

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18992

研究課題名(和文)骨格筋ミトファジーにおけるSIRT1の役割解明

研究課題名(英文)Role of SIRT1 in mitophagy in the skeletal muscle

研究代表者

細田 隆介 (HOSODA, RYUSUKE)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20749428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋特異的SIRT1ノックアウトマウスは筋機能の低下やオートファジーの減弱を呈し、骨格筋細胞のSIRT1はオートファジーを介して筋機能維持に重要な役割を果たすことが示唆された。また筋芽細胞ではSIRT1活性化薬レスベラトロール(RSV)がミトファジーを促進すること、RSVによるミトコンドリア活性酸素(ROS)量の低下がミトファジー関連因子PINK1のノックダウンにより遮断されたため、SIRT1がミトファジー介してROSを消去する可能性が示された。以上のマウス・培養細胞の実験系で、骨格筋SIRT1とオートファジー/ミトファジーとの関連およびその筋保護作用における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found skeletal muscle dysfunction and impaired activation autophagy in skeletal muscle-specific SIRT1 knockout mice. These suggest that SIRT1 in skeletal muscle cells plays an important role in maintaining skeletal muscle function via autophagy. In myoblasts, resveratrol (RSV), a SIRT1 activator, promoted mitophagy. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels induced by antimycin A were significantly reduced by RSV. This effect of RSV was blocked by knockdown of PINK-1 which triggers mitophagy, suggesting that SIRT1 activation decrease mitochondrial ROS levels via mitophagy. We demonstrate using in vivo and in vitro models the relationship between SIRT1 and autophagy/mitophagy and its significance in skeletal muscle protection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミトファジー SIRT1 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

老化・寿命の分子メカニズムはここ 10 年余りで飛躍的に解明が進み、老化・寿命制御因子が様々な疾患の治療標的となりうることも明らかになってきた。SIRT1 は「長寿遺伝子」Sir2 の哺乳類ホモログであるサーチュインの一つである。その本体は NAD⁺ 依存性に活性化し、標的蛋白を脱アセチル化することにより細胞機能を調節する蛋白である。

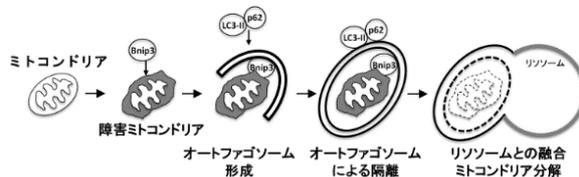
当教室は、SIRT1 は細胞質と核の間をシャトルする蛋白であり (Tanno et al. J Biol Chem 2007)、その SIRT1 の細胞質-核間シャトル機能が神経幹細胞分化に関与すること (Hisahara et al. PNAS 2008) を明らかにしてきた。また SIRT1 活性化薬レスベラトロールの長期投与が心不全発症ハムスターの心機能を維持すること (Tanno et al. J Biol Chem 2010) や、皮膚がんメラノーマ細胞では SIRT1 が癌細胞転移に重要であり、SIRT1 阻害薬がメラノーマの転移を抑制すること (Kunimoto et al. J Invest Dermatol 2014) など、SIRT1 制御による疾患治療への可能性についても成果をあげてきた。申請者はこれまで SIRT1 活性化による細胞保護メカニズムの解明を行い、その成果としてレスベラトロールは SIRT1 を介して Superoxide dismutase 2 (SOD2) を増加させ (Hosoda et al. J Pharmacol Exp Ther 2013)、その SOD2 増加における転写因子 FoxO の関与 (Hori et al. PLoS One 2013)、そしてレスベラトロールの細胞死抑制には p53 抑制も関与すること (Hori et al. PLoS One 2013) を明らかにし報告してきた。

骨格筋はヒトでは体重の約 40% を占める生体内最大の臓器である。最近では骨格筋の状態と quality of life さらには生命予後との関連が示唆され注目されている。SIRT1 は骨格筋にも発現しているが、その役割は十分解明されていない。最近研究代表者らは、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx マウスへのレスベラトロール投与は、骨格筋障害のみならず心筋症をも軽減することを報告し (Kuno et al. J Biol Chem 2013, Hori et al. J Pharmacol Exp Ther. 2011)、SIRT1 が筋ジストロフィーの治療標的となる可能性を見出した。この我々の研究成果を基に、ヒト筋ジストロフィー症におけるレスベラトロールの効果を評価する臨床試験が現在当大学附属病院で進行中である。さらなる検討から、mdx マウスではレスベラトロールが、(1) 筋障害発症に重要な筋組織の活性酸素種 (ROS) 量を低下させ、(2) 筋障害の指標である血中クレアチンキナーゼ (CK) の上昇を抑制することを見出した (未発表)。そして、この ROS の軽減には SOD2 や catalase といった抗酸化酵素の発現増加は伴わず、SIRT1 の既知の抗酸化機構とは独立した未知のメカニズムの存在が予想された。

