

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05222

研究課題名(和文)統合的ストレス応答を標的としたサルコペニア治療薬の探索

研究課題名(英文) Development of potential anti-sarcopenia agents targeting the integrated stress response

研究代表者

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授

研究者番号：90502534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動機能低下以外に生活習慣病のリスクもあがるサルコペニアの統合的ストレス応答を標的とした新たな治療法の開発を目的とし、骨格筋特異的に統合的ストレス応答を制御できる遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。網羅的な遺伝子発現解析などから、統合的ストレス応答での筋肥大抑制因子を同定し、その骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製して、筋萎縮抵抗性を確認した。さらに、統合的ストレス応答をモニターできるハイスループットアッセイ系を確立し、化合物ライブラリーから統合的ストレス応答を制御するヒット化合物を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢とともに筋量および筋機能の低下が生じている状態をサルコペニアと呼ぶが、近年加齢による動脈硬化リスクや生活習慣病リスクの増大にサルコペニアが関与することが明らかになってきた。さまざまなストレスに対し共通に惹起される統合的ストレス応答の破綻は疾患発症にも関与することが考えられる。統合的ストレス応答とサルコペニア発症の関連を解明することで、サルコペニア治療法の開発の基盤を形成し、従前知られていたサルコペニアの分子機構とは異なる標的による創薬開発基盤を形成すると同時に、生体におけるストレス応答の新たな意義の解明にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is associated with increases the risk of physical limitation and lifestyle-related diseases. In current study, we aim to develop a new therapeutic strategy for the treatment of sarcopenia by targeting the integrated stress response (ISR). We performed a comprehensive gene expression analysis of skeletal muscle specific ISR transgenic mice and identified the ISR downstream target gene as a mediator of skeletal muscle atrophy. Skeletal muscle specific ISR defective mice were resistant to atrophy. Furthermore, we established the high-throughput assay to monitor the ISR activation, which allows us to identify the compounds modulating the ISR.

研究分野：分子生物学

キーワード：統合ストレス応答 サルコペニア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳は多階で制御されるが、翻訳開始因子である eIF2 のリン酸化による翻訳制御が様々なストレスにおいて活性化されることが知られている。これはアミノ酸飢餓、小胞体ストレス、ウイルス感染、ヘム欠乏など様々なストレスにおいて異なる細胞内シグナルが eIF2 のリン酸化として統合されることから、統合的ストレス応答と呼ばれている(図1)。統合的ストレス応答は、PERK による膵細胞でのインスリン合成制御や、HRI によるヘム鉄に依存的な赤血球でのグロブリン合成制御、PKR による二本鎖 RNA 依存的なウイルス感染防御、GCN2 によるアミノ酸に依存的な食欲制御など、生体機能の調節に重要な役割を担っている。筋力低下や身体機能低下の状態はサルコペニアと呼ばれ、運動機能低下による寝たきり以外に、糖尿病などの生活習慣病のリスクが高まることになっており、治療法の開発が望まれている。サルコペニアの分子機構として、インスリンシグナルや mTOR シグナルなどの筋肥大促進経路の低下やユビキチンプロテアソームやオートファジーなどのタンパク質分解経路の亢進が知られているが、統合的ストレス応答の関与は明らかではない。我々は、マウスでのサルコペニアモデルの一つである後肢懸垂(後肢骨格筋の不活動)において eIF2 がリン酸化(統合的ストレス応答が活性化)されることを新たに見出したことから、統合的ストレス応答を標的としたサルコペニア治療薬の探索に取り組むことにした。

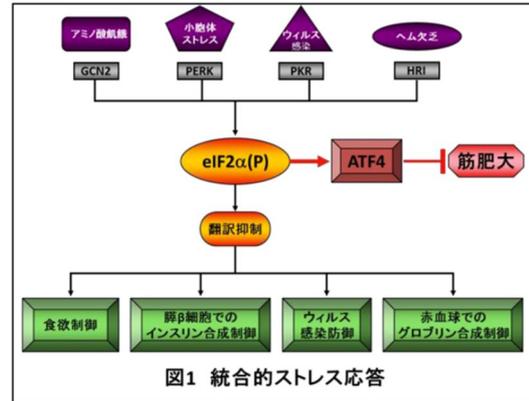


図1 統合的ストレス応答

### 2. 研究の目的

これまでに我々は小胞体ストレス応答の破綻が疾患発症に関与することを代謝疾患に関連して先導的な研究を展開してきた(PNAS 2001, JCI 2002, Cell 2006, Cell Metab 2008)。さらに、我々は小胞体ストレス応答の一部とクロストークする統合的ストレス応答による骨格筋での新たな制御機構を見出した(FASEB J 2015)。本研究では、これまでの研究成果に基づき、運動機能低下以外に生活習慣病のリスクもあがるサルコペニアの統合的ストレス応答を標的とした新たな治療法開発の基盤形成を目指した。

### 3. 研究の方法

以下の3点について研究に取り組んだ。

- (1) すでに作製してある統合的ストレス応答を骨格筋でのみ活性化できるトランスジェニックマウスを用いて、サルコペニアモデルマウスとしての表現型を確認し、さらにトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行って、統合的ストレス応答での筋肥大抑制因子の探索を行った(図2)。
- (2) 同定した統合的ストレス応答での筋肥大抑制因子の骨格筋特異的なノックアウトマウスを作製して、統合的ストレス応答を標的とした治療法の概念実証を行った。
- (3) 統合的ストレス応答の活性化をハイスループットでアッセイする系を構築し、化合物ライブラリーから統合的ストレス応答での筋肥大抑制因子の発現を低下させる化合物のハイスループットスクリーニングを行った。

### 4. 研究成果

統合的ストレス応答を骨格筋でのみ活性化できるトランスジェニックマウスを用いて、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、統合的ストレス応答での筋肥大抑制因子として転写因子 ATF4 を同定できた。さらに、メタボローム解析から、統合的ストレス応答活性化による骨格筋萎縮に特徴的なアミノ酸代謝の変化も明らかにすることができ、その内容を論文報告(PLoS One 2017)した。次に、Flox ATF4 マウスを作製し、骨格筋特異的 Cre 発現マウスと交配することで、骨格筋特異的 ATF4 ノックアウトマウスを作製することに成功した。骨格筋特異的 ATF4 ノックアウトマウスは筋萎縮に抵抗性があることを見出した(図3)。さらに、統合的ストレス応答をモニターできるハイスループットアッセイ系を確立し、化合物ライブラリーから統合的ス

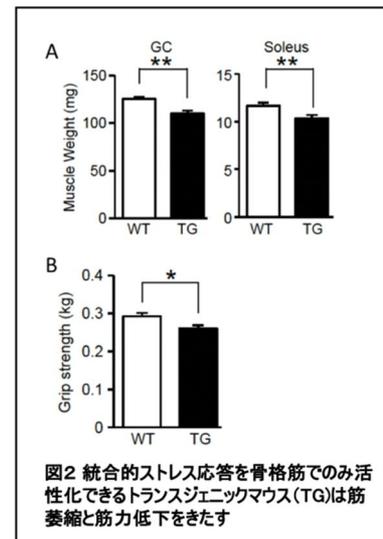


図2 統合的ストレス応答を骨格筋でのみ活性化できるトランスジェニックマウス(TG)は筋萎縮と筋力低下をきたす

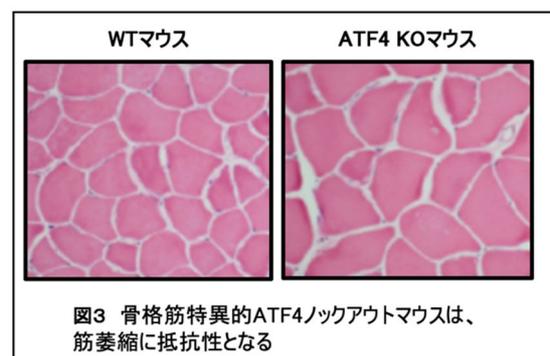


図3 骨格筋特異的ATF4ノックアウトマウスは、筋萎縮に抵抗性となる

レス応答を制御するヒット化合物を見出すことができた。見出したヒット化合物の詳しい分子薬理的機構について今後さらに検討する予定である。

## 5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 10 件)

- Hashimoto O, Funaba M, Sekiyama K, Doi S, Shindo D, Satoh R, Itoi H, Oiwa H, Morita M, Suzuki C, Sugiyama M, Yamakawa N, Takada H, Matsumura S, Inoue K, Oyadomari S, Sugino H, Kurisaki A. Activin E Controls Energy Homeostasis in Both Brown and White Adipose Tissues as a Hepatokine, *Cell Reports*, 査読有, 2018, 25 1193-1203, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.008
- Hisanaga S, Miyake M, Taniuchi S, Oyadomari M, Morimoto M, Sato R, Hirose J, Mizuta H, Oyadomari S. PERK-mediated translational control is required for collagen secretion in chondrocytes. *Sci Rep*. 査読有, 2018 Jan 15;8(1):773. doi: 10.1038/s41598-017-19052-9.
- Fischer C, Seki T, Lim S, Nakamura M, Andersson P, Yang Y, Honek J, Wang Y, Gao Y, Chen F, Samani NJ, Zhang J, Miyake M, Oyadomari S, Yasue A, Li X, Zhang Y, Liu Y, Cao Y. A miR-327-FGF10-FGFR2-mediated autocrine signaling mechanism controls white fat browning. *Nat Commun*. 査読有, 2017, 8, 2079 doi: 10.1038/s41467-017-02158-z.
- Miyake M, Kuroda M, Kiyonari H, Takehana K, Hisanaga S, Morimoto M, Zhang J, Oyadomari M, Sakaue H, Oyadomari S. Ligand-induced rapid skeletal muscle atrophy in HSA-Fv2E-PERK transgenic mice. *PLoS One* 査読有, 2017 12, e0179955 doi: 10.1371/journal.pone.0179955. eCollection 2017.
- Kurahashi K, Inoue S, Yoshida S, Ikeda Y, Morimoto K, Uemoto R, Ishikawa K, Kondo T, Yuasa T, Endo I, Miyake M, Oyadomari S, Matsumoto T, Abe M, Sakaue H, Aihara KI. The Role of Heparin Cofactor in the Regulation of Insulin Sensitivity and Maintenance of Glucose Homeostasis in Humans and Mice. *J.Atheroscler Thromb.*, 査読有, 2017 Dec 1;24(12):1215-1230. doi: 10.5551/jat.37739. Epub 2017 May 15.
- Yasue A, Kono H, Habuta M, Bando T, Sato K, Inoue J, Oyadomari S, Noji S, Tanaka E, Ohuchi H. Relationship between somatic mosaicism of Pax6 mutation and variable developmental eye abnormalities-an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos. *Sci Rep.*, 査読有, 2017 7, 53 doi: 10.1038/s41598-017-00088-w.
- Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, Uno K, Kaneko K, Tsukita S, Takahashi K, Asao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, Katagiri H. ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Rep.*, 査読有, 2017 18, 2045-2057 doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.076.
- Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E. Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal the importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development. *Sci Rep.*, 査読有, 2016 Dec 5;6:38398. doi: 10.1038/srep38398.
- Taniuchi S, Miyake M, Tsugawa K, Oyadomari M, Oyadomari S. Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 kinases. *Sci Rep.*, 査読有, 2016 Sep 16;6:32886. doi: 10.1038/srep32886.
- Handa K, Inukai K, Onuma H, Kudo A, Nakagawa F, Tsugawa K, Kitahara A, Moriya R, Takahashi K, Sumitani Y, Hosaka T, Kawakami H, Oyadomari S, Ishida H. Correction: Long-Term Low Carbohydrate Diet Leads to Deleterious Metabolic Manifestations in Diabetic Mice. *PLoS One*, 査読有, 2016 May 16;11(5):e0155751. doi: 10.1371/journal.pone.0155751. eCollection 2016.

[学会発表] (計 30 件)

- 親泊政一, 小胞体ストレス応答による代謝調節機構, 第 91 回日本内分泌学会学術集会, 2018 年
- 親泊政一, Stress and pancreatic  $\beta$ -cell dedifferentiation, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2018 年
- 三宅雅人, 張 君, 久永 哲, 親泊美帆, 親泊政一, 脂肪細胞における統合的ストレス応答は GDF15 を介した摂食抑制により食事性肥満を改善する, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2018 年
- 三宅雅人, 谷内秀輔, 親泊政一, CRISPR スクリーンで同定した新規 PERK 経路制御因子の機能解明, 第 13 回小胞体ストレス研究会, 2018 年
- 三宅雅人, 親泊政一, 脂肪細胞におけるストレス応答性転写因子 ATF4 の機能解明, 第 30 回分子糖尿病学シンポジウム, 2018 年
- 三宅雅人, 谷内秀輔, 久永 哲, 親泊美帆, 親泊政一, CRISPR ライブラリーを用いた新規小胞体

ストレス応答制御因子の同定, 第 12 回小胞体ストレス研究会, 2017 年  
親泊政一, 統合的ストレス応答経路による癌微小環境への適応機構, ConBio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 2017 年  
三宅雅人, 親泊政一 小胞体ストレス応答因子 PERK による代謝調節機構, (2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 2017 年  
三宅雅人, 張 君, 倉橋清衛, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一 脂肪組織での小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸シグナルによる肥満抑制作用, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年  
三宅雅人, 親泊政一, 脂肪細胞における PERK 経路を起点とした細胞間相互作用による細胞死の誘導, 第 11 回小胞体ストレス研究会, 2016 年

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:三宅 雅人  
ローマ字氏名: (MIYAKE, Masato)  
所属研究機関名:徳島大学  
部局名:先端酵素学研究所(プロテオ)  
職名:助教  
研究者番号(8桁):30588976

研究分担者氏名:親泊 美帆  
ローマ字氏名: (OYADOMARI, Miho)  
所属研究機関名:徳島大学  
部局名:先端酵素学研究所(プロテオ)  
職名:特任助教  
研究者番号(8桁): 00596158

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。