

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06965

研究課題名(和文)細胞膜の維持・修復のメカニズム

研究課題名(英文)Elucidation of membrane repair mechanism

研究代表者

堀尾 嘉幸(Horio, Yoshiyuki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30181530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質脱アセチル化酵素SIRT1の筋機能を調べるため骨格筋特異的SIRT1ノックアウト(SIRT1-MKO)マウスを作成した。SIRT1-MKOマウス骨格筋は脆弱で崩壊しやすく筋ジストロフィー症状を示し、SIRT1が骨格筋の維持に必要であることを明らかとした。さらに、C2C12筋芽細胞および筋細胞を用いて、SIRT1が細胞膜の修復に働くことを世界で初めて明らかとした。これまでSIRT1の活性化が筋ジストロフィーの治療に有効であることを示してきたが、そのメカニズムにSIRT1による細胞膜修復が関与する可能性を本研究は示し、細胞膜修復の促進が筋ジストロフィーの新しい治療戦略であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はSIRT1が細胞膜の修復に必要であることを世界で初めて示した。我々はSIRT1活性化薬のレスベラトロールの投与がマウス筋ジストロフィーのみならず人の筋ジストロフィーにも有効であることを示してきたが、そのメカニズムに膜修復の促進が関与することが本研究により示された。これまでエクソスキッピングによる筋の機能保持が新しい筋ジストロフィー治療法となっはいるが効果はきわめて限定的でさらにきわめて高価な治療費用が必要である。本研究では発想を根本的に変えた膜修復促進という従来とは全く異なる治療戦略が様々なタイプの筋ジストロフィーの治療に応用できる可能性を強く示している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate functions of protein deacetylase SIRT1 in skeletal muscles, we generated skeletal muscle-specific SIRT1 knockout (SIRT1-MKO) mice. Skeletal muscle of SIRT1-MKO mice was fragile and showed a phenotype of mild muscular dystrophy, indicating that SIRT1 is indispensable for muscle. Using C2C12 myoblast cells and differentiated C2C12 myofibers, we found that SIRT1 was necessary for cellular membrane resealing after damage. We have shown that a SIRT1 activator, resveratrol, ameliorates pathological and physiological conditions of muscular dystrophies of mice and humans. Our finding of SIRT1 function in membrane resealing would be involved in the effectiveness of resveratrol on dystrophies. Our finding also suggests that an activation of resealing of damaged cellular membrane is a new strategy for the treatment of muscular dystrophies.

研究分野：病態生化学

キーワード：SIRT1 細胞膜 筋ジストロフィー 膜修復 ノックアウトマウス 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜には浸透圧の差による物理的な力に加え、骨格筋や心筋では収縮と弛緩による力が加わる。このような物理的な力により細胞膜は常に断裂する。しかし、細胞膜には断裂を修復する機構が存在し、損傷は速やかに閉じられるがそのメカニズムは不明である。一方、筋ジストロフィーはジストログリカン複合体と呼ばれる細胞の内と外を結ぶ蛋白質複合体のいずれかの遺伝的異常により発生し、骨格筋もしくは心筋が壊死し次第に筋力が減弱する未解明の疾患である。我々は蛋白質脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性化が筋ジストロフィーの治療に結びつくことを世界で初めて発信したが、SIRT1 と細胞膜修復の関係は未解明である。

2. 研究の目的

SIRT1 と細胞膜修復機構の関連を明らかとして筋ジストロフィー病態の一端を解明して治療法の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウス

SIRT1 遺伝子の exon 4 (活性中心部分をコードする遺伝子領域) を lox P で囲んだマウス (SIRT1^{flox/flox}, strain name B6;129-Sirt1^{tm1Ygu/J}) および骨格筋特異的に Cre を発現するマウス (human α -skeletal muscle actin promoter driven Cre mice (ACTA1-Cre79Jme/J)) (ともに Jackson Laboratories より入手) を交配させて骨格筋特異的 SIRT1 欠損マウスを作成し SIRT1 の骨格筋での生理的機能を調べる。