オートファジーは、細胞が飢餓に陥ると細

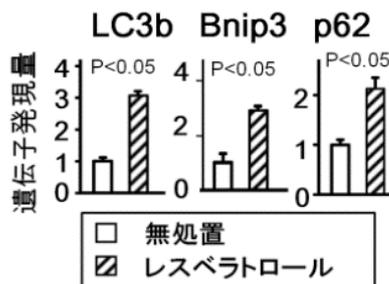
胞質内の蛋白やオルガネラをオートファゴソームと呼ばれる隔離膜で取り囲みリソソーム依存性に分解しリサイクルするという細胞の適応機構である。SIRT1 が栄養飢餓状態で活性化しそれを是正する機能とよく似ており、SIRT1 がオートファジーを促進することも報告されている。特に蛋白合成が盛んな骨格筋ではオートファジーによる蛋白処理機構は重要であることが予想される。実際にマウスでは筋量の維持に筋オートファジーが必須であることや、筋ジストロフィー患者やモデルマウスの筋組織でオートファジー活性が低下し、オートファジーの促進が筋ジストロフィーモデルの筋障害を軽減することが報告されている。

一方、ミトコンドリア・オートファジー (マイトファジー: mitophagy) は最大の ROS 発生源となり得る障害ミトコンドリアを処分する機構として注目されている (下図)。



最近の我々の検討では、mdx マウスへのレスベラトロール処置による運動耐容能改善や筋組織 ROS 量の軽減には、筋でのオートファジーの亢進とマイトファジー進行因子 LC3b や Bnip3 などの発現上昇を伴っていた (下図)。

Mdxマウスへのレスベラトロールによる遺伝子発現変化(大腿四頭筋)



そこで申請者は SIRT1 による酸化ストレス軽減の新規メカニズムとして、ミトコンドリア・オートファジーの制御を想起した。

2. 研究の目的

以上の所見を踏まえて、本研究の目的を SIRT1 とマイトファジーの関連に焦点を絞り、(1) 骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウスおよび培養筋細胞モデルを用いて、SIRT1 が骨格筋でマイトファジーを制御し ROS 軽減やミトコンドリア機能さらには筋機能を維持するかを明らかにし、(2) さらにその制御機構を分子レベルで明らかにすることとした。

3. 研究の方法

我々は骨格筋での SIRT1 の役割を解明するため、そして骨格筋で SIRT1 がマイトファジーを調節するかどうか、またその調節機構を明らかにする目的で骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (SIRT1 smKO) を確立し、本研究に用いた。また、C2C12 筋芽細胞を用いて、in vitro の実験系においても SIRT1 とマイトファジーの関連についての評価を行った。

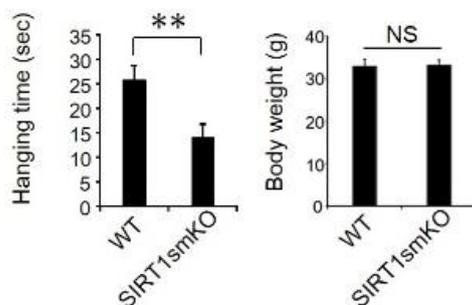
- (1) 筋力の評価を行うために、ハンギングテスト (ぶら下がり時間の測定)、トレッドミルを用いた運動耐容能の評価、そしてグリップテスト (握力) が、野生型と比較して SIRT1 smKO で低下していないか比較をした。
- (2) 骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウスを用いて、上記のトレッドミル運動時の筋障害の程度を評価するために、トレッドミル前 2 週間および運動後 1 時間の時点で採血を行い、血中の LDH を測定した。
- (3) 骨格筋障害の他の指標として、筋線維内へのエバンスブルー取込みを評価した。具体的にはトレッドミル運動後にエバンスブルーを腹腔内投与し筋肉を採取する。組織切片において、蛍光顕微鏡によりエバンスブルーが発する赤の蛍光を観察し、筋膜の損傷を評価した。
- (4) 骨格筋におけるオートファジー活性の評価として、絶食により誘導されるオートファジーのレベルを、Western Blot 法により、オートファゴソームの指標である LC3 に対する抗体を用いて、特にオートファゴソーム膜で検出される LC3-II の定量を行った。
- (5) C2C12 細胞を用いて、SIRT1 活性化がマイトファジーを促進するかを評価した。具体的には、GFP タグした LC3 を発現させた C2C12 細胞においてミトコンドリア検出試薬である MitoTracker Red によりミトコンドリアを可視化した。SIRT1 活性化薬であるレスベラトロール (RSV) を 0 または 30 μ M を 12 時間処置し、共焦点レーザー顕微鏡にて、GFP-LC3 dot (オートファゴソーム) とミトコンドリアの重なり、つまりオートファジーにより処分されるミトコンドリアを検出した。
- (6) SIRT1 活性化による ROS 消去におけるオートファジー/マイトファジーの役割を評価した。具体的には、ミトコンドリア ROS 検出試薬である MitoSOX Red を用い、ミトコンドリア ROS 促進剤であるアンチ

マイシン A 処置により増加した MitoSOX Red 蛍光量における RSV 処置の効果が、オートファジー阻害薬であるクロロキンや、オートファジー関連蛋白 Atg5 やマイトファジー関連蛋白 PINK-1 のノックダウンで遮断されるかを評価した。

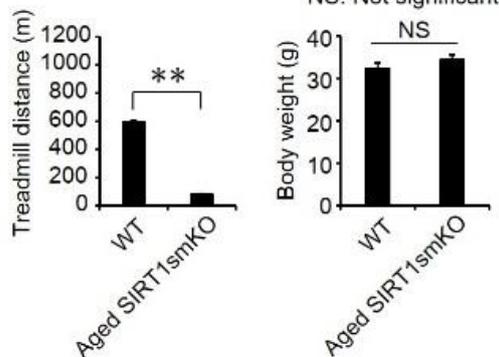
4. 研究成果

- (1) 野生型と比較して、SIRT1 smKO マウスではハンギングテストにおけるつかまり時間が有意に短縮し (下図 A)、トレッドミルテストにおける走行距離も有意に短縮 (下図 B) していた。そしてグリップテストによる握力は SIRT1 smKO で有意に低下していた。従って、SIRT1 smKO では筋力低下および筋持久力の低下が見られた。

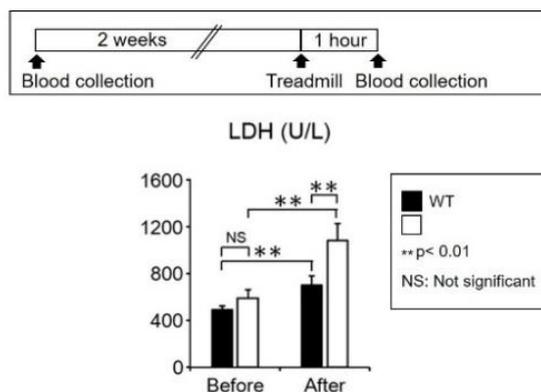
A: 14 months old



B: 30 months old



- (2) トレッドミル前の血中 LDH 値には差がなかったものの、トレッドミル後の LDH 値は SIRT1 smKO で有意に高値であり、運動による筋障害が SIRT1 smKO でより高度であると考えられた (下図)。



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 2 件)

- ① Hamada H, Shimoda K, Horio Y, Ono T, Hosoda R, Nakayama N and Urano K; Pterostilbene and Its Glucoside Induce Type XVII Collagen Expression. Nat Prod Commun. Vol 12, No. 1;85-86, 2017. 査読有
- ② 久野 篤史, 細田 隆介, 堀尾 嘉幸. 筋ジストロフィーの新治療法の開発. Medical Science Digest, Vol 42, 642-646, 2016. 査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ① 細田隆介, 久野篤史, 瀬堀理生, 堀尾嘉幸. Protective role of SIRT1 in the cardiomyocyte in doxorubicin-induced cardiotoxicity. 第 90 回日本薬理学会年会. 3月15-17日, 2017 長崎ブリックホール他 (長崎県長崎市)
- ② 久野篤史, 細田隆介, 瀬堀理生, 堀尾嘉幸. Resveratrol restores autophagy and improves cardiac dysfunction in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. 第 90 回日本薬理学会年会. 3月15-17日, 2017 長崎ブリックホール他 (長崎県長崎市)
- ③ 細田隆介, 久野篤史, 瀬堀理生, 堀尾嘉幸. 心筋における SIRT1 の欠損はドキシソルビシン誘導性心筋障害を悪化させる. 第 39 回日本分子生物学会年会. 11月30日-12月2日, 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ④ 久野篤史, 細田隆介, 瀬堀理生, 堀尾嘉幸. 筋ジストロフィーの心筋障害におけるオートファジー不全の意義. 第 39 回日本分子生物学会年会. 11月30日-12月2日, 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ Hosoda R, Kuno A, Sebori R, Horio Y. Ablation of SIRT1 in the cardiomyocyte aggravates doxorubicin cardiotoxicity in mice: Possible role of accumulation of deleted mtDNA. American Heart Association 2016 Scientific Sessions. New Orleans, U.S.A. November 12-16, 2016
- ⑥ Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Horio Y. Impaired Autophagy Induced by Activated mTORC1 Underlies Development of Dystrophic Cardiomyopathy. American Heart Association 2016 Scientific Sessions. New Orleans, U.S.A. November 12-16, 2016
- ⑦ 細田隆介, 久野篤史, 瀬堀理生, 堀尾

嘉幸. ドキシソルビシン誘導性心筋障害に対する SIRT1 の役割解明. 第 67 回日本薬理学会北部会. 9月30日, 2016 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 隆介 (HOSODA, RYUSUKE)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20749428