

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04960

研究課題名(和文) 筋収縮機能を回復するミトコンドリア・リハビリテーション学

研究課題名(英文) Molecular rehabilitation of mitochondrial function towards preventing muscle atrophy

研究代表者

二川 健 (NIKAWA, Takeshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：20263824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：「寝たきり」は、高齢者のQOLを低下させるだけでなく、介護者への過大な負担、社会保障費の急激な増大をもたらしている。この寝たきりの原因は、筋肉の萎縮・拘縮である。我々は、JAXA(宇宙航空研究開発機構)と共同で、筋肉の萎縮・拘縮を防ぐには、メカノセンサーであるミトコンドリアの機能回復が必須である。昨年度に引き続き、本研究では、無重力や寝たきりなどUnloadingによる筋萎縮や筋拘縮のメカニズムを解明し、ミトコンドリアの機能回復を可能とする機能性食材の摂取と併用する新規リハビリテーション法の有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)："Bedridden" not only reduces the quality of life for the elderly, it causes an excessive burden on caregivers and a sharp increase in social security expenses. The cause of this bedridden is muscle atrophy / contracture. In collaboration with JAXA (Japan Aerospace Exploration Agency), we need to restore the function of mitochondria, a mechanosensor, to prevent atrophy and contracture of muscles. Continuing from the last fiscal year, this study demonstrates the effectiveness of a new rehabilitation method to elucidate the mechanism of muscle atrophy and muscle contracture caused by Unloading, such as weightlessness and bedridden, and intake of functional ingredients enabling mitochondrial function recovery did.

研究分野：分子栄養学、宇宙生物学

キーワード：筋萎縮 ミトコンドリア 酸化ストレス 抗酸化栄養素 ユビキチンリガーゼCbl-b

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え寝たきり患者が急増している我が国では、無重力や寝たきりが筋萎縮・筋拘縮へとつながる機構の証明とその治療法開発が待たれている。「無重力や寝たきりによる筋萎縮のメカニズムを解明する」ための MyoLab 宇宙実験(2010年4月に実施)と前研究(基盤研究B 廃用性筋萎縮の鍵を握るミトコンドリア生物学)から、図1に示すように、このような機械的ストレスの感知は、ミトコンドリアと小胞体(ER)との相互作用(MAM: Membran-associated ER membrane)により行われることがわかってきた。

本研究では、これらの知見を基に、MAMの構造異常が筋萎縮・筋拘縮の原因となるミトコンドリア機能異常に繋がることを解明する。さらには、MAMの構造を維持し、ミトコンドリアの機能回復を可能とする分子リハビリテーション/栄養法とも言うべき、新しい概念の治療法を提案したい。

一方、無重力や寝たきりなど筋肉に負荷がかからない状態(機械的ストレス)が、どのようにしてMAMの構造異常を起こすのかも明らかにしたい。MAM構造は機械的ストレスにより直接作用を受けやすい構造であり、これにより機械的シグナルが化学シグナルに変換される全貌が明らかになる。

## 2. 研究の目的

長寿命社会を実現した我が国では、高齢者の運動機能の維持が大きな社会問題となっている。なかでも、「寝たきり」は高齢者のQOLを低下させるだけでなく、介護者の過酷な負担、社会保障費の急激な増大をもたらしている。この「寝たきり」の原因は、筋肉の萎縮・拘縮である。我々は、JAXA(宇宙航空研究開発機構)と共同で、筋肉の萎縮・拘縮を防ぐには、メカノセンサーであるミトコンドリアの機能回復が必須であることを見出した。本研究では、無重力や寝たきりなど Unloading による筋肉の萎縮から拘縮に到る分子メカニズムを解明し、ミトコンドリアの機能回復を可能とする機能性食材の摂取と併用する新規リハビリテーション法の有効性を実証する。

## 3. 研究の方法

### (1) Unloading による MAM の構造異常

PLA法(Proximity Ligation Assay法はミトコンドリアと小胞体の相互作用(MAM構造))を検出できる優れた方法である(Tubbs E et al. Diabetes 2014)。我々は、固定法を改良し細胞だけでなく筋組織でもMAM構造を検出できるようにした。ギプス固定したマウス後肢筋や模擬微小重力(クリノローテーション)に供した筋細胞を経時的に観察した結果、ミトコンドリアの断裂が起こる前にMAM構造が消失していた。無重力などのメカノセンサーが、ミトコンドリアではなく、MAMの構造

