

令和元年5月24日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15582

研究課題名(和文) SIRT1活性化による筋ジストロフィー治療におけるマイトファジーの役割

研究課題名(英文) Role of mitophagy in treatment of muscular dystrophy by SIRT1 activation

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) 3,200,000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とC2C12筋芽細胞を用いた実験により、SIRT1がマイトファジーの実行に關与する可能性と、マイトファジーの際にオートファゴソームで隔離された障害ミトコンドリアとリソソームの融合に關与する可能性を見出した。さらに、mdxマウスの骨格筋においてミトコンドリアDNAに欠失をもつ障害ミトコンドリアが蓄積していることを明らかとし、マイトファジーを介したミトコンドリアのクリアランスが低下している可能性を示すことができた。本研究で、骨格筋SIRT1がマイトファジーを介した筋保護作用を示すことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、SIRT1活性化を介したマイトファジーの促進が筋ジストロフィーの治療標的となる可能性が示唆された。さらに、SIRT1が骨格筋においてオートファジーの制御を介して保護的に働いていることが明らかとなった。本研究によってSIRT1の活性化は筋ジストロフィー以外の筋疾患治療法の開発にも結びつく可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We found that SIRT1 is involved in the activation of mitophagy and involved in the fusion of lysosomes with damaged mitochondria that are isolated by autophagosomes during mitophagy in skeletal muscle-specific SIRT1 knockout mice and C2C12 myoblasts. Furthermore, we revealed that damaged mitochondria with deleted mitochondrial DNA was accumulate in mdx skeletal muscle. This result indicate that mitophagy-mediated mitochondrial clearance is reduced in skeletal muscle of mdx mice.

In this study, we showed that skeletal muscle SIRT1 exhibits a muscle protective effect through mitophagy activation.

研究分野：薬理学

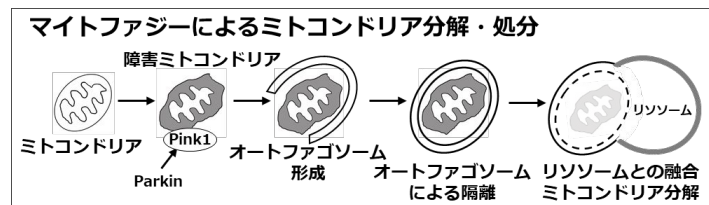
キーワード：SIRT1 オートファジー マイトファジー 筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

サーチュインは酵母で発見された長寿遺伝子 Sir2 の哺乳類ホモログである。その中で SIRT1 は最も研究が進んでいる。SIRT1 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その機能を変化させ、細胞の恒常性を維持する。当教室は SIRT1 の機能として、細胞質と核の間をシャトルする蛋白で(Tanno et al. J Biol Chem 2007)、その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 制御による疾患治療について、SIRT1 活性化薬レスベラトロールが心不全ハムスターの心機能や生存率を改善すること(Tanno et al. J Biol Chem 2010)、SIRT1 が皮膚がんメラノーマ細胞の転移に重要であること(Kunimoto et al. J Invest Dermatol 2014)を報告してきた。申請者も SIRT1 の細胞保護機構について、転写因子 FoxO を介した Superoxide dismutase 2 の増加により酸化ストレスを軽減すること(Hosoda et al JPET 2013, Hori et al. Plos One 2013)を明らかにしてきた。

骨格筋はヒトにおける最大の臓器であり、骨格筋の状態が quality of life のみならず患者の生命予後と関連することも注目されている。SIRT1 は骨格筋でも発現しており、申請者らは、最も重症な 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と心筋症を軽減することを報告し (Kuno et al. J Biol Chem 2013, Hori et al. JPET 2013)、SIRT1 が筋ジストロフィーの治療標的となることを見出した。この研究成果を基に、我々はヒト筋ジストロフィー症患者におけるレスベラトロールの効果の評価する自主臨床試験を行い、レスベラトロールによる筋力の増加など有効性を示す結果を得た (川村ら、2016 年日本小児科学会総会発表)。

マイトファジー (右図) の障害が細胞内の活性酸素種 (ROS) 量増加により細胞死を促進する (Hori et al. J Neurooncol 2015) など、最大の ROS 発生源である障害ミトコンドリアを処分する機構としてマイトファジーが注目されている。我々は、(1) mdx マウス骨格筋では細胞内蛋白や障害オルガネラの分解機構であるオートファジーの活性が減弱しており、レスベラトロール投与によりオートファジー活性が回復して筋組織 ROS 量を低下させること、(2) 筋芽細胞では SIRT1 活性化はマイトファジーを促進すること、およびマイトファジーを介して ROS を軽減することを見出した (Sebori R et al. Oxid Med Cell Longev 2018)。しかし、SIRT1 がマイトファジーを活性化するメカニズムは全く不明で、筋ジストロフィー骨格筋でのマイトファジーの変化とその機序における SIRT1 の関与については明らかではない。



マイトファジー (右図) の障害が細胞内の活性酸素種 (ROS) 量増加により細胞死を促進する (Hori et al. J Neurooncol 2015) など、最大の ROS 発生源である障害ミトコンドリアを処分する機構としてマイトファジーが注目されている。我々は、(1) mdx マウス骨格筋では細胞内蛋白や障害オルガネラの分解機構であるオートファジーの活性が減弱しており、レスベラトロール投与によりオートファジー活性が回復して筋組織 ROS 量を低下させること、(2) 筋芽細胞では SIRT1 活性化はマイトファジーを促進すること、およびマイトファジーを介して ROS を軽減することを見出した (Sebori R et al. Oxid Med Cell Longev 2018)。しかし、SIRT1 がマイトファジーを活性化するメカニズムは全く不明で、筋ジストロフィー骨格筋でのマイトファジーの変化とその機序における SIRT1 の関与については明らかではない。

2. 研究の目的

これまで申請者は、筋ジストロフィーに対する蛋白脱アセチル化酵素 SIRT1 による骨格筋保護のメカニズムの解明を行い、オートファジー障害の回復、酸化ストレス軽減を見出した。さらに障害ミトコンドリアを処分して酸化ストレスを軽減する機構である「マイトファジー」が SIRT1 により活性化し、細胞内酸化ストレス軽減をもたらすことを突き止めた。本研究の目的は、SIRT1 がマイトファジーを活性化するメカニズムや、筋ジストロフィー骨格筋におけるマイトファジー障害と SIRT1 の関与を明らかにして、SIRT1 によるマイトファジー活性化を介した新規骨格筋治療の開発を目指すことである。

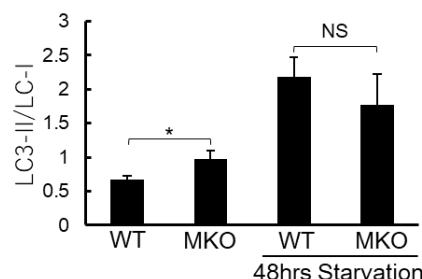
3. 研究の方法

我々は、骨格筋における SIRT1 のマイトファジー活性化メカニズムを明らかとするため、当研究室で確立した骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (SIRT1MKO) と C2C12 筋芽細胞を実験に用いた。また、筋ジストロフィー骨格筋におけるマイトファジーと SIRT1 の関係を明らかとするために、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルである mdx マウスを用いて評価した。

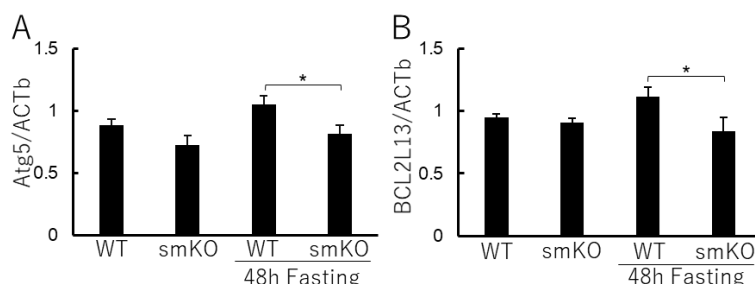
- (1) 野生型マウス (WT) と SIRT1MKO マウスに 48 時間の絶食をおこなった後に骨格筋を採取してウエスタンブロットを行い SIRT1 がオートファジー/マイトファジーの調節に関与するのかを解析した。
- (2) 定量 PCR を用いて (1) で採取した骨格筋を解析し、オートファジー/マイトファジーの実行因子の発現量を検討した。
- (3) C2C12 筋芽細胞の SIRT1 をノックダウンした後、ミトコンドリア脱共益剤である CCCP を処置してマイトファジーを誘導し、ウエスタンブロットを用いた解析を行って SIRT1 がマイトファジーの制御に関与しているのか検討した。
- (4) Duchenne 型筋ジストロフィーモデルである mdx マウスから骨格筋を採取して Long-range PCR を行い、マイトファジーの抑制に伴う障害ミトコンドリアの蓄積を評価した。

4. 研究成果

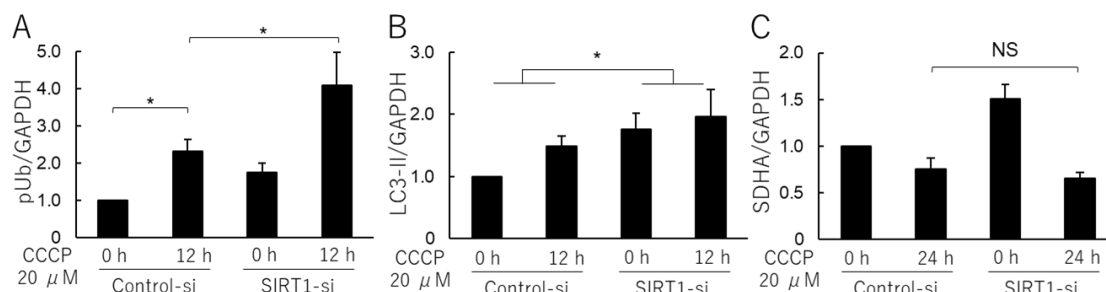
(1) 絶食をおこなっていない群において、オートファジー活性化の指標でオートファゴソームの形成に関与する LC3-II の蛋白量が、WT と比較して SIRT1MKO で増加することが示された。一方で、絶食により誘導される LC3-II の蛋白量は、WT と SIRT1MKO の間で差が見られなかった (右図)。このことから、SIRT1 はオートファジーの後期段階で見られるオートファゴソームとライソソームの融合を制御する可能性が示された。



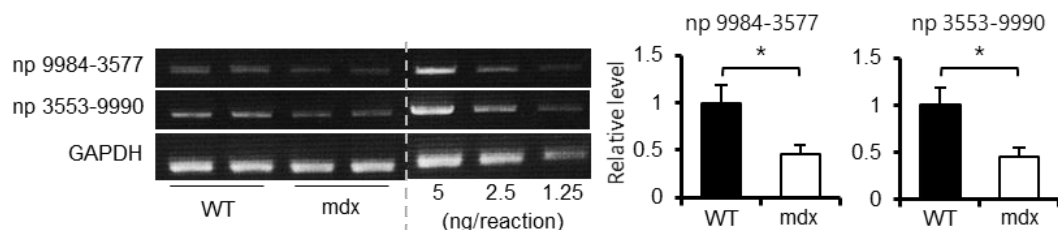
(2) 定量 PCR を用いた解析において、SIRT1MKO の骨格筋では WT と比較して、絶食で誘導されるオートファジー実行因子である Atg5 の発現とミトファジー実行因子である BCL2L13 の発現が減少していた (右図 A,B)。この結果から SIRT1 が骨格筋においてミトファジー制御に関与することが示された。



(3) SIRT1 をノックダウンした C2C12 筋芽細胞に CCCP を処置してミトファジーの誘導を確認した。コントロール群と比較して SIRT1 をノックダウンした群で、ミトファジー誘導の指標であるリン酸化ユビキチンが CCCP 処置により増加した (下図 A)。SIRT1 ノックダウン群でコントロールと比較して、オートファゴソーム形成に関わる LC3-II の発現が CCCP 処置により増加しているにも関わらず (下図 B)、ミトコンドリア蛋白である SDHA はコントロール群と同等に残存していた (下図 C)。このことから、SIRT1 はミトファジーの際に、オートファゴソームで隔離されたミトコンドリアとライソソームの融合に関与すると考えられた。



(4) mdx マウス骨格筋において、障害ミトコンドリアの指標の一つであるミトコンドリア DNA の欠失を long-range PCR を用いて解析した。mdx マウスの骨格筋では WT のマウスと比べて、ミトコンドリア DNA に欠失をもつ障害ミトコンドリアが多く存在することが示された (下図)。この結果から、mdx マウスの骨格筋ではミトコンドリアのクリアランスが減弱していることが示された。



本研究の結果から、SIRT1 活性化を介したミトファジーの促進が筋ジストロフィーの治療標的となる可能性が示された。今後は、mdx マウスの骨格筋においてオートファジーの実行因子の遺伝子発現がどのように SIRT1 に制御されているのか検討する。さらに mdx マウスの骨格筋で活性化しているオートファジー阻害因子である mTOR が、どのように SIRT1 で制御されているのか詳細なメカニズムを明らかとしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kuno A, **Hosoda R**, Sebori R, Hayashi T, Sakuragi H, Tanabe M, Horio Y. Resveratrol Ameliorates Mitophagy Disturbance and Improves Cardiac Pathophysiology of Dystrophin-deficient mdx Mice. *Sci Rep.* 22;8(1):15555, 2018. 査読有
2. Sebori R*, Kuno A*(*は equal contribution), **Hosoda R**, Hayashi T, Horio Y. Resveratrol decreases oxidative stress by restoring mitophagy and improves the pathophysiology of dystrophin-deficient mdx mice. *Oxid Med Cell Longev.* 9179270, 2018. 査読有
3. Hamada H, Shimoda K, Horio Y, Ono T, **Hosoda R**, Nakayama N, Urano K. Pterostilbene and Its Glucoside Induce Type Collagen Expression. *Nat Prod Commun.* Vol. 12 No. 1, 85-86, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

2018 年度

1. **細田隆介**, 久野篤史, 堀尾嘉幸. 骨格筋 SIRT1 は筋機能の維持と筋膜障害の軽減にはたらく 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14 日-3 月 16 日 (大阪)
2. 久野篤史, **細田隆介**, 堀尾嘉幸. ドキソルビシンによる心障害は SIRT1 の欠損により増悪する 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14 日-3 月 16 日 (大阪)
3. **細田隆介**, 久野篤史, 堀尾嘉幸. 骨格筋特異的 SIRT1 欠損マウスは筋障害が増加し筋機能が低下する 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日-11 月 30 日 (横浜)
4. 久野篤史, **細田隆介**, 堀尾嘉幸. SIRT1 の活性化はミトファジーにより障害ミトコンドリアを除去して筋ジストロフィー心筋障害を軽減する 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日-11 月 30 日 (横浜)
5. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. Sirt1 Activation Restores Mitophagy-Mediated Clearance of Damaged Mitochondria and Ameliorates Dystrophic Cardiomyopathy in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2018 2018 年 11 月 10 日-11 月 12 日 (米国、Chicago)
6. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. Resveratrol, a SIRT1 activator, restores autophagy-mediated clearance of damaged mitochondria and ameliorates dystrophic cardiomyopathy in mice. 第 22 回日本心不全学会学術集会 2018 年 10 月 11-10 月 13 日 (東京)
7. **細田隆介**, 久野篤史, 堀尾嘉幸. 骨格筋 SIRT1 は筋障害を軽減して筋機能を維持する. 第 69 回日本薬理学会北部会 2018 年 9 月 21 日 (富山)
8. 久野篤史, **細田隆介**, 堀尾嘉幸. レスベラトロールによる筋ジストロフィー治療 第 69 回日本薬理学会北部会 2018 年 9 月 21 日 (富山)
9. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. The SIRT1 activator resveratrol ameliorates dystrophic cardiomyopathy by promoting mitophagy. European Society of Cardiology Congress 2018 2018 年 8 月 25 日-8 月 29 日 (独国、Munich)
10. **Ryusuke Hosoda**, Atsushi Kuno, Yoshiyuki Horio. Deletion of SIRT1 in the cardiomyocyte exacerbates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018 年 7 月 1 日-7 月 6 日 (京都)
11. **Ryusuke Hosoda**, Atsushi Kuno, Yoshiyuki Horio. SIRT1 in the cardiomyocyte protects mitochondria and the heart against doxorubicin treatment in mice. Keystone Symposia Conference "Mitochondrial Biology" 2018 年 4 月 22 日-4 月 27 日 (京都)
12. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. Role of autophagy-mediated clearance of mitochondria in cardioprotection afforded by the protein deacetylase SIRT1 in dystrophin-deficient mdx mice. Keystone Symposia Conference "Mitochondrial Biology" 2018 年 4 月 22 日-4 月 27 日 (京都)

2017 年度

13. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. Restoration of impaired autophagosome clearance underlies amelioration of cardiomyopathy afforded by SIRT1 activation in dystrophin-deficient mice. 第 34 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2017) 2017 年 12 月 8 日-12 月 10 日 (大阪)
14. **細田隆介**、堀本浩平、國本梨沙、山下利春、瀬堀理生、久野篤史、堀尾嘉幸. Prl2c3 は SIRT1 により負に発現制御を受ける老化誘導タンパクである 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日-12 月 8 日 (神戸)
15. **細田隆介**、堀本 浩平、國本 梨沙、山下 利春、瀬堀 理生、久野 篤史、堀尾 嘉幸. SIRT1 により負の制御を受ける Prl2c3 は老化誘導タンパクである 第 68 回日本薬理学会北部会. 2017 年 9 月 15 日-9 月 16 日 (山形)
16. 久野篤史, **細田隆介**, 瀬堀理生, 堀尾嘉幸. 筋ジストロフィー心筋におけるオートファジー不全の意義 第 68 回日本薬理学会北部会. 2017 年 9 月 15 日-9 月 16 日 (山形)
17. **Ryusuke Hosoda**, Atsushi Kuno, Yoshiyuki Horio. Protective role of SIRT1 in the cardiomyocyte in doxorubicin cardiotoxicity in mice. Keystone Symposia "Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease" 2017 年 5 月 15 日-5 月 19 日 (横浜)
18. Atsushi Kuno, **Ryusuke Hosoda**, Yoshiyuki Horio. Role of impaired autophagy caused by aberrant activation of mTORC1 in dystrophic cardiomyopathy. Keystone Symposia "Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease" 2017 年 5 月 15 日-5 月 19 日 (横浜)

取得状況 (計 1 件)

名称: Type17 コラーゲンの産生促進
発明者: 濱田 博喜、**細田 隆介**、小野 翼
権利者: 香港友池有限公司
種類: 特許
番号: 第 6364143 号
取得年: 2018 年
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/achievement.html>

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:

ローマ字氏名:

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。