

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659122

研究課題名(和文)ミトコンドリア新生の促進因子のスクリーニングと細胞機能亢進の解析

研究課題名(英文)The search of factors to induce mitochondrial biogenesis, and the analysis of its cellular functions

研究代表者

小淵 浩嗣 (Kobuchi, Hirotugu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：10304297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの減少や機能低下は、生活習慣病をはじめとする様々な疾患の発症と関連している。よって、ミトコンドリアの増加と機能亢進を誘導する化合物は、ミトコンドリア関連疾患の治療や予防に貢献すると考えられる。本研究において、マウスの骨格筋細胞に数種の化合物がミトコンドリア増加を誘導することが判明した。また、化合物で処理した細胞は酸化ストレスに対する耐性を獲得しており、細胞機能を亢進させる作用があることが明らかとなった。これらの化合物は、将来的にミトコンドリアの量と機能を亢進させる機能性化合物として、国民の健康に大きく貢献する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The decrease of the mitochondrial quantity and function is associated with the onset of the various disease including life-style related diseases. Therefore, that the compound to make increase mitochondrial quantity contributes to treatment and prevention of the mitochondrial associated diseases is expected. In this study, we found that several kinds of compounds increased mitochondrial quantity in murine skeletal muscle cells. Also, cells treated with a compound got resistance against the oxidative stress, and the compounds were found to increase the cellular functions. These compounds are promising to practical use in the therapies aimed at enhancement of mitochondrial quantity and functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：ミトコンドリア 機能性化合物 エネルギー代謝 酸化ストレス 筋管細胞

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞の代謝活性の鍵となる監視機関であるだけでなく、増殖、分化、アポトーシスなど多彩な細胞活動に関与するオルガネラである。従って、ミトコンドリアの不足および機能の低下は、糖尿病や動脈硬化症などの生活習慣病、パーキンソン病などの神経変性疾患、老化に伴い筋肉の量や機能が失われる加齢性筋肉減弱症 (sarcopenia) など、様々な疾患の発症と増悪に関連している。逆に、ミトコンドリアの量が多く、機能が保持された細胞では、種々の刺激に対する保護効果が高いとされる。

ミトコンドリア新生 (mitochondrial biogenesis) すなわち細胞内ミトコンドリア量の増加に関する研究は近年盛んに行われ、細胞ストレスや持続的な運動などの環境因子がミトコンドリアの新生に繋がることが明らかにされた。また、転写活性化補助因子である Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) や AMP-activated protein kinase (AMPK) など がミトコンドリア新生において重要な調節因子であると報告されたが、詳細な機構については未だ不明な点が多く残されている。

現代社会の問題である生活習慣病の主な原因は肥満 (特に内蔵型肥満) であり、これは骨格筋のミトコンドリア機能と関連している。骨格筋は運動だけでなく、肝臓とともにエネルギーバランスや代謝の中心となる器官である。この肥満の解消には食事制限はもとより、脂質代謝を主としたエネルギー消費量の亢進が最も効果的である。すなわち、細胞内のミトコンドリア量を増加させ、エネルギー代謝機能 (脂肪酸酸化、酸化的リン酸化) を亢進させることで生活習慣病をはじめとした様々なミトコンドリア関連疾患の予防および改善に有効であると考えられている。

現在のところ、ミトコンドリア新生には強く持続的な運動が必要とされている。すなわち、運動という環境因子によってミトコンドリアに富む遅筋線維が増加し、酸化的リン酸化によるエネルギー代謝の亢進に至るとされている。しかしながら、激しい運動に代替しうるミトコンドリア新生に寄与する因子や安全性が立証された低分子化合物などは未だ報告されていない。

2. 研究の目的

運動によらない低分子化合物などの因子によって、ミトコンドリアの量や代謝機能を亢進させ筋肉 (遅筋線維) 量を増加させることが出来れば、ミトコンドリア機能の低下やアポトーシスを伴う生活習慣病や加齢に起因する様々な疾患の予防および治療法の開発につながることを期待できる。

よって、本研究では、骨格筋のミトコンドリアの新生や機能を亢進する因子もしくは低分子化合物を新たに見いだすため、培養細胞実験系において各因子等の評価試験を行い、効果が認められた因子等については、細胞機能の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養と分化