変化であると考え本研究の根拠である。

### (2) MAM の構造異常とミトコンドリア代謝異常の連関

MAM構造が消失した筋肉からミトコンドリア画分を粗抽出し、小胞体とミトコンドリアの接着分子 Mitofusin-2 などの分解や修飾(リン酸化、ユビキチン化)を生化学的、分子生物学的に解析する。これら接着分子が断裂したり、過度の修飾を受けたりすることがMAM構造の異常に繋がったことを明らかにする。

廃用性萎縮筋では、ミトコンドリア代謝異常(アコニターゼ活性やATP産生量の低下)が起こる。MAM構造の異常がどのようにして筋萎縮に通じるミトコンドリア代謝異常を生じるのか明らかにする。MAM構造内には多数のカルシウム・チャネルやトランスポーターが存在することや Mitofusin-2 が過剰なリン酸化やユビキチン化を受けていることより、MAM構造の破綻がカルシウムの過剰放出を引き起こしているのではないかと考えている。その結果、酸化ストレスやリン酸化シグナルが活性化していることを証明する。

### (3) 分子リハビリテーション/分子栄養法とマクロリハビリテーション

MAM構造を維持・回復しミトコンドリア機能を正常に保つ方法を細胞レベルならび動物実験レベルで開発する。具体的には、細胞への分子リハビリテーションと同等の効果をうるにはどのような運動療法がよいのかを動物実験で確認する。さらに、Mitofusin-2のリン酸化やユビキチン化を改善させる抗酸化栄養素(レスベラトロールなど)のMAM構造への効果も検討する。抗酸化栄養素単独でもMAM構造の改善が見られた。分子リハビリテーションと抗酸化栄養素の組み合わせによる相乗効果も期待できる。

ギプス固定したマウス後肢筋にリハビリテーションを施し、どのようなりハビリテーションがMAM構造の再建に適しているかを検討する。

### (4) MAM 構造異常と転写異常

無重力環境で培養した筋細胞のトランスクリプトームを次世代シーケンサーで解析した結果、無重力により一遺伝子の読み間違いや欠失を起こしたRNAが25個検出できた(論文投稿中)。今回の我々の仮説が正しければ、MAM構造の異常により発生した酸化ストレスがミトコンドリアだけでなくリボソームの転写を変化させていると考えられる。あるいは、RNAポリメラーゼも酸化ストレスに感受性の高い鉄硫黄クラスターを有している(Lill R. Nature 2009)。小胞体、ミトコンドリアとリボソームのオルガネラ連関もあるのかもしれない。

## 4. 研究成果

(1)「無重力や模擬無重力による筋細胞内酸化ストレスの誘導」: MyoLab 宇宙実験においてL6細胞を宇宙に打ち上げ、メタボローム解析を行ったところ、酸化ストレスの蓄積

が示唆された。そこで、地上での模擬微小重力モデルの一つである 3D-Clinorotation を用いて酸化ストレスの測定を行うと、3D-Clinorotation 開始後 0.5 時間という早い段階から酸化ストレス産生が増大していることが分かった。

(2) 「酸化ストレスによるユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現」: 我々は、廃用性筋萎縮に關与する酸化ストレスを介した二つの経路を見出した。その一つ目は、筋質量を減少させる、転写調節因子 Egr1/2 を介した Cbl-b の発現上昇経路である。我々は、Cbl-b の上流因子を調べるために、ルシフェラーゼアッセイを用いて、酸化ストレスによるヒト Cbl-b 遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、上流-111 bp ~ -60 bp で酸化ストレス応答性のルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。上流配列の候補タンパク質を用いたスーパーシフトアッセイから、Cbl-b の発現は酸化ストレス誘導性の Egr1/2 であることが示された。

(3) 「酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常」: もう一つは、酸化ストレスがミトコンドリア・アコニターゼ活性を不活化し、ミトコンドリアの機能障害を引き起こす経路である。宇宙空間で培養した L6 細胞において、TCA サイクル上の中間生成物である cis アコニット酸の蓄積が見られていたため、これらを触媒する酵素であり、酸化ストレス感受性を持つアコニターゼに注目した。そこで、3D-Clinorotation を行い、アコニターゼ活性について調べたところ、活性の有意な低下が見られた。

(4) 「アコニターゼロックアウトの筋管細胞への影響」: アコニターゼロックダウンは筋管細胞の好氣的解糖系を障害し、嫌氣的解糖系を高めた。その結果、ATP 産生量は減少した。さらに、アコニターゼロックダウンは Drp1 を介してミトコンドリアの断片化を誘導し、遅筋型のみオシン重鎖の分解を引き起こした。

(5) 「新規治療法の開発」

NAC, TEMPOL, フラボノイドなど抗酸化物質(栄養素)が、Egr の活性化を抑制するとともに、MAM 構造の破綻を有意に抑制した。さらに、システインやフラボノイドを薬理量摂取させたラットは、尾部懸垂や坐骨神経切除による筋萎縮に抵抗性を示した。抗酸化物質を投与したラットは、尾部懸垂や坐骨神経切除による MAM 構造の破綻が抑制されており、これに歩行などのマクロナリハビリテーションを施行するとコントロールに比べより筋量が増大した。

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 14 件)

1. Tomida C, Yamagishi N, Nagano H, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, Teshima-Kondo S. VEGF pathway-targeting drugs induce evasive adaptation by activation of neuropilin-1/cMet in colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2018 Apr; 52 (4):1350-1362. 査読有
2. Uchida T, Sakashita Y, Kitahata K, Yamashita Y, Tomida C, Kimori Y, Komatsu A, Hirasaka K, Ohno A, Nakao R, Higashitani A, Higashibata A, Ishioka N, Shimazu T, Kobayashi T, Okumura Y, Choi I, Oarada M, Mills EM, Teshima-Kondo S, Takeda S, Tanaka E, Tanaka K, Sokabe M, Nikawa T. Reactive oxygen species up-regulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Mar 7. [Epub ahead of print] 査読有
3. Tomida C, Nagano H, Yamagishi N, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, Teshima-Kondo S. Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor. *J Med Invest.* 2017;64 (3.4):262-265. 査読有
4. Tomida C, Yamagishi N, Nagano H, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, Teshima-Kondo S. Antiangiogenic agent sunitinib induces epithelial to mesenchymal transition and accelerates motility of colorectal cancer cells. *J Med Invest.* 2017;64(3.4):250-254. 査読有
5. Umehara H, Numata S, Watanabe SY, Hatakeyama Y, Kinoshita M, Tomioka Y,

- Nakahara K, Nikawa T, Ohmori T. Altered KYN/TRP, Gln/Glu, and Met/methionine sulfoxide ratios in the blood plasma of medication-free patients with major depressive disorder. *Sci Rep.* 7(1):4855. 2017 査読有
6. Abe T, Hirasaka K, Nikawa T. Involvement of Cbl-b-mediated macrophage inactivation in insulin resistance. *World J Diabetes.* 8(3):97-103. 2017 査読有
  7. Ikeda H, Souda H, Puspitasari A, Held KD, Hidema J, Nikawa T, Yoshida Y, Kanai T, Takahashi A. Development and performance evaluation of a three-dimensional clinostat synchronized heavy-ion irradiation system. *Life Sci Space Res (Amst).* 2017 Feb;12:51-60. 査読有
  8. Ju H, Kim T, Chung CM, Park J, Nikawa T, Park K, Choi I. Metabolic Suppression by 3-Iodothyronamine Induced Muscle Cell Atrophy via Activation of FoxO-Proteasome Signaling and Downregulation of Akt1-S6K Signaling. *Biol Pharm Bull.* 2017 May 1;40(5):576-582. 査読有
  9. Takeya M, Okumura Y, Nikawa T. Modulation of cutaneous extracellular collagen contraction by phosphorylation status of p130Cas. *J Physiol Sci.* 67(5):613-622. 2017 査読有
  10. Mukai R, Horikawa H, Lin PY, Tsukumo N, Nikawa T, Kawamura T, Nemoto H, Terao J. 8-Prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 311(6):R1022-R1031. 2016 査読有
  11. Hirasaka K, Saito S, Yamaguchi S, Miyazaki R, Wang Y, Haruna M, Taniyama S, Higashitani A, Terao J, Nikawa T, Tachibana K. Dietary Supplementation with Isoflavones Prevents Muscle Wasting in Tumor-Bearing Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 62(3):178-84. 2016 査読有
  12. Mukai R, Matsui N, Fujikura Y, Matsumoto N, Hou DX, Kanzaki N, Shibata H, Horikawa M, Iwasa K, Hirasaka K, Nikawa T, Terao J. Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *J Nutr Biochem.* 31:67-76. 2016 査読有
  13. Ohno A, Ochi A, Maita N, Ueji T, Bando A, Nakao R, Hirasaka K, Abe T, Teshima-Kondo S, Nemoto H, Okumura Y, Higashibata A, Yano S, Tochio H, Nikawa T. Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. *Arch Biochem Biophys.* 15;594:1-7. 2016 査読有
  14. Hirasaka K, Mills EM, Haruna M, Bando A, Ikeda C, Abe T, Kohno S, Nowinski SM, Lago CU, Akagi K, Tochio H, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Nikawa T. UCP3 is associated with Hax-1 in mitochondria in the presence of calcium ion. *Biochem Biophys Res Commun.* 472(1):108-13. 2016 査読有
- [学会発表](計21件)
1. Takeshi Nikawa, Takayuki Uchida, Ayako Miata (Ohno), Reiko Nakao,

- Molecular mechanism and nutritional approach for unloading-mediated muscle atrophy, 2018 International Conference on Functional Food for improving Sarcopenia, Cachexia and Frailty, 2018.3.2, GIS NTU コンベンションセンター (台湾)
2. Takeshi Nikawa, Molecular mechanism and nutritional approach for unloading-mediated muscle atrophy, 3rd International Symposium on Mechanobiology, 2017.12.13, National University of Singapore (シンガポール)
  3. 二川健, 無重力ストレスに対する初期応答酵素 (アコニターゼ) の筋萎縮における役割, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 第 40 回日本分子生物学会年会, 第 90 回日本生化学会大会, 2017.12.7, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
  4. 二川健, Molecular mechanism of microgravity-induced muscle atrophy, 第 65 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2017.11.18, 昭和大学 (東京都・品川区)
  5. 小松明生、鉄野文香、二川健、無重力による筋細胞内シグナルトランスダクション, 第 64 回日本栄養改善学会学術総会, 2017.9.14, アスティとくしま (徳島県・徳島市)
  6. Takeshi Nikawa, Unloading induces reactive oxygen species associated signal transduction toward atrophy in skeletal muscle cells, 14th Japan-Korea Joint Seminar on Space Environment Utilization Research, 2017.8.24, Korea Aerospace Research Institute (Korea)
  7. 内田貴之、真板綾子、中尾玲子、小林剛、東谷篤志、石原直忠、武田伸一、曾我部正博、二川健、無重力ストレスによる筋萎縮における酸化ストレスの重要性, 日本筋学会第 3 回学術集会, 2017.8.4, 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市)
  8. 内田貴之、木森有希、二宮みゆき、坂下禎宏、安倍知紀、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、小林剛、曾我部正博、武田伸一、二川健、無重力による酸化ストレス産生を介した筋細胞内シグナル・トランスダクション, 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 2017.5.21, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)
  9. 木森有希、二宮みゆき、相原知佳、坂下禎宏、内田貴之、安倍知紀、中尾玲子、真板綾子、近藤茂忠、二川健、Mfn2 ノックダウンの筋肉における影響の検討、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017.5.21、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)
  10. 二川健、骨格筋蛋白質代謝と骨格筋量調節、第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会、2017.1.15、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
  11. Saki Tsugita, Katsuya Hirasaka, Marie Haruna, Edward M.Mills, Aki Bando, Tomoki Abe, Cory U. Lago, Sara M. Nowinski, Ken-ichi Akagi, Hidehito Tochio, Ayako Ohno, Shigetada-Teshima-Kondo, Yuushi Okumura, Takeshi Nikawa, 11th Asian Microgravity Symposium, 2016.10.26, 北海道大学 (北海道・札幌市)
  12. Takeshi Nikawa, Rie Hashimoto, Katsuya Hirasaka, Chiaki Yano, Kana Aibara, Takayuki Uchida, Tomoki Abe, Ayako Ohno (Maita), Kazuhito Akama, Effects of dietary soy protein on unloading mediated muscle atrophy, 11th Asian Microgravity Symposium, 2016.10.26, 北海道大学 (北海道・札幌市)
  13. 二川健、筋蛋白質代謝改善のための栄養学的アプローチ、第 2 回日本筋学会学術集会、2016.8.6、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市)
  14. 二川健、廃用性筋萎縮とユビキチンリガーゼ、第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2016.8.5、千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)
  15. Takeshi Nikawa, Rie Hashimoto, Katsuya Hirasaka, Chiaki Yano, Kana Aibara, Ayako Ohno (maita), Kazuhito Akama, Effects of dietary soy protein on skeletal muscle volume and strength in humans with various physical activities, Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease, 2016.6.7, Asilomar Conference Ground (USA)
  16. 内田貴之、井田くるみ、矢野千晶、安倍知紀、真板 (大野) 綾子、Floriane Rudwill、近藤茂忠、中尾玲子、平坂勝也、小林剛、曾我部正博、東端晃、石岡憲昭、武田伸一、二川健、無重力による筋細胞内シグナル・トランスダクション, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016.5.14, 武庫川女子大学 (兵庫県・西宮市)
  17. 二川健、無重力ストレスに対する筋細胞の応答機構, 第 42 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2015.11.13, ソラシティカンファレンスセンター (東京都・千

