

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350879

研究課題名(和文) 骨格筋不全におけるmitoNEETによるミトコンドリア機能制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of mitoNEET on the regulation of mitochondrial function in skeletal muscle failure

研究代表者

絹川 真太郎 (Kinugawa, Shintaro)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号：60399871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複数の慢性疾患モデルにおいて、運動能力が低下し、骨格筋不全(骨格筋ミトコンドリア機能障害、骨格筋線維型変移)を呈し、mitoNEET発現の減少とともに、ミトコンドリア鉄容量が増加し、酸化ストレス産生が増加した。mitoNEET欠損マウスにおいて、ミトコンドリア鉄容量の増加、酸化ストレス亢進およびミトコンドリア形態・機能異常と同時に、運動能力が低下した。既知のミトコンドリアの鉄流入に関わるタンパクに変化がなかった。タンパク相互作用の検討において、鉄代謝に関わる細胞質タンパク(X)とミトコンドリア内への物質を輸送する可能性があるミトコンドリア内膜タンパク(Y)とmitoNEETが結合した。

研究成果の概要(英文)：In various chronic disease model mice, exercise capacity was reduced, skeletal muscle abnormalities such as mitochondrial dysfunction in the skeletal muscle and fiber type switch occurred, iron content within mitochondria was increased, and oxidative stress was enhanced. In mice deleted mitoNEET, we newly created, iron content within mitochondria was increased, oxidative stress was enhanced, and mitochondrial morphology and function was impaired, which resulted in the reduced exercise capacity. There were no differences in the known protein associated with iron homeostasis in mitochondria. In the analysis by protein interaction, we found that mitoNEET combined with cytosolic protein X associated with iron homeostasis and mitochondrial inner membrane protein Y associated with transportation of some substances into mitochondria.

研究分野：運動生理

キーワード：ミトコンドリア 骨格筋不全 鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦において、糖尿病、高血圧などの慢性疾患が増加している。高齢者や慢性疾患患者では運動能力低下から日常生活動作 (ADL) 低下を来す。このことには骨格筋障害が極めて重要な役割を果たしている。骨格筋障害、つまり骨格筋不全はエネルギー代謝異常、骨格筋線維型変移、骨格筋萎縮などが知られている。しかしながら、骨格筋不全の機序は全く明らかにされていない。

(2) 我々は、心筋梗塞後心不全マウス、アンジオテンシン II 投与高血圧モデルマウスや高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスの骨格筋で、活性酸素 (ROS) が過剰に産生 (酸化ストレス) され、骨格筋ミトコンドリア機能障害を来していることを見出した。ミトコンドリア機能障害はさらなる酸化ストレスの亢進を引き起こすことが知られており、骨格筋不全には骨格筋酸化ストレスを中心とした悪循環の形成が重要であると考えられる。しかしながら、骨格筋酸化ストレスがミトコンドリア機能障害を引き起こす機序については明らかにされていない。

(3) mitoNEET はミトコンドリア外膜に存在する膜貫通タンパクであり、mitoNEET 自身は鉄-硫黄クラスターを含んでいる。酸化ストレス環境下ではクラスターが放出され、mitoNEET は不安定化する。一方、チアゾリジン系薬剤のピオグリタゾン は mitoNEET を安定化させる。さらに、mitoNEET は鉄イオンあるいは鉄-硫黄クラスターのミトコンドリア内への取り込みを制御していることが知られている。すなわち、mitoNEET の欠如あるいは不安定化によってミトコンドリア内の鉄過剰状態および酸化ストレス亢進からミトコンドリア機能障害が引き起こされる。

(4) ミトコンドリア電子伝達系複合体 I-III やクエン酸回路のアコニターゼなどのミトコンドリア機能に重要な酵素には鉄-硫黄クラスターが含まれている。したがって、ミトコンドリア機能維持には鉄代謝が極めて重要な役割を果たしていると考えられるが、ミトコンドリア鉄代謝機構については不明な点が多い。ミトコンドリア内膜に存在し、鉄-硫黄クラスターの合成に関わる重要なタンパクである frataxin の欠損はミトコンドリア鉄輸送系の過剰発現を導き、ミトコンドリア鉄過剰、呼吸能障害、鉄-硫黄を含む酵素活性の低下および酸化ストレス亢進をもたらした。さらに、ミトコンドリア内膜に存在し、鉄の取り込みに関わるトランスポーター-mitoferrin 1 や 2 の欠損ではミトコンドリア内の鉄減少、鉄-硫黄クラスター合成の減少があった。ミトコンドリア内における鉄の過剰および減少はいずれもミトコンドリア機能障害と密接に関連している点は、ミトコンドリア外の環境に適応し、ミトコンドリア内の鉄代謝を精緻に調節しているタンパクの存在を示唆している。さらに、鉄代謝と酸化ストレスの密接な関連を考えると、mitoNEET によるミトコンドリア機能制御には、ミトコンドリア鉄代謝および酸化ストレスが重要な役割を果たしている可能性がある。これらの知見をもとに、「mitoNEET はミトコンドリア内鉄代謝制御を介して、ミトコンドリア機能制御および骨格筋不全、運動能力に重要な役割を果たしている」という本研究の仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

