

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：32672

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04759

研究課題名(和文) 温熱刺激がNrf2を活性化する新規機構の解明：がん性悪液質への温熱療法を見据えて

研究課題名(英文) Heat stress-induced Nrf2 activation: Mechanisms and Physiological Significance

研究代表者

田村 優樹 (TAMURA, Yuki)

日本体育大学・体育学部・助教

研究者番号：20794978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：温熱刺激によって転写因子Nrf2が活性化する分子メカニズムならびに生理的意義を解明することが本研究の主たる目的である。温熱刺激によるNrf2の活性化はmTORC1-p62の活性化を介している可能性が示唆された。また、温熱刺激によるNrf2の活性化は、熱応答性転写因子HSF1と相互に補償されている可能性が示唆された。温熱刺激によるNrf2の活性化は、細胞内のタンパク質の恒常性維持に貢献している可能性がある。また、基礎的な知見の応用可能性を探るための試験も実施した。その結果、温熱刺激が、がん悪液質のリハビリテーションとして有用であ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

温熱刺激は、古典的な物理療法として整形外科でのリハビリテーションや温泉療法として臨床で広く利用されている。しかし、これらの効果を裏付ける生物学的根拠は乏しく、新規適応症や禁忌症を見逃す恐れがある。本研究で温熱刺激によるNrf2の活性化のメカニズムや生理的意義の一端を解明したことにより、より安全かつ効果的な温熱療法の開発が期待できる。実際に、本研究では、癌悪液質への適用可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to clarify the molecular mechanism and physiological significance of activation of transcription factor Nrf2 by heat stress. Our results suggest that the activation of heat stress-induced Nrf2 activation may be mediated by the activation of mTORC1-p62 signal transductions. It was also suggested that the activation of Nrf2 by heat stress might be compensated with the transcription factor HSF1. Activation of Nrf2 by heat stress can contribute to the proteostasis. Moreover, experiments were also conducted to explore the applicability of essential findings. The results suggest that heat stress can be useful for the rehabilitation of cancer cachexia.

研究分野：分子生理学

キーワード：温熱刺激 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

温熱刺激は、古典的な物理療法として整形外科でのリハビリテーションや温泉療法として臨床で広く利用されている。しかし、これらの効果を裏付ける生物学的根拠は乏しく、新規適応症や禁忌症を見逃す恐れがある。研究代表者は、これまでに骨格筋のエネルギー代謝などを中心とした骨格筋の質的变化が温熱刺激によって生じるか否かを検討してきた。温熱刺激による新しい骨格筋の質的变化を探索する目的で温熱刺激によって発現が変動する遺伝子の網羅的解析ならびにバイオインフォマティクス解析により活性化したと類推される生物学的プロセスを抽出した。その結果、温熱刺激によって酸化応答のマスター転写因子である Nrf2 が活性化することが示唆され、実験的にもその可能性を支持する結果が得られた。しかし、温熱刺激による Nrf2 の活性化のメカニズムや生理的意義は全く明らかとなっていないことが課題として挙げられた。

2. 研究の目的

本研究では、温熱刺激による Nrf2 の活性化の 1)メカニズム、2)生理的意義、3)応用可能性を理解するために、マウス並ならびに培養細胞を対象とした研究を展開した。

3. 研究の方法

生体を対象とした試験は、オスの ICR マウス(8 週齢)を用いて実施した。マウスを対象とした温熱刺激は、研究代表者が開発した方法を用いて実施した。具体的には、40°C の暑熱環境に 1 セッションあたり 30 分間暴露するといった方法である。一過性の温熱刺激による生理応答を検討する場合は温熱刺激直後、3 時間後にマウスを安楽死させ腓腹筋を摘出した。なお、本研究に関わる一連の動物実験については、日本体育大学動物実験倫理審査委員会の承認を得て実施されたものである。培養細胞を対象とした試験は、マウス骨格筋由来の培養細胞(C2C12 Myotubes)を対象に行なった。なお、研究によっては、マウス大腸がん由来細胞(Colon26)と非接触の共培養(72 時間)を行った。培養細胞への温熱刺激の条件は、42°C で 60 分間とした。骨格筋組織、培養細胞からタンパク質や RNA を抽出しウエスタンブロット法やリアルタイム PCR 法を用いてタンパク質や遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

1)温熱刺激が Nrf2 を活性化させるメカニズム

Nrf2 は、酸化ストレスに反応して活性化することが知られている転写因子である。そこで、温熱刺激によって Nrf2 が活性化したメカニズムを検討するために、温熱刺激によって酸化ストレスが上昇するか否かを検討した。温熱刺激直後および温熱刺激3時間後においては、酸化ストレスマーカー

の上昇は観察されなかった(4-HNE により修飾されたタンパク質量、酸化型グルタチオン濃度)。酸化ストレスが関与した可能性を完全には排除できないものの、この結果は、酸化ストレス非依存的なメカニズムを介して、温熱刺激が Nrf2 を活性化させた可能性を示唆するものである。続いて、本研究では、オートファジーでの分解基質タンパク質と知られている p62/SQSTM1 による Nrf2 の活性化の可能性を検討した。p62 による Nrf2 の活性化は、酸化ストレス非依存的に Nrf2 を活性化させる経路のひとつであるためである。温熱刺激によって p62 の 351 番目のセリン残基のリン酸化が亢進することが示された。

2)温熱刺激が Nrf2 を活性化させる生理的意義

温熱刺激が Nrf2 を活性化させる生理的意義を理解するために、Nrf2 の発現を抑制したマウス骨格筋由来の培養細胞に温熱刺激の介入を行った。その結果、生体への温熱刺激を実施した際に得られた知見を支持するように、多くの Nrf2 標的遺伝子の発現が温熱刺激によって誘導された。一方、予想に反して Nrf2 の発現抑制を行っても、温熱刺激による Nrf2 の標的遺伝子の発現誘導は、一部を除いて多くは減弱しなかった。この結果は、Nrf2 が活性化する意義は、抗酸化能力の補完・上昇ではなく、他の部分にある可能性を示唆する。In silico による Nrf2 標的遺伝子のプロモータ領域の解析により、Nrf2 の標的遺伝子の一部は、熱応答性転写因子 HSF1 の標的遺伝子であることが明らかとなった。Nrf2 の発現を抑制した骨格筋の培養細胞においては、温熱刺激による HSF1 の一層の活性化が観察された。つまり、Nrf2 の発現が抑制され機能が低下していたとしても、HSF1 が補償的に活性化したことにより、温熱刺激による Nrf2 の標的遺伝子の発現誘導は、減弱しなかった可能性が考えられる。今後この興味深い転写因子の機能的相互作用・機能的補償作用について、より詳細に検討を行うことが必要である。そういった取り組みにより、Nrf2 の新しい役割の解明につながる可能性がある。

3)温熱刺激の新しい応用可能性の検討

先行研究から Nrf2 を活性化させることで、「がん悪液質」の治療・リハビリテーションとなる可能性が考えられている。したがって、温熱刺激によって Nrf2 が活性化するのであれば、温熱刺激が、がん悪液質のリハビリテーションとして有効となる可能性がある。がん悪液質は、がんに伴う骨格筋の萎縮である。がん悪液質は、がん患者の 8 割以上が経験し、直接的な死因ともなる他、化学療法の効果を減弱させてしまうことが明らかとなっている。すなわち、がん悪液質の対策を開発することは臨床的にも重要な課題となっている。本研究では、まず温熱刺激の効果を検証するための新しい実験モデルの構築を試みた。マウス骨格筋由来の培養細胞とマウス大腸がん由来の細胞を共培養する実験モデルを構築した。マウス骨格筋培養細胞の萎縮が確認されるなど、複雑な生体内の減少を反映したよりシンプルな実験モデルである特徴がある。この共培養実験モデルを対象に温熱刺激を実施し、骨格筋培養細胞の萎縮が軽減されるか否かを評価した。その結果、がん細胞との共培養による骨格筋細胞の萎縮・タンパク質合成の減弱は、温熱刺激による介入によって部分的に回復することが示された。温熱刺激は、がん悪液質に対するリハビリテーションとして有用である可能性が示唆された。今後は、温熱刺激の効果が本当に Nrf2 を介しているのか？培養細胞で

得られた知見が生体でも適合できるのか？といった課題を検討することで、より臨床への橋渡しに近づくと期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 田村 優樹
2 . 発表標題 Heat stress-induced mitochondrial adaptations in skeletal muscle: Molecular mechanisms and translation
3 . 学会等名 2nd Behavioral Science Cafe (招待講演)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuki Tamura and Koichi Nakazato
2 . 発表標題 A Single Bout of Heat Stress Increases Mitochondria-related Genes with A Non-detectable Changes in p53 Phosphorylation and Translocation in Skeletal Muscle
3 . 学会等名 ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yuki Tamura, Yu Kitaoka, Koichi Nakazato, and Hideo Hatta
2 . 発表標題 A single bout of heat stress increases Nrf2 and its target genes in mouse skeletal muscle
3 . 学会等名 Experimental Biology 2017 (Annual Meeting of American Physiological Society) (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Yuki Tamura
2 . 発表標題 PGC-1 knockdown attenuates heat stress-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle
3 . 学会等名 Cell Symposia: Exercise Metabolism (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と加齢関連疾患治療への応用可能性
3. 学会等名 第27回 東京大学 身体運動科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と分子機序
3. 学会等名 第11回 分子骨格筋代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 分子・細胞生物学からスポーツ現場の「冷却」を再考する
3. 学会等名 日本アスレティックトレーニング学会 学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による代謝適応を介在する「熱センサー分子」は何か？
3. 学会等名 日本メカノバイオロジー研究会 第1回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と老齢による適応性の修飾
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と加齢による変調
3. 学会等名 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法の開発（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と加齢による変調
3. 学会等名 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 筋ジストロフィー研究班 合同班会議（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応と機序：物理療法の作用を生命科学で紐解く
3. 学会等名 第16回 乳酸研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuki Tamura	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 41-52
3. 書名 Heat Shock Proteins in Signaling Pathways	

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