- 代田区)
18. Tomoki Abe, Katsuya Hirasaka, Marina Takagi, Hikaru Kishimoto, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Takeshi Nikawa, Capric acid up-regulates UCP3 expression without PDK4 induction in mouse C2C12 myotubes, 44th European Muscle Conference, 2015.9.24, フルシャワ大学 (ポーランド)
  19. 次田早希、平坂勝也、奥村裕司、安倍知紀、真板綾子、近藤茂忠、二川健、UCP3 と Hax-2 の相互作用様式の解明、第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2015.8.21、ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋 (愛知県・名古屋市)
  20. 内田貴之、安倍知紀、近藤茂忠、真板(大野)綾子、中尾玲子、平坂勝也、小林剛、曾我部正博、東端晃、石岡憲昭、武田伸一、二川健、無重力ストレスによる筋細胞内シグナル・トランスダクション、第 1 回日本筋学会学術集会、2015.8.8、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市)
  21. Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa, Tomoki Abe, Shohei Kohno, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Katsuya Hirasaka, Yuushi Okumura, Mills M Edward, Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading, 30th International Symposium on Space Technology and Science, 2015.7.7, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 3 件)

1. 坂下禎宏、内田貴之、二川健、医薬ジャーナル社、Clinical Calcium, 運動・スポーツと骨・関節、2016、172: 79-85
2. 岸本ひかる、内田貴之、北畑香菜子、二川健、医薬ジャーナル社、Clinical Calcium, 筋肉研究の最前線、2016、144: 27-32
3. 塚原典子、二川健、近藤茂忠、松田早苗、山本孝史、藺田勝、安倍知紀、建帛社、三訂 基礎栄養学、2015、総ページ 205 (pp39-52, pp147-162)

〔産業財産権〕  
特になし

〔その他〕

2016 年 第 70 回 日本栄養・食糧学会  
学会賞受賞  
2018 年 3 月 第 3 回宇宙開発利用大賞で文部  
科学大臣賞受賞

ホームページ:

<https://tokudai-seitaieiyo.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二川 健 (NIKAWA, Takeshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 20263824

(2) 研究分担者

曾我部 正博 (SOKABE, Masahiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授  
研究者番号: 10093428

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号: 40323646

宮本 賢一 (MIYAMOTO, Kenichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 70174208