)。また、ドキシソルピシン投与はオートファジータンパクとミトコンドリアタンパクの結合を阻害したが、運動することでその結合が回復した。さらに、ドキシソルピシン投与はオートファジータンパクのリン酸化とマイトファジー関連タンパクの発現を有意に低下したが、運動することでその低下が回復した。

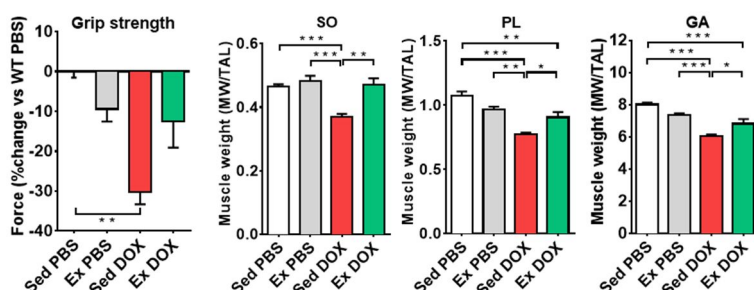


図1 . 自発走行運動実施マウスへのドキシソルピシン投与による検討

通常飼育後 (Sed) もしくは自発走行運動実施後 (Ex) のマウスにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) またはドキシソルピシン (DOX) を投与したマウスの最大筋力 (Grip strength) を測定し PBS を投与したマウスの最大筋力で標準化したグラフとヒラメ筋 (SO), 足底筋 (PL) と腓腹筋 (GA) の重量 (MW) を測定し脛骨の長さ (TAL) で標準化したグラフを示している。 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

次に、ミトコンドリアの機能低下による筋萎縮に対するオートファジータンパクの抑制効果を検証するため、mKO マウス、mTg マウスとそれぞれの WT マウスに運動を実施したマウスと同様の条件でドキシソルピシンを投与し、最大筋力と筋重量を測定した。その結果、ドキシソルピシンを投与した mKO マウスの最大筋力は WT マウスと比較してより低下する傾向を示したが、有意ではなかった。ドキシソルピシンを投与した mKO マウスの筋重量は WT マウスと比較して有意に低下した (図2)

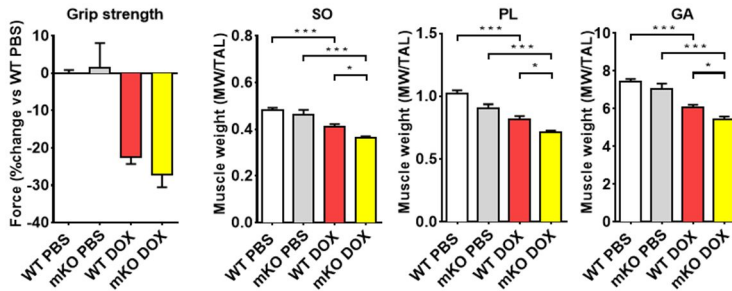


図2 . mKO マウスへのドキシソルピシン投与による検討

PBS またはドキシソルピシンを投与した mKO マウスと WT マウスの最大筋力を測定し、PBS を投与した WT マウスの筋力で標準化したグラフと PBS またはドキシソルピシンを投与した mKO マウスの SO, PL と GA の重量を測定し、脛骨で標準化したグラフを示している。 (*p<0.05, ***p<0.001)

mTg マウスは WT マウスと比較してドキシソルピシン投与による最大筋力と筋重量の低下を有意に抑制した (図3)。また、ドキシソルピシン投与により減少し運動実施で回復したオートファジータンパクの発現は、オートファジータンパクの発現を増強することでドキシソルピシン投与による低下を有意に抑制した。

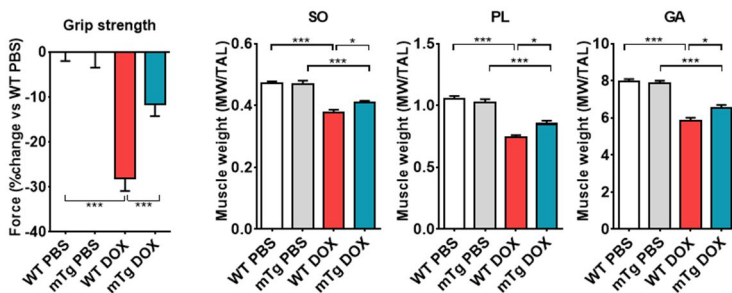


図3 . mTg マウスへのドキシソルピシン投与による検討

PBS または DOX を投与した mTg マウスと WT マウスの最大筋力を測定し、PBS を投与した WT マウスの筋力で標準化したグラフと PBS またはドキシソルピシンを投与した mTg マウスと WT マウスの SOL, PL と GA の重量を測定し、脛骨で標準化したグラフを示している。 (*p<0.05, ***p<0.001)

これらの結果より、骨格筋のオートファジータンパクはドキシソルピシン投与による筋力と筋重量の低下を軽減するために重要な因子であることが明らかになった。運動による骨格筋のオートファジータンパクの増加や活性化がミトコンドリアの膜上に発現するタンパクと結合することでオートファジーの低下を抑制し、骨格筋の恒常性を維持する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田麻未、蕨栄治、大石久史、奥津光晴
2. 発表標題 癌力ヘキシーによる骨格筋量の減少に対するp62の役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥津光晴、山田麻未
2. 発表標題 一過性のInterleukin-1 刺激は分泌型抗酸化酵素の産生を促進しドキシソルピシンによる筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田麻未、蕨栄治、大石久史、奥津光晴
2. 発表標題 加齢による全身の炎症に対するp62の役割
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥津光晴、山田麻未
2. 発表標題 一過性のInterleukin-1 刺激はドキシソルピシンによる筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田麻未、蕨栄治、大石久史、奥津光晴
2. 発表標題 癌力ヘキシ-による骨格筋の恒常性破綻に対するNrf2の役割
3. 学会等名 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------