

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10918

研究課題名(和文)新規治療の開発を目指したBach1の筋損傷抑制効果の解明

研究課題名(英文)The effects of Bach 1 on skeletal muscle damage

研究代表者

奥野 洋史 (Okuno, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00572025

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)：Bach1ノックアウトマウスにおけるカルジオトキシンによる筋損傷後の再生能は野生型マウスと比較し低下することを明らかにした。筋芽細胞株であるC2C12細胞のBach1遺伝子ノックダウンにより細胞の増殖、筋管細胞への分化、および筋分化のマスターレギュレーターであるMyogeninの発現が低下した。Bach1ノックアウトマウスやBach1ノックダウンC2C12細胞においてHO-1が増加するのに対し、筋分化抑制因子であるSmad2/3タンパク質やFoxO1タンパク質の低下が見られた。以上からBach1はSmad2/3やFoxO1を介してMyogeninの発現を高め筋の再生を促進している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他組織においてBach1を抑制することにより損傷後の回復を促進する報告が多数報告されている。本研究の仮説は「Bach1の抑制が筋損傷後の回復を促進させる」ことであったが、筋においてはBach1の抑制により筋再生が遅延することが明らかとなった。再生能の低下は筋芽細胞の増殖、筋分化能が低下することで起こり、またその制御メカニズムにはHO-1に加え、Smad2/3やFoxO1を介していることが示唆された。これらの作用機序の解明は今後の筋損傷の病態の理解や治療法開発に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The regenerative potential after skeletal muscle damage was lower in Bach1-deficient mice than wild-type ones. The knockdown of the Bach1 gene caused the deterioration of the myoblast growth and differentiation and the expression of myogenin gene in C2C12 myoblasts. The expression of HO-1 increased and the expression of Smad 2/3 and FoxO1 decreased in Bach1-deficient mice and Bach1-silenced C2C12 myoblasts. These results suggested Bach1 encourages the recovery from skeletal muscle damage by increasing the myogenin expression through Smad 2/3 and FoxO1 pathways.

研究分野：整形外科

キーワード：骨格筋損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋損傷は頻度が高い損傷であり、その再生メカニズムについては多くの研究が存在し、酸化ストレスや細胞老化などの関与が報告されているが、治療法は未だに自然治癒に大きく依存し、スポーツ選手や高齢者にとって大きな問題の1つであり続けている。

Bach1 は生体の広い範囲に発現が認められる転写抑制因子である。その機能は、HO-1 遺伝子発現の抑制を介した抗酸化作用の抑制、p53 との複合体形成による p53 標的遺伝子の発現抑制による細胞老化の抑制、Ppar などの脂肪関連遺伝子の転写抑制を介した脂肪細胞分化抑制などが知られている。

Bach1 ノックアウトマウスにおいて、心筋障害、脊髄損傷、肺損傷などの障害が軽減するとの報告があるが、筋損傷における役割について調べた報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、Bach1 欠損型マウスを筋損傷モデルに用いることにより Bach1 の筋損傷における働きを明らかにし、また筋芽細胞の細胞株である C2C12 細胞を用いて筋芽細胞の増殖、分化時の Bach1 の役割を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

Bach1 欠損型マウス (Bach1-KO マウス) と野生型マウス (WT マウス) を用い、カルジオトキシンを用いた筋損傷後の再生を再生筋線維の Cross sectional area (CSA) にて評価した。また筋芽細胞の細胞株である C2C12 細胞を用い、Bach1 ノックダウンによる増殖、筋分化能を評価した。qPCR、ウェスタンブロッティングにて遺伝子の発現量、タンパク質量を調べた。

4. 研究成果

通常飼育環境下において、Bach1-KO マウスと WT マウスの間で筋量、筋力に差は無い

ことが推察された。しかし筋毒を用いた筋損傷モデルにおいて、Bach1-KO マウスの再生過程にある筋線維面積は WT マウスのそれより小さく、筋の再生能力が低下していることが判明した(図1)。また、損傷筋の早期再生時に応答して、Bach1 タンパク質の量は急激に増加し、損傷の回復とともに減少することを見出した。また筋分化決定因子 (MRFs) と呼ばれる 4 遺伝子 (*MyoD*、*Myf5*、*Myogenin* および *MRF4*) の転写およびタンパク質安定化を制御することが知られているリン酸化 Smad2/3 および FoxO1 タンパク質の発現量が *Bach1*-KO で増加していた。