骨格筋ミトコンドリア機能障害および骨格筋不全における mitoNEET の役割を解明するとともに、mitoNEET によるミトコンドリア鉄代謝およびミトコンドリア酸化ストレス制御という概念に基づく新たな骨格筋不全、運動能力障害の発症機序を明らかにすること。

具体的には以下の点を明らかにした。

(1) 骨格筋不全に陥った骨格筋ミトコンドリアにおいて鉄代謝異常や酸化ストレス亢進を介したミトコンドリア機能障害が起きているか? mitoNEET 蛋白は減少しているか?

(2) mitoNEET はミトコンドリア鉄代謝制御および酸化ストレス制御を介して、骨格筋不全に関与しているか?

3 . 研究の方法

(1) 骨格筋不全モデル動物を用いたミトコンドリア機能・鉄代謝・酸化ストレスの解析
骨格筋不全モデルの作成

高脂肪食負荷糖尿病モデル(高脂肪食で8週間飼育)、アンジオテンシン II 投与高血圧モデル(浸透圧ポンプを植え込み1000ng/kg/min で2週間投与)、心筋梗塞後心不全モデル(冠動脈結紮により心筋梗塞作成後4週間飼育)

運動能力評価

持久的運動能力 () 最大仕事量、 () 最大酸素摂取量(小動物用トレッドミルと呼吸ガス分析)

骨格筋組織学的評価およびミトコンドリア機能評価

下肢骨格筋組織を用いて、ミトコンドリア呼吸能(state 3、state 4、RCI)、TCA サイクル酵素活性(クエン酸合成酵素)、骨格筋線維型(SDH 染色)

ミトコンドリア鉄代謝および酸化ストレス評価

ミトコンドリア内鉄容量(ELISA 法)、ミトコンドリア鉄代謝関連タンパク mitochondrial ferritin、frataxin、mitofferin2、ATP-binding cassette protein B7/8、(ウエスタンブロット法)、活性酸素(Amplex red 法)

mitoNEET 発現

下肢骨格筋組織における mitoNEET タンパ

ク量をウエスタンブロット法で測定する。

(2) 骨格筋不全に対する mitoNEET の役割: mitoNEET 欠損マウスを用いた解析
mitoNEET 欠損マウス用いて、1) と同様に実験を行った。

(3) mitoNEET のミトコンドリア鉄代謝における役割

HEK293 細胞に FLAG 付き mitoNEET タンパクを過剰発現させ、タンパクを抽出し、FLAG に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降で得られたタンパクを電気泳動し、ゲルの銀染色を行った。銀染色されたバンドをゲルから抽出し、質量分析法で、mitoNEET 結合タンパクが解析された。

4 . 研究成果

(1) 糖尿病モデル、高血圧モデル、心不全モデルのいずれにおいても持久的運動能力が低下していた。さらに、下肢骨格筋の評価では、ミトコンドリア呼吸能およびクエン酸合成酵素が障害されていた。また、骨格筋線維型が持久性の高い遅筋の割合が減少し、相対的に速筋の割合が増加した。

(2) ミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア内鉄容量を測定したところ慢性疾患モデルにおいて有意に増加した。また、活性酸素種産生も増加した。mitoNEET タンパク発現を調べたところ、有意に減少した。

(3) mitoNEET 欠損マウスを作成したところ、外観は変化がなかった。3 か月齢では、月齢を調整した野生型と比較して運動エネルギーに変化がなかったが、12 か月齢では有意に運動能力が低下した。12 か月齢の mitoNEET 欠損マウスのミトコンドリア呼吸能は低下し、活性酸素種産生は増加した。

(4) mitoNEET 欠損マウスのミトコンドリア内鉄容量は約 2 倍まで増加した。それに一致して、mitochondrial ferritin のタンパク発

現は増加した。一方、ミトコンドリアの鉄流入、流出、代謝に関わる既知のタンパク (mitoferin2, ABCB 7, 8, frataxin) はいずれも変化がなかった。

(5) 質量分析法の解析では、mitoNEET と結合するタンパクとして、鉄代謝に関わる細胞質タンパク (X) とミトコンドリア内へ物質を輸送する可能性があるミトコンドリア内膜タンパク (Y) が抽出された。内因性にも mitoNEET と X および Y が結合することが明らかとなった。また、Y を抑制することによって、ミトコンドリア内の鉄が減少することが明らかとなった。

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 8 件)

Takada S, Masaki Y, Kinugawa S, Matsumoto J, Furihata T, Mizushima W, Kadoguchi T, Fukushima A, Homma T, Takahashi M, Harashima S, Matsushima S, Yokota T, Tanaka S, Okita K, Tsutsui H: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of GLP-1 receptor signaling. *Cardiovasc Res* 2016. 111;338-47、査読有、doi: 10.1093/cvr/cvw182.