マウス筋芽細胞株の C2C12 細胞は細胞増殖および維持において 10% 牛胎児血清と抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 5% CO₂、37°C で培養した。

実験では 6 ウェルプレートに C2C12 細胞を播種し、筋管細胞に分化させた後に種々の因子による処理を行った。細胞分化には、分化用培地 (2% 馬血清と抗生物質を含む DMEM) に変更して培養することで細胞融合を開始し 5 日後には多核の myotubes (筋管細胞) に分化した。分化

の評価は、形態学的観察と図1のように、分化マーカーである転写因子 **myogenin** の発現量の増加をウェスタンブロット法で行った。

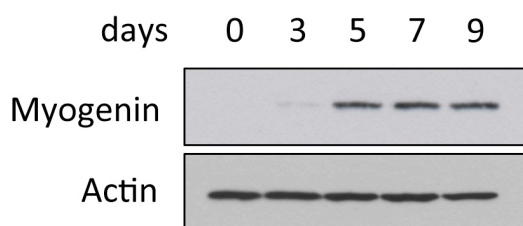


図1. C2C12 細胞の分化過程における **myogenin** の増加.

(2) 細胞内ミトコンドリアを増加させる環境因子および化合物の検索

分化培地で5日間培養し C2C12 筋管細胞に分化させ、その培養液中に種々の試験薬剤を添加し一定時間培養後、細胞内ミトコンドリア量の変化を解析した。細胞内ミトコンドリア量の変化は、細胞溶解液をウェスタンブロット解析により **Mitobiogenesis Western Blot Cocktail** (#ab123545, abcam)を用いてミトコンドリア DNA にコードされたタンパク質 **cytochrom c oxidase 1 (MtCox1)**と核 DNA にコードされたタンパク質 **succinate dehydrogenase subunit A (SDHA)** の発現量の変化より評価した。

(3) ミトコンドリア新生機序の解析

ミトコンドリア新生のマスター調節因子として知られる **PGC-1 α** (#ST1202, Calbiochem)や **Nrf-2** (**NF-E2 related factor 2**, #SAB2501713, Sigma)の発現量、**AMPK** のリン酸化(#2535, Cell signaling technology)、長寿遺伝子の **Sirt1** (#9475, Cell signaling technology)の発現量の変化について、それぞれのタンパク質に対する特異抗体を用いてウェスタンブロットにより解析を行った。

(4) 酸化ストレスに対する細胞応答性の解析

化合物等で処理した筋管細胞を過酸化水素で処理し、細胞内の活性酸素量の変化を活性酸素指向性の蛍光色素である **Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate** (Life Technologies)を用いて蛍光光度計にて解析した。

(5) 細胞内抗酸化力価の測定

化合物等で処理した筋管細胞を凍結融解で破壊したのち、**Total antioxidant power** (Oxford biomedical research, MI)を用いて細胞の抗酸化力価を Trolox 当量として算出した。

4. 研究成果

(1) 細胞内ミトコンドリアを増加させる環境因子や化合物の検索と評価

① 解析を行った環境因子と化合物

筋管細胞に分化した C2C12 細胞に対して様々な処理を行った。環境因子としては、低酸素や培養液 pH 変化環境下で培養し解析した。また、培養液中に添加した化合物としては、種々のポリフェノール類やテルペン類、ヘムの前駆体化合物、各種アミノ酸やペプチド、ミネラル、一酸化窒素や **peroxynitrite** 発生剤などの酸化ストレス関連薬剤、各種のビタミン類、糖尿病治療薬剤、抗がん剤などで解析を行った。これら化合物の濃度および処理時間を変えて、細胞内ミトコンドリアの増加を **Mitobiogenesis Western Blot Cocktail** を用いて解析した。

② 細胞内ミトコンドリアの増加が認められた主な化合物

解析した化合物の多くは、細胞内ミトコンドリア増加において、その促進効果が認められなかった。しかし、すでにミトコンドリア増加の報告がなされている **resveratrol** では有意な増加を認めた。また、ポリフェノール