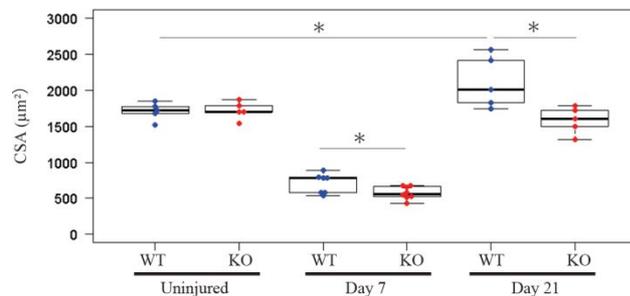


図1. 損傷前後の筋の CSA (*p < 0.05)

ことが推察された。しかし筋毒を用いた筋損傷モデルにおいて、Bach1-KO マウスの再生過程にある筋線維面積は WT マウスのそれより小さく、筋の再生能力が低下していることが判明した(図1)。また、損傷筋の早期再生時に応答して、Bach1 タンパク質の量は急激に増加し、損傷の回復とともに減少することを見出した。また筋分化決定因子 (MRFs) と呼ばれる 4 遺伝子 (*MyoD*、*Myf5*、*Myogenin* および *MRF4*) の転写およびタンパク質安定化を制御することが知られているリン酸化 Smad2/3 および FoxO1 タンパク質の発現量が *Bach1*-KO で増加していた。

次に筋芽細胞 C2C12 細胞株を用いて、筋分化における Bach1 の効果について検討を行った。

C2C12 細胞の増殖および分化能(筋管形成)は Bach1 siRNA の導入によってコントロール siRNA 導入細胞と比べ低下した。筋毒での損傷再生時同様に、筋分化誘導 2 日後、コントロール細胞において Bach1 タンパク質量の著しい増加が確認された。しかし、この筋芽細胞における *Bach1* 遺伝子ノックダウンによる分化能低下は、細胞老化マーカーである SA-β-gal の染色の結果から、細胞老化に起因するものではないことが判明した。

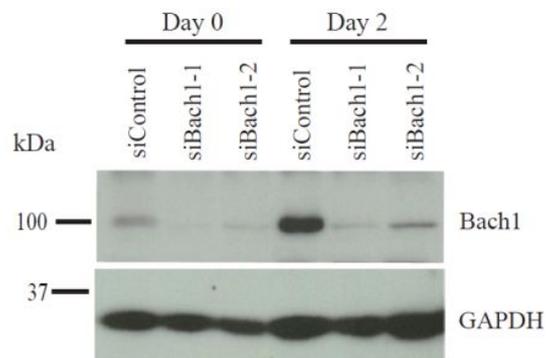


図2. C2C12 細胞における筋分化誘導前後での Bach1 タンパク質量

そして筋分化誘導後 2 日目の *Bach1* 遺伝子ノックダウン C2C12 細胞において、筋芽細胞から *Myogenin* 遺伝子の発現が抑制されることが判明した。さらにこの時、損傷筋同様、*Myogenin* の発現を抑制する Smad2/3 タンパク質の量は上昇していた。また *Bach1* の直接標的因子である HO-1 は microRNA を介して筋分化を抑制するとの報告がある。*HO-1* 遺伝子発現は *Bach1* 遺伝子の抑制によって増加していた。特に in vivo における筋損傷モデルでは WT マウスの筋組織同士と比較から筋損傷 3 日目に *HO-1* 遺伝子の発現上昇が確認されたものの、この時の *Bach1* KO マウスでは WT マウスと比較してより顕著な *HO-1* 遺伝子の増加が確認された。このことは *Bach1* が筋損傷時の HO-1 の亢進を強力に抑えていることを示唆した。さらに、*Bach1* 遺伝子ノックダウン C2C12 細胞ではコントロール細胞と比べて microRNA の制御因子である *Lin28a* 遺伝子の発現抑制が認められた。

本研究から、*Bach1* は筋損傷後の筋細胞分化の初期に筋芽細胞において増加し、筋分化抑制因子の 1 つである HO-1 の発現上昇を強力に抑制していることを見出した。加えて、その制御メカニズムは今後の課題であるものの *Bach1* は筋分化抑制因子である Smad2/3 タンパク質や FoxO1 タンパク質の量を低下させることを見出し、これら *Bach1* による筋分化抑制因子の抑制が、筋損傷時の再生を円滑に進めるために重要であることを発見した。これらの発見はまた、これまで酸化ストレスが低い状態では抗酸化応答を抑制すると思われていた *Bach1* が、筋損傷という炎症時にそのタンパク質量を増加することで一過性に過度な抗酸化状態を回避させる役割を担うといったユニークな機構の存在を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木一史
2. 発表標題 Bach1は筋芽細胞を活性化し筋の再生を促進する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO) (00250738)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	