Fukushima A, Kinugawa S, Takada S, Matsumoto J, Furihata T, Mizushima W, Tsuda M, Yokota T, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H: Direct renin inhibitor ameliorated insulin resistance by improving insulin signaling and oxidative stress in the skeletal muscle from post-infarct heart failure in mice. *Eur J Pharmacol* 2016. 779;147-56、査読有、doi: 10.1016/j.ejphar.2016.03.022.

Takada S, Kinugawa S, Matsushima S, Takemoto D, Furihata T, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Ono Y, Shibata H, Okita K, Tsutsui H: Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. *Exp Physiol* 2015. 100(11):1319-30、査読有、doi: 10.1113/EP085251.

Nishikawa M, Ishimori N, Takada S, Saito A, Kadoguchi T, Furihata T, Fukushima A, Matsushima S, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H: AST-120 ameliorates lowered exercise capacity and mitochondrial biogenesis in the skeletal muscle from mice with chronic kidney disease via reducing oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 2015. 30(6):934-942、査読有、doi: 10.1093/ndt/gfv103.

Kadoguchi T, Kinugawa S, Takada S, Fukushima A, Furihata T, Homma T, Masaki Y, Mizushima W, Nishikawa M, Takahashi M, Yokota T, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II can directly induce mitochondrial dysfunction, decrease oxidative fibre number and induce atrophy in mouse hindlimb skeletal muscle. *Exp Physiol* 2015. 100(3):312-22、査読有、doi: 10.1113/expphysiol.2014.084095.

Fukushima A, Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Sobirin MA, Ono T, Takahashi M, Suga T, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Kadoguchi T, Yokota T, Okita K, Tsutsui H: (Pro)renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014.307(6):E503-14、査読有、doi: 10.1152/ajpendo.00449.2013.

Takada S, Hirabayashi K, Kinugawa S, Yokota T, Matsushima S, Suga T, Kadoguchi T, Fukushima A, Homma T, Mizushima W, Masaki Y, Furihata T, Katsuyama R, Okita K, Tsutsui H: Pioglitazone ameliorates the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2014.740:690-696、査読有、doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.008.

Suga T, Kinugawa S, Takada S, Kadoguchi T, Fukushima A, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Takahashi M, Sobirin MA, Ono T, Hirabayashi K, Yokota T, Okita K, Tsutsui H: Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. *Endocrinology*, 2014.155(1):68-80、査

読有、doi: 10.1210/en.2013-1382.
〔学会発表〕(計 5 件)
降旗高明, 絹川真太郎: Mitochondrial iron homeostasis in the heart. 第 20 回日本心不全学会学術集会, 2016.10.9, 口イトン札幌 (北海道・札幌市)
高田真吾, 降旗高明, 絹川真太郎: mitoNEET タンパクはミトコンドリアの鉄恒常性を調節する. 第 71 回日本体力医学会大会, 2016.9.24, いわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)
Furihata T, Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Mizushima W, Tsuda M, Matsumoto J, Yokota T, Tsutsui H: mitoNEET regulates mitochondrial iron homeostasis in the hearts. 第 80 回日本循環器学会学術集会, 2016.3.18, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
Furihata T, Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Mizushima W, Yokota T, Tsutsui H: Desruption of mitoNEET, outer mitochondrial membrane protein, increases mitochondrial iron content in the heart. The 32nd Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, 2015.12.11, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
降旗高明, 絹川真太郎, 松島将士, 高田真吾, 福島 新, 水島 航, 門口智泰, 正木芳弘, 横田 卓, 筒井裕之: Disruption of mitoNEET protein increases mitochondrial iron content in the heart. 第 79 回日本循環器学会学術集会, 2015.4.24, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://cvhp.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
絹川 真太郎 (KINUGAWA, Shintaro)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60399871

(2)研究分担者
筒井 裕之 (TSUTSUI, Hiroyuki)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 70264017

横田 卓 (YOKOTA, Takashi)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 90374321

松島 将士 (MATSUSHIMA, Shouji)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 80552869

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
降旗 高明 (FURIHATA, Takaaki)
高田 真吾 (TAKADA, Shingo)