細胞イメージング法による膜修復の解明

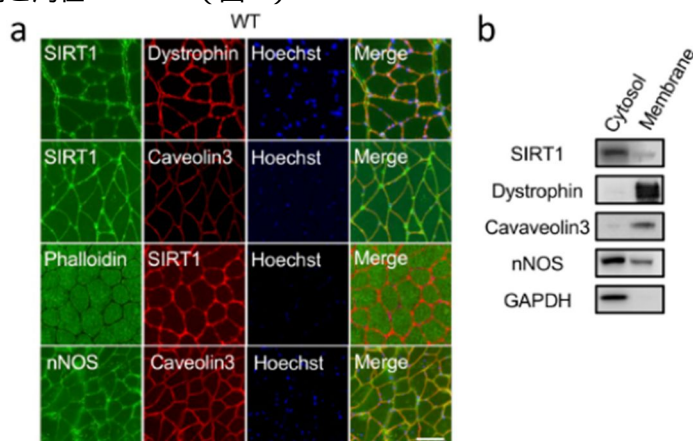
細胞イメージング法を用いて、C2C12 筋芽細胞および筋細胞に分化させた C2C12 細胞の細胞膜をレーザーにより損傷させ、その損傷部位から細胞内に入る FM1-43 蛍光色素の動態を観察する。SIRT1 の阻害やノックダウンの作用、SIRT1 の活性化の作用を培養筋芽細胞で調べる。

4. 研究成果

(1) マウス骨格筋での SIRT1 の発現と局在

(図 1)

正常マウス骨格筋での SIRT1 の発現分布を免疫染色法で調べた。右の図 1 a で示すように SIRT1 はジストロフィンやカベオリンなど筋膜直下に存在する蛋白質分子と共局在を示した。また、骨格筋を細胞膜分画と細胞質分画に分離して Western blot で検討したところ、細胞質に分布することが判明した。以上のことから骨格筋では細胞膜直下に SIRT1 が主に分布することが判明した。

