

令和元年9月6日現在

機関番号：31311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10836

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答経路を介した骨格筋の機能保全システムの解明

研究課題名(英文)The role of UPR in preservation of skeletal muscle

研究代表者

東門田 誠一 (Tohmonda, Takahide)

尚絅学院大学・総合人間科学系・准教授

研究者番号：40415237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋における小胞体ストレス応答経路の役割を知るために、骨格筋特異的なIRE1a遺伝子欠損マウスを用いて機能解析を行った。このマウスの骨格筋組織では、筋繊維の萎縮が起きていることが観察された。つづいて、小胞体ストレス応答経路と筋萎縮の関係について検討を行い、筋萎縮に関与するfoxo1の発現を確認したところ、foxo1遺伝子の発現が有意に増加していることが確認された。本研究では小胞体ストレスセンサーの活性化によって誘導される因子がfoxo1遺伝子の近接領域に結合して、調節していることが確認され、小胞体ストレスセンサーが筋萎縮の過程に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本社会では、高齢者の方々の運動器の機能を保全することは、重要な課題である。中でも骨格筋は、生活に必要な所動作のすべてを規定してしまうため、この機能を保全することは、生活の質を保つために特に重要となる。本研究では骨格筋機能維持の新規システム、特に小胞体ストレス応答経路を介した筋特異的生理機能維持システムの一端を明らかにし、骨格筋萎縮や筋不全、また骨格筋に由来する糖尿病・メタボリックシンドロームなどに対する、新しい予防法及び改善法開発へ向けた基礎的基盤の提供を行った。

研究成果の概要(英文)：To know the role of endoplasmic reticulum stress response pathway in skeletal muscle, skeletal muscle tissues in IRE1a gene deficient mice, in which skeletal muscle-specific that muscle atrophy was occurring, was subjected to functional analysis.

I examined the relationship between the endoplasmic reticulum stress response pathway and muscle atrophy, and it was indicated that the expression of foxo1 gene was significantly increased in IRE1a deficient mouse. In this study, it was confirmed that the factor induced by activation of endoplasmic reticulum stress sensor is linked to the promoter region of foxo1 gene and regulated the transcription of it. I revealed that the endoplasmic reticulum stress sensor is involved in the process of muscle atrophy.

研究分野：整形外科学

キーワード：小胞体ストレス 筋骨格系

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

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答は、もともと不良タンパク質の蓄積を検知・解消するシステムとして見出されたが、現在では免疫系の形質細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、すい臓ランゲルハンス島の細胞などの小胞体機能が特に重要となっている細胞にて、不良タンパク質の除去機能以外の分化決定や生理機能の維持、代謝系の制御などの特異的機能を担っていることが明らかになっている。骨格筋を形成する筋細胞では、筋小胞体が筋繊維の収縮開始を司っており、小胞体が主要な役割を担っている細胞の一つである。小胞体ストレス応答を蛍光で検出可能な ERAI マウスにて骨格筋を観察すると、不良タンパク質が蓄積していないにもかかわらず、極めて強い蛍光が認められ、小胞体ストレス応答経路の恒常的かつ、高活性な作動を観察することができる。したがって、筋細胞は他の小胞体機能が重要な細胞と同様に、細胞特有な生理機能を形成・維持するために、小胞体ストレス応答経路を利用しているのではないかと推測される。しかし、これまでのところ、筋組織において小胞体ストレス応答経路の新規機能を詳細に明らかにした報告はない。そこで進化的に最もよく保存され小胞体ストレス応答の中心的な役割を担っている IRE1 経路について、骨格筋での新規機能を明らかにすることを計画した。そして本研究で得られた成果を、骨格筋の機能保全に役立てることを最終目標とした。

2. 研究の目的

体重の約半分を占める骨格筋は、日常の所動作のすべてを規定しているだけでなく、糖代謝・エネルギー代謝を担う主要組織でもある。骨格筋の量・質の低下は、日常生活に支障を来すだけでなく、基礎代謝の量・質をも低下させ、糖尿病、メタボリックシンドロームを引き起こす要因ともなっている。またヒトは加齢により骨格筋の量が 30 - 40% ほど減少するため、いかに高齢者の骨格筋の機能を保全して健康を維持するかは、重要な課題である。しかし、我が国における骨格筋研究の報告数は、他の基礎生命科学分野の研究報告数に比して、極めて少ないのが現状である。そこで、骨格筋機能維持の新規システム、特に小胞体ストレス応答経路を介した筋特異的生理機能維持システムを明らかにすることにより、骨格筋委縮や筋不全、また骨格筋に由来する糖尿病・メタボリックシンドロームなどに対する、新しい予防法及び改善法開発への基礎的基盤の提供を行うことを意図とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋において小胞体ストレス応答に関する IRE1 経路の解析のために、骨格筋を標的とした二種類の IRE1 欠損マウスを作製する方法を採用した。ひとつは成熟筋細胞における代謝系解析用であり、もう一つは筋再生能力解析用である。この二つを用いることにより総合的に、IRE1 経路による筋組織の維持機構の解明に迫ることとした。IRE1 flox を以下の Cre 酵素発現トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、目的の遺伝子改変マウスの作出を行う予定であった。

ACTA1-Cre: 成獣の骨格筋細胞において Cre 酵素を発現; この遺伝子改変マウス (以下、IRE1 ACTA1 マウス) により、骨格筋細胞における IRE1 経路を介した代謝機能の解析が可能である。筋細胞における異化と同化過程の詳細な解析を行い、小胞体ストレス応答による筋繊維の維持に関する分子機構について明らかにする。

Pax7-Cre: タモキシフェンを注射することにより、筋衛星細胞で Cre 酵素を発現; この遺伝子改変マウス (以下、IRE1 Pax7 マウス) の筋を損傷させ、そこからの筋再生過程を組織解析により詳細に検討する。また筋衛星細胞を単離し、in vitro にて筋分化を誘導させることにより、IRE1 経路を介した筋再生の分子作用機序を明らかにする。

骨格筋細胞における小胞体ストレス応答を介した代謝調節機構の解明 IRE1 経路による骨格筋の機能保持に関して、IRE1 ACTA1 マウス解析を用いて、以下の三つの観点から研究を推進した。

- IRE1 経路を介した筋細胞における代謝系調節の分子作用機序の解明
- IRE1 欠損マウスにおける筋肉量と機能の分析
- IRE1 欠損マウスにおける組織組成変化の解析

(2) 生化学的解析 (クロマチン免疫沈降実験、レポーター発現解等) を行い、XBP1s による FoxO1 の発現調節機構を調べた。

4. 研究成果

骨格筋における小胞体ストレス応答経路の役割を知るために、骨格筋特異的な遺伝子欠損マウスを用いて機能解析を行った。この組織特異的な遺伝子欠損マウスは、muscle actin のプロモーターによって Cre 遺伝子をドライブするマウスと、小胞体ストレスセンサーの遺伝子配列を loxP で挟んだマウスを交配させることによって作成された。

(1) IRE1 ACTA1 マウスの骨格筋組織では、筋繊維の萎縮が起きていることが確認された。

(2) IRE1 ACTA1 マウスの成獣の筋組織を解析したところ、野生型マウスと比較して、筋組織においてグリコーゲンが顕著に蓄積されていることがわかった。

(3) 筋組織の分化過程における小胞体ストレスセンサーの動態の解析を行った。C2C12 細胞を用いた筋分化過程の解析の結果、小胞体ストレスセンサーは、リアノジン受容体が存在する筋小胞体とは異なる小胞体に存在していることがわかった。したがって、筋組織では筋小胞体と小胞体ストレスセンサーの存在する小胞体は明確に区別されていることが強く示唆された。一方で、筋管への形成過程において、分化段階の中期から後期で小胞体ストレスセンサーが活性化することが分かった。

(4) 小胞体ストレス応答経路と筋委縮の関係について検討を行った。筋委縮に關与している foxo1 の発現を確認したところ、foxo1 遺伝子の発現が有意に増加していることが確認された。本研究では小胞体ストレスセンサーの活性化によって誘導される因子が foxo1 遺伝子の近接領域に結合して、調節していることが確認され、小胞体ストレスセンサーが筋委縮の過程に關与していることを明らかにした。

本研究は、非常に独創的な仕事であると考えられる。その理由として、一つ目は、筋細胞の生理機能の制御の解明という本来の小胞体ストレス応答の機能とは、異なる側面を解明しつつあることが挙げられる。二つ目としては、IRE1 分子をターゲットとすることにより、代謝系維持と再生機能の保全の両方の側面から総合的に骨格筋の機能を増強できる可能性が高く、このような分子標的の報告数は極めて限定されていることが挙げられる。しかし、本研究では2つのマウス系統のうち IRE1 Pax7 マウスを用いた筋再生の分子作用機序の解析までできなかった。したがって筋再生に関する小胞体ストレスの機能について未解明なままであり、引き続き IRE1 Pax7 の解析も含めて詳細な検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

堀内圭輔、東門田誠一：小胞体ストレス応答による骨形成機序 - IRE1 - XBP 1 経路の関与 - .BONE pp185-190, 32(2), 2018 査読無
http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0002_3202

Hideyuki Shirasawa, Noboru Matsumura, Masayuki Shimoda, Satoshi Oki, Masaki Yoda, Takahide Tohmonda, Yae Kanai, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura & Keisuke Horiuchi : Inhibition of PDGFR signaling prevents muscular fatty infiltration after rotator cuff tear in mice. Scientific Reports volume 7, Article number: 41552, 2017, 査読有
doi: 10.1038/srep41552

Toru Hirozane, Takahide Tohmonda, Masaki Yoda, Masayuki Shimoda, Yae Kanai, Morio Matsumoto, Hideo Morioka, Masaya Nakamura & Keisuke Horiuchi : Osteoclasts extends osteoclast lifespan and results in reduced bone mass. Scientific Reports. Article number: 34426, 2016, 査読有
doi: 10.1038/srep34426.

Keisuke Horiuchi, Takahide Tohmonda, Morioka: The unfolded protein response in skeletal development and homeostasis. Cellular and Molecular Life Sciences. Volume73, Issue 15, pp2851-2869, 2016, 査読有
doi: 10.1007/s00018-016-2178-1.

〔学会発表〕(計1件)

東門田誠一 IRE1 経路を基軸とした骨代謝制御 第40回日本分子生物学会、生命科学系学会合同年次大会 2017年12月 神戸国際会議場

〔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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：堀内圭輔
ローマ字氏名：Keisuke Horiuchi

研究協力者氏名：依田昌樹
ローマ字氏名：Masaki Yoda

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。