類では新たに daidzein において若干ではあるものの有意な差が認められた。その他の化合物としては、亜セレン酸やβアラニン、一酸化窒素発生剤の NOC、糖尿病薬剤の rosiglitazone に効果を認めた。図2は、筋管細胞にミトコンドリア増加を誘導する化合物による代表的なウェスタンブロット解析像を示している。すなわち、ハウスキーピングタンパク質である actin の発現量をコントロールとして他のタンパク質量と比較したところ、処理した化合物の濃度に依存して核DNAにコードされた呼吸関連タンパク質 SDHA では若干の増加が観察され、またミトコンドリアDNAにコードされた MtCox1 の発現量も顕著な増加が認められた。この結果は、細胞内のミトコンドリア量が増加していることを強く示唆している。

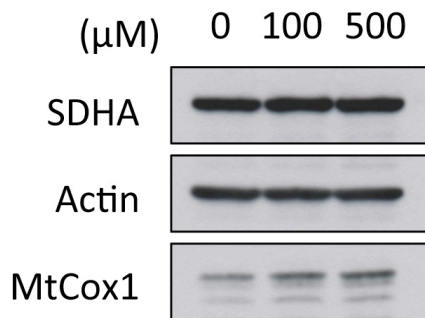


図2. ミトコンドリアを増加させる化合物による濃度依存的な MtCox1 発現量の増大。

(2) 細胞内ミトコンドリア増加における機構解析

① AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化 (活性化) 解析

ミトコンドリア増加の機構を解析するため、ミトコンドリア増加に寄与するタンパク質群の変化をウェスタンブロットにより解析した。まず、細胞のエネルギー代謝を増大させる重要な調節因子と考えられている AMPK の活性化について解析したところ、亜

セレン酸など数種の化合物においては、その濃度に依存して AMPK の活性化を意味するリン酸化の亢進が認められた (図3)。AMPK の活性化は低濃度で有意に増加しており、細胞内のエネルギー代謝の亢進、すなわち細胞内における ATP 生成の増加を示唆している。この AMPK の活性化は、ミトコンドリアの増加に起因するものと考えられた。

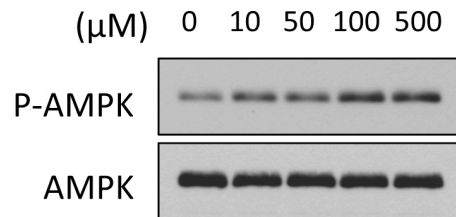


図3. 化合物濃度に依存した AMPK 活性化。

② 転写因子 PGC-1α、Nrf-2、長寿遺伝子 Sirt1 の発現量変化

また、細胞内ミトコンドリア増加を促進する因子として転写因子 PGC-1α や Nrf-2、長寿関連遺伝子として知られる Sirt1 も重要であると考えられている。そこで、これらのタンパク質の発現量変化について、ウェスタンブロット解析を行った。AMPK と同様に、化合物の濃度に依存して各タンパク質発現量の増加が観察され、低濃度でも有意な増加が認められた (図4)。よって、今回試験した化合物によるミトコンドリア増加機構には、AMPK、PGC-1α、Nrf-2、Sirt1 が寄与している可能性が示唆された。

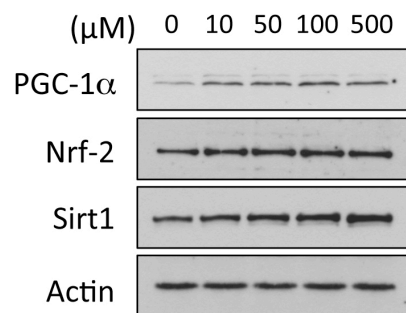


図4. ミトコンドリア量の増加における PGC-1α、Nrf-2、Sirt1 の関与。

③ 化合物で処理した細胞における酸化ストレス応答性の解析.

転写因子 Nrf-2 は、ミトコンドリア増加に関与するだけでなく、酸化ストレスに対する適応反応の調節に関わることがよく知られている。先の実験結果で見られた Nrf-2 発現量増大は、酸化ストレスに対する耐性を獲得している可能性が予想された。そこで、過酸化水素による酸化ストレスに対する細胞応答性の違いを細胞内活性酸素量の測定によって解析した。化合物処理もしくは未処理の細胞に対して、過酸化水素で酸化ストレスを誘導した。化合物処理細胞では過酸化水素単独処理と比較すると活性酸素生成量は有意に抑制された。このことは、化合物による Nrf-2 の増加を介して、細胞が酸化ストレスに対する適応能を獲得したものと考えられた。

④ 細胞の抗酸化力価の解析

酸化ストレスに対する適応性（耐性）が認められたことから、細胞内の抗酸化力価を Trolox 当量で算定し解析した。化合物処理をした細胞では、若干抗酸化力価が増加する傾向があったが有意な差は認められなかった。しかしながら、別のパラメータによる細胞の酸化ストレス耐性の評価が必要であると考えられた。

[国内外における位置づけとインパクト]

本申請研究は、「運動に代替するミトコンドリア新生を誘導する因子および化合物の探索」を目的としている。近年、ミトコンドリア機能と様々な疾患との関連が報告されているが、ミトコンドリア新生を誘導する身に安全な化合物は未だ報告がない。

本研究で解析した因子および化合物の中で、数種の化合物においてミトコンドリア新生を誘導することが判明した。これら化合物

については、さらに *in vitro* および *in vivo* レベルでの解析を行い、有効性、安全性を検証することにより、将来的にはミトコンドリア機能を亢進させる機能性化合物として、国民の健康に大きく貢献する事が期待される。

5. 関連する主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

① [雑誌論文] (計 4 件)

1. Ogino T, Kobuchi H, Fujita H, Matsukawa A, and Utsumi K. Erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 erythroleukemic cells by monochloramine. Free Radical Research, vol.48(3),292-302,2014. DOI:10.3109/10715762.203.865840. 査読有り.
2. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, Oka T, Nakanishi T, Inoue K, and Sasaki J. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biochemistry & Function, vol.32(1), 77-86, 2014. DOI:10.1002/cbf.2974. 査読有り.
3. Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, and Utsumi T. PLoS ONE, vol.7(11), e50082,2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0050082. 査読有り.
4. Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, and Utsumi K. Serum-dependent

export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol.358, 297-307, 2011. DOI: 10.1007/s11010-011-0980-5. 査読有り.

② [学会発表] (計 6 件)

1. 花田秀樹, 小渕浩嗣, 柏木啓子, 内海俊彦, 井上正康, 佐々木順造, 勝賢二郎, 佐藤英介, 内海耕慥, 柏木昭彦. アセチル-L-カルニチンによる無尾両生類幼生尾部短縮の抑制. 第84回日本動物学会. 2013年9月26日. 岡山
2. 藤田洋史, 小渕浩嗣, 内海耕慥, 佐々木順造, 大内淑代. マウス骨髄細胞培養系における TNF- α による破骨細胞形成と骨髄間様系細胞によるその抑制効果. 第86回 日本生化学大会. 2013年9月11~13日. 横浜
3. 小渕浩嗣, 守屋康子, 荻野哲也, 藤田洋史, 井上啓史, 執印太郎, 保田立二, 内海耕慥, 内海俊彦. ALA 投与によるプロトポルフィリン IX 蓄積における ABC トランスポーター ABCG2 の役割とミトコンドリア局在. 第3回ポルフィリン-ALA 学会 2013年4月27日. 神奈川
4. 小渕浩嗣, 守屋康子, 荻野哲也, 藤田洋史, 井上啓史, 執印太郎, 保田立二, 内海耕慥, 内海俊彦. 5-アミノレブリン酸によるプロトポルフィリン IX 蓄積における ABCG2 のミトコンドリア局在と機能. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月14~16日. 福岡
5. 小渕浩嗣, 内海俊彦, 荻野哲也, 保田立二, 内海耕慥. ABCG2 のミトコンドリア局在とプロトポルフィリン IX 蓄積の制

御. 第53回日本生化学会中国・四国支部例会. 2012年5月18日. 岡山

6. 小渕浩嗣, 内海俊彦, 内海耕慥, 保田立二. がん細胞のポルフィリン蓄積における ABCG2 の役割. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月22~24日. 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/cellchem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小渕 浩嗣 (KOBUCHI HIROTSUGU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 10304297

(2) 研究分担者

藤田 洋史 (FUJITA HIROFUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20423288

(3) 連携研究者

該当なし