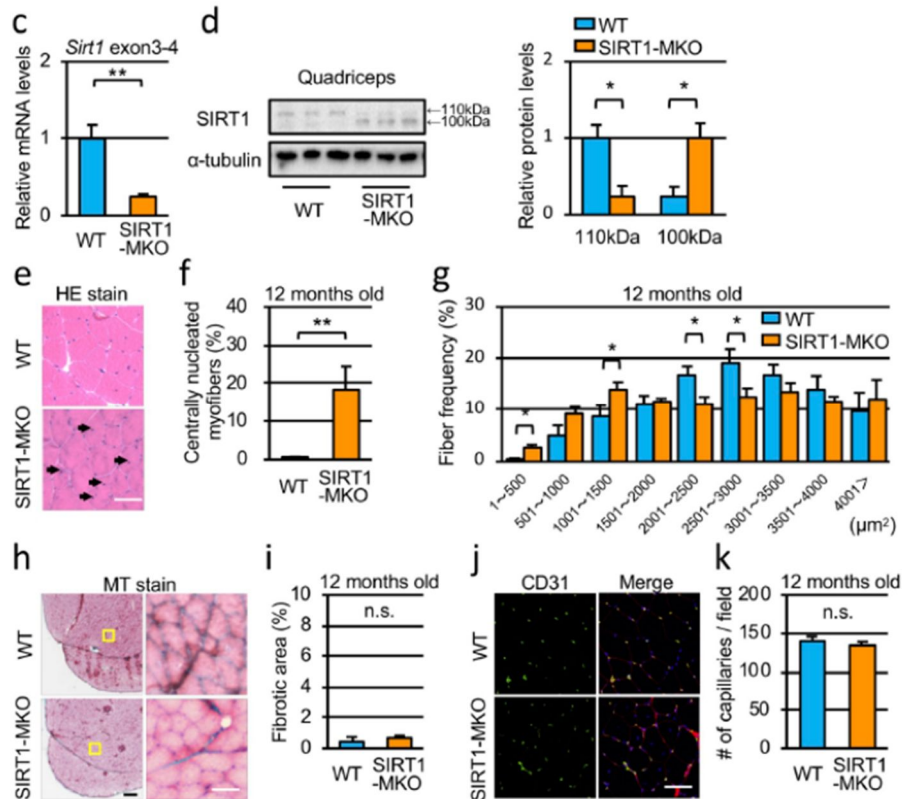


(2) 骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (SIRT1-MKO マウス) の解析

SIRT1^{flox/flox} マウスと骨格筋特異的に Cre を発現するマウスの交配により骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウスを作成した。このマウスは骨格筋で SIRT1 の 2 つの遺伝子がともに exon 4 を欠損していても交配可能であった。SIRT1 遺伝子 exon 4 を骨格筋で特異的に欠如させたマウスは次ページ図 2 c で示すように骨格筋組織での SIRT1 exon 4 部分の mRNA 発現が見られず (完全に欠損していない理由は骨格筋組織内にある血管や結合組織細胞の SIRT1 は発現していることによる) また、Western blot でも exon 4 部分が欠損した正常 (110 kDa) より小さな 100 kDa の SIRT1 が発現していた (図 2 d)。SIRT1-MKO マウスでは図 2 e, f で示すように約 20%の筋繊維で未成熟な筋細胞を示す中心核が観察された。また、SIRT1-MKO マウス骨格筋の直径は正常マウスに比べて細い筋繊維が増加し太い筋繊維は減少していた。このことは SIRT1-MKO マウスの筋の壊死と再生が正常マウスに比べて亢進している可能性が

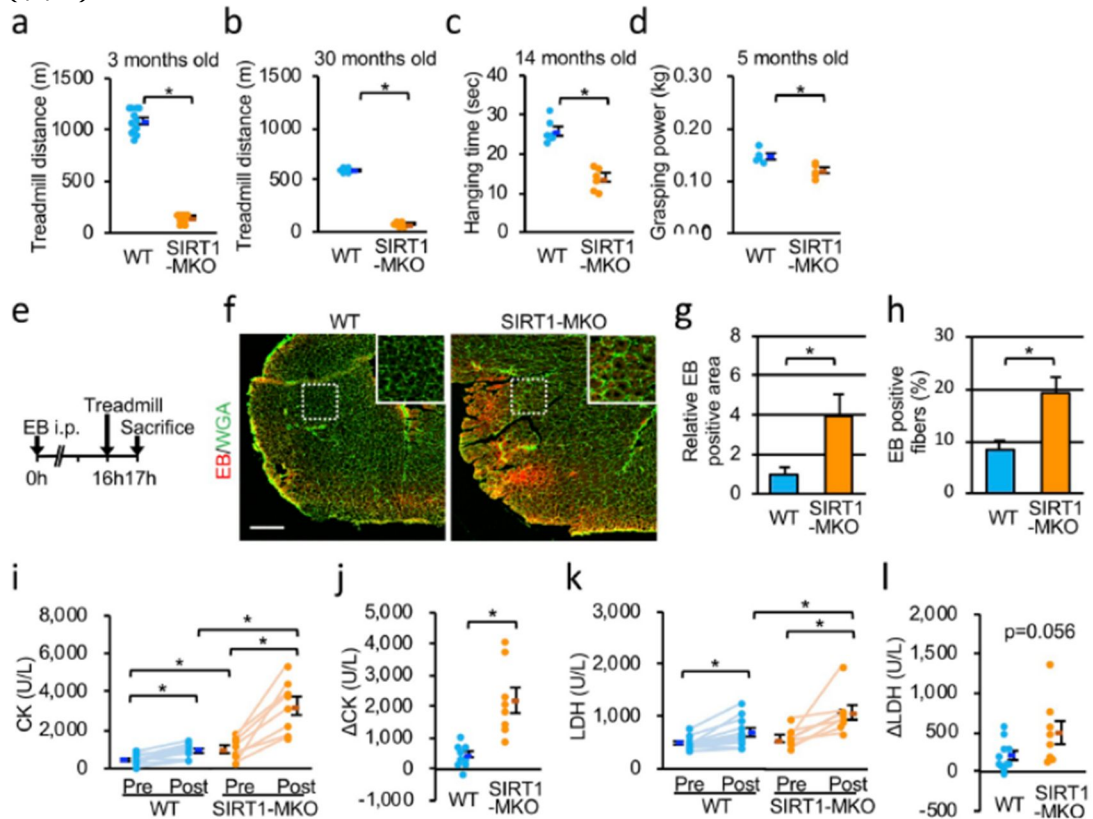
考えられた。しかし、図 2 h, i, j で示すように筋の繊維化や炎症反応は観察されなかった。図 2 k では毛細血管の数も変化がないことを示す。

(図 2)



(3) SIRT1-MKO マウスの運動機能と筋肉の脆弱性

(図 3)

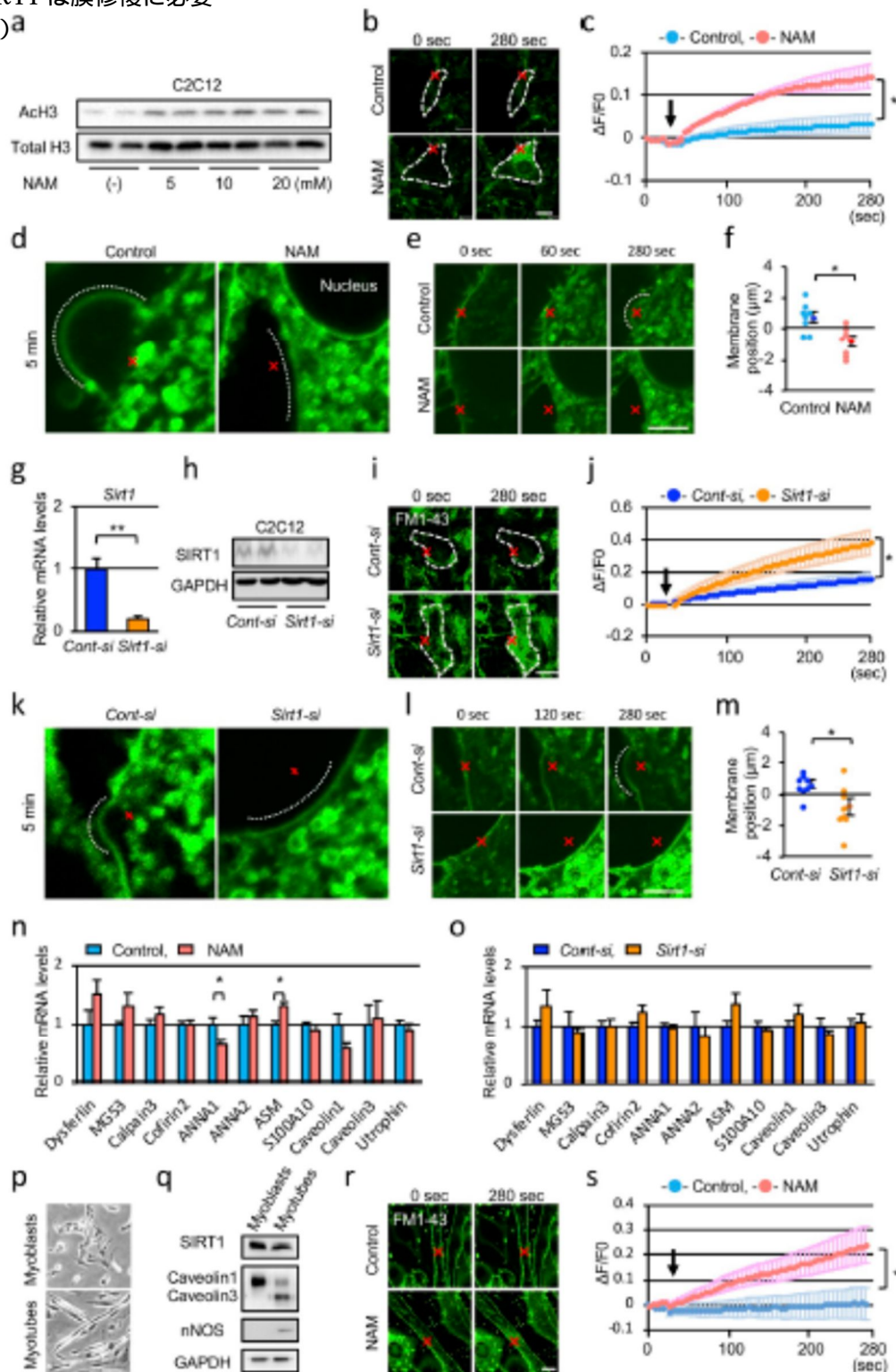


SIRT1-MKO マウスの運動機能について検討した。トレッドミルでの走行距離は3か月齢と30か月齢マウスとともに正常マウスに比べて極端に低値であった(上図 3 a, b)。また、網に

ぶら下がる時間も正常マウスに比べて半分程度となっていた(図3 c)。握力も有意な低下を示したが低下の程度は軽度で20%程度であった(前ページ図3 d)。運動による筋肉の損傷をエバンスブルー染色法により検討した(図3 e, f, g)。エバンスブルー(EB)を運動16時間前に投与し、トレッドミル負荷を課したあと筋組織のEBの組織分布を調べた(図3 e, f, g)。正常マウス骨格筋(WT)に提出確認用比べてSIRT1-MKO マウス骨格筋ではEBの筋組織への著しい浸透が観察され、SIRT1-MKO マウスでは骨格筋が運動により損傷されてEBが筋細胞内に侵入していると考えられた。さらにこのマウスの血中のクレアチンキナーゼ(CK)活性は正常マウスに比べて運動前より高く、運動により著しく増加しており、運動による筋損傷が正常マウスに比べて著しく亢進していた(図3 i, j)。さらにCK同様に崩壊した筋細胞から遊離するLDH活性もCKと同様にSIRT1-MKO マウスで高い値を示した(図3 k, l)。以上のことからSIRT1-MKO マウスは症状の弱い筋ジストロフィーであると考えられ、骨格筋が運動により損傷を受けやすく、SIRT1の存在が筋細胞の維持に必要なことが判明した。

(4) SIRT1は膜修復に必要な

(図4)



そこで、SIRT1 が筋細胞膜の損傷に対して修復に働く可能性をレーザーを使った細胞膜損傷とその修復を見る実験系で検討した。SIRT1 の阻害剤ニコチンアミド (NAM) を C2C12 細胞に作用させると細胞外の FM1-43 色素が細胞内に流入することが判明した (前ページ図 4 b,c)。正常細胞では損傷部位にドーム状の膜形態が形成されるのに対して、NAM を作用させた細胞では損傷面が凹にへこんだ形態を呈した (図 4 d, e, f)。NAM の代わりに SIRT1 の発現を SIRT1-siRNA で抑制しても NAM と同様の現象が観察され修復機構が働かなくなることが判明した (図 4 g-m)。NAM や SIRT1-siRNA はこれまで膜修復に関与することが知られている分子の発現量には著しい影響を与えていなかった (図 4 n, o)。また、NAM による膜修復過程の阻害は筋細胞に分化させた C2C12 細胞でも観察された (図 4 p-s)。以上から SIRT1 が新規の膜修復蛋白質であることが判明した。

(結語)

我々は SIRT1 の活性化が筋ジストロフィーに治療効果をもたらすことを見出し、SIRT1 活性化剤のレスベラトロールの投与は Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスの mdx マウスに治療効果を持つこと (Hori et al. 2011; Kuno et al. 2018; Sebori et al. 2018) を報告し、さらに、人の Duchenne 型、Becker 型、福山型の筋ジストロフィーに対してもレスベラトロールの長期間投与が治療効果を持つことを報告した (Kawamura et al. 2020)。予備的検討ではレスベラトロールが細胞膜修復を促す働きをすることを観察しているため、レスベラトロールが筋ジストロフィーに対して治療効果を持つ理由の 1 つとして膜修復の促進がある可能性が考えられた。このことは筋ジストロフィーの治療戦略として現在行われつつあるエクソンスキッピング法とは別の新たな治療戦略があると考えられた。

文献

1. Fujiwara D, Iwahara N, Sebori R, Hosoda R, Shimohama S, Kuno A, Horio Y. SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury. *PLoS One*. 26;14(6): e0218329. (2019)
2. Fujiwara D, Iwahara N, Sebori R, Hosoda R, Shimohama S, Kuno A, Horio Y. SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury. *PLoS One*. 26;14(6): e0218329. (2019)
3. 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)
4. Sebori R, Kuno A, 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)
5. Kawamura K, Fukumura S, Nikaido K, Tachi N, Kozuka N, Seino T, Hatakeyama K, Mori M, Ito YM, Takami A, Hinotsu S, Kuno A, Kawasaki Y, Horio Y, Tsutsumi H. Resveratrol improves motor function in patients with muscular dystrophies: an open-label, single-arm, phase IIa study. *Sci Rep*. 2020 Nov 25;10(1):20585. doi: 10.1038/s41598-020-77197-6.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamura Kentaro, Fukumura Shinobu, Nikaido Koki, Tachi Nobutada, Kozuