

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03153

研究課題名(和文)オートファジー基質の細胞内タンパク制御による新たな筋量維持機構の解明

研究課題名(英文)Role of autophagy adaptor in skeletal muscle

研究代表者

奥津 光晴 (Okutsu, Mitsuharu)

名古屋市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80409755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋量維持に対するp62の役割の立証を目的に実施した。その結果、マウスへのLewis肺癌細胞(LLC)の皮下移植は酸化ストレスを増加し筋萎縮を誘導した。LLCの移植はNrf2の活性化と抗酸化酵素の発現を増加するが、筋特異的Nrf2欠損マウスではLLCの移植による抗酸化酵素の増加が抑制され重度な筋萎縮を誘導した。Nrf2の活性化を制御するp62を筋特異的に増強したマウスは、Nrf2の活性化と抗酸化酵素の発現を増加し、LLCの移植による酸化ストレスの増加と筋萎縮の誘導を軽減した。これらの結果は、p62はNrf2を介して抗酸化物質の産生を調節し筋萎縮の軽減に貢献する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p62の機能に関するこれまでの報告は癌細胞などの悪化した細胞を対象にした研究が多く、骨格筋のような正常細胞を対象にした研究は少ない。また運動による骨格筋の適応について、p62に着目しその役割を遺伝子組換えマウスを作成して立証した報告は少なく、学術的意義がある。

癌、心不全や糖尿病などの疾患や加齢は骨格筋量を減少する。筋量の減少は廃用性症候群やロコモティブ症候群を発症することから、筋量を規定する分子メカニズムを解明し予防や治療に応用することは、健康寿命の延伸や医療費削減の観点から重要な課題である。本研究の成果は、当該分野に応用することで上記の課題を解決できる可能性があることから社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Antioxidants reduce oxidative stress and protect muscle from atrophy. However, a functional role and molecular mechanism regulating the production antioxidants remains to be determined. Here, we demonstrated that Lewis lung carcinoma (LLC) cells implantation in mice induced severe muscle atrophy, as well as atrogenes and oxidative marker in associated with poor antioxidants expression. LLC implantation increased superoxide dismutase (SOD) protein expression in association with Nrf2 activation. Muscle-specific Nrf2 knockout (Nrf2mKO) mice induced severe cachexia-induced muscle atrophy in associated with blunted cachexia-induced SOD expression. Muscle-specific p62 overexpression (p62mTg) mice increased phosphorylated p62, Nrf2 activity, and SOD expression. Importantly, p62mTg mice protected cancer cachexia-induced muscle atrophy. Collectively, these findings indicate that Nrf2 activation by p62 plays an important role for the protection of cachexia-induced muscle atrophy.

研究分野：分子生理学、筋生理学、スポーツ科学

キーワード：骨格筋 オートファジーアダプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌、心不全や糖尿病などの慢性疾患は骨格筋量を減少する。筋量の減少(筋萎縮)は廃用性症候群を発症することから、筋量を規定する分子メカニズムを解明し予防や治療に応用することは、健康寿命の延伸や医療費削減の観点から重要な課題である。筋量は筋タンパク質の合成と分解のバランスや筋の構造と機能から決定される。慢性疾患は筋タンパク質の合成と分解のバランスや筋の構造と機能を悪化し筋量を減少することから、これらを制御する因子を同定し骨格筋環境を適正化することで筋量の維持が期待できる。

定期的な運動は疾患や加齢による筋量の減少を抑制する。運動は、筋タンパク質の合成と分解のバランスを適正化する他、筋線維タイプの転換、ミトコンドリアの改善、毛細血管密度の増加や抗酸化酵素の増加などを誘導し筋量を維持している。これまでは、運動による骨格筋の適応は peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1) の増加が要因と考えられてきた。しかしながら、これまでに申請者が報告した筋特異的 PGC-1 欠損マウスに運動を実施した結果は、運動による骨格筋の適応に PGC-1 は重要であるが、PGC-1 を介さない骨格筋適応経路が存在する可能性を示唆している。

そこで申請者は p62 に着目した。p62 はタンパク質分解機構であるオートファジーを制御する細胞内タンパク質として知られており、不要なタンパク質の分解や悪化した細胞小器官の除去を制御する。ところが癌細胞を用いた研究では、p62 はオートファジーの調節以外にも抗酸化酵素の産生を調節する Nrf2 を制御することで細胞の恒常性を維持することも報告されている。我々も運動による抗酸化酵素の増加に p62 が関与することを報告している。しかしながら、骨格筋における p62 の役割の詳細な検討は未だ十分ではない。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋は p62 を活性化することで抗酸化物質の発現を調節し、慢性疾患による筋萎縮を軽減すると仮説を立て検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の仮説を立証するため、以下の第一から第三までの研究課題を遂行した。

第一の研究課題では、培養細胞に p62 プラスミドを導入し抗酸化物質の産生を評価した。実験にはマウス骨格筋細胞株の C2C12 細胞から分化させた筋管細胞を使用した。細胞には p62 プラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入した。細胞は、プラスミド導入 24 時間後に回収し、p62、リン酸化 p62 と抗酸化物質の発現をウェスタンブロットにて評価した。

第二の研究課題では、筋特異的 p62 トランスジェニックマウスを作成し表現型を解析した。トランスジェニックマウスの作成には MCK プロモーターを使用し、p62 が筋特異的に増強するように設計した。表現型の評価は、p62、リン酸化 p62、Nrf2 の活性化と抗酸化物質の発現をウェスタンブロットにて評価した。

第三の研究課題では、作成した筋特異的 p62 トランスジェニックマウスおよび p62 が調節する Nrf2 の筋特異的欠損マウスに癌力ヘキシーによる筋萎縮を誘導し、疾患による筋萎縮に対する p62 の役割を検討した。筋特異的 p62 トランスジェニックマウスは第二の研究課題で作成したマウスを使用した。筋特異的 Nrf2 欠損マウスの作成には Cre/loxP システムを使用し、p62 が筋特異的に欠損するように設計した。癌力ヘキシーによる筋萎縮の誘導には Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞の皮下移植を使用した。飼育期間終了前に最大筋力を筋力測定装置を用いて測定した。飼育期間終了後、マウスから遅筋優位なヒラメ筋、速筋優位な長趾伸筋と白色広筋、速筋と遅筋が混在する前脛骨筋、足底筋と腓腹筋を素早く採取し微量重量計にて筋重量を測定し、各遺伝子組換えマウスとその野生型マウスの筋萎縮を比較した。

4. 研究成果

第一の研究課題では、筋管細胞に p62 プラスミドを導入し細胞の p62 の発現と抗酸化物質の産生を評価した。その結果、p62 タンパクの増加、p62 のリン酸化の促進と p62 が調節する Nrf2 により発現が制御される代表的な抗酸化物質である NQO1 などの抗酸化物質が増加した。

第二の研究課題では、筋特異的 p62 トランスジェニックマウスを作成し表現型を解析した。作成した筋特異的 p62 トランスジェニックマウスとその野生型同腹子の骨格筋と肝臓や肺などの骨格筋以外の臓器を採取して p62 の発現を評価したところ、骨格筋の p62 の発現と p62 のリン酸化は筋特異的 p62 トランスジェニックマウスの方が野生型マウスよりも顕著に増加したが、肝臓や肺などの骨格筋以外の臓器では p62 の発現やリン酸化に違いはなかった。また抗酸化物質である NQO1 は、筋特異的 p62 トランスジェニックマウスの方が野生型マウスよりも高かった。

第三の研究課題では、作成した筋特異的 p62 トランスジェニックマウスと当研究室で樹立した筋特異的 Nrf2 欠損マウスに癌力ヘキシーによる筋萎縮を誘導し、疾患による筋萎縮に対する

p62 の役割を検討した。その結果、野生型マウスでは癌カヘキシーにより筋力と筋重量が減少するが、筋特異的 p62 トランスジェニックマウスは筋力と筋重量は減少するもののその減少は野生型マウスに比べて有意に抑制された。癌カヘキシーは一部の抗酸化酵素を減少したが、その減少は筋特異的 p62 トランスジェニックマウスは抑制され、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒドの発現も抑制された。さらに p62 が制御し抗酸化物質の産生を調節する Nrf2 を筋特異的に欠損したマウスに癌カヘキシーを誘導すると、筋特異的 Nrf2 欠損マウスの筋重量は野生型マウスに比べて有意に減少した。

以上の結果をまとめると、癌などの慢性疾患による筋萎縮は、p62 の発現を調節し抗酸化物質の産生を促進することで軽減できる可能性を示している。本研究成果と我々がこれまでに発表した成果を統合すると、運動による筋萎縮の軽減には、運動による p62 の活性化が関与する可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Mami, Hokazono Chihiro, Tokizawa Ken, Marui Shuri, Iwata Masahiro, Lira Vitor A., Suzuki Katsuhiko, Miura Shinji, Nagashima Kei, Okutsu Mitsuharu	4. 巻 317
2. 論文標題 Muscle-derived SDF-1 /CXCL12 modulates endothelial cell proliferation but not exercise training-induced angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R770 ~ R779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00155.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Mami, Iwata Masahiro, Warabi Eiji, Oishi Hisashi, Lira Vitor A., Okutsu Mitsuharu	4. 巻 33
2. 論文標題 p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8022 ~ 8032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201900133R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yamada M, Okutsu M
2. 発表標題 Lack of muscle p62/SQSTM1 protects against high fat diet induced muscle wasting
3. 学会等名 Experimental Biology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okutsu M, Yamada M
2. 発表標題 Muscle specific Nrf2 deficiency exacerbates cancer cachexia induced skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 Experimental Biology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥津光晴、山田麻未
2. 発表標題 オートファジー基質と骨格筋の恒常性維持
3. 学会等名 第75回日本体力医学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥津光晴
2. 発表標題 骨格筋の筋量維持に対するオートファジーアダプターの役割
3. 学会等名 第6回日本筋学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥津光晴、山田麻未
2. 発表標題 運動による骨格筋の新たな抗酸化酵素の産生機構
3. 学会等名 第25回日本体力医学会東海地方会学術集会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田麻未、奥津光晴
2. 発表標題 加齢性筋萎縮に対するオートファジー基質の役割
3. 学会等名 第75回日本体力医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okutsu M.
2. 発表標題 Muscle contractile activity-mediated regulation of antioxidant enzymes in oxidative muscle requires p62 phosphorylation-induced Nrf2 activation
3. 学会等名 14th symposium for International Society of Exercise and Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okutsu M.
2. 発表標題 Muscle contractile activity-mediated regulation of antioxidant enzymes in oxidative muscle requires p62 phosphorylation-induced Nrf2 activation
3. 学会等名 Hallym University-Nagoya City University International Joint Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Iwata M, Warabi E, Oishi H, Lira VA, and Okutsu M
2. 発表標題 Muscle contractile activity-mediated regulation of antioxidant enzymes in oxidative muscle requires p62/SQSTM1 phosphorylation-induced Nrf2 activation
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okutsu M, Yamada M, Hokazono C, Tokizawa K, Marui S, Iwata M, Lira VA, Suzuki K, Miura S, and Nagashima K
2. 発表標題 Muscle-derived SDF-1 /CXCL12 modulates endothelial cell proliferation but is not required for exercise training-induced angiogenesis
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田麻未, 奥津光晴.
2. 発表標題 高脂肪食摂取による筋萎縮に対するp62の役割
3. 学会等名 第74回日本体力医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥津光晴, 山田麻未.
2. 発表標題 癌カヘキシーによる筋萎縮に対するNrf2の役割
3. 学会等名 第74回日本体力医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田麻未, 奥津光晴.
2. 発表標題 高脂肪食摂取による筋萎縮に対するオートファジー基質の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥津光晴, 山田麻未.
2. 発表標題 癌カヘキシーによる骨格筋萎縮におけるNrf2の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okutsu M, Yamada M, Iwata M
2. 発表標題 The role of Nrf2 in exercise training-mediated regulation of antioxidant enzymes in skeletal muscle
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada M, Iwata M, Okutsu M
2. 発表標題 p62/SQSTM1 is required for exercise training-mediated regulation of antioxidant enzymes in skeletal muscle
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥津光晴、山田麻未、岩田全広
2. 発表標題 運動による抗酸化物質の増加におけるNrf2の役割
3. 学会等名 第73回日本体力医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田麻未、岩田全広、奥津光晴
2. 発表標題 運動によるp62の活性化と抗酸化物質の発現制御
3. 学会等名 第73回日本体力医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田麻未、岩田全広、奥津光晴
2. 発表標題 骨格筋の収縮刺激による抗酸化物質の産生制御に対するNrf2の活性化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada M, Iwata M, Okutsu M
2. 発表標題 Muscle contractile activity-mediated p62 phosphorylation improve antioxidant enzymes in skeletal muscle through the activation of Keap1/Nrf2 pathway
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奥津光晴, 山田麻未. (森谷敏夫編集)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 341
3. 書名 筋肉研究最前線	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋市立大学大学院 理学研究科 分子生理学 https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~okutsu/index.html 【プレスリリース】EurekaAlert! by AAAS https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2019-04/ncu-pan042519.php 【プレスリリース】日本の研究者.com https://research-er.jp/articles/view/79014 【プレスリリース】名古屋市立大学 https://www.nagoya-cu.ac.jp/about/press/press/release/h31/#014852 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科分子生理学研究室 https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~okutsu/</p>

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	山田 崇史 (Yamada Takashi) (50583176)	札幌医科大学・保健医療学部・准教授 (20101)	
研究 分 担 者	岩田 全広 (Iwata Masahiro) (60448264)	日本福祉大学・健康科学部・教授 (33918)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	The University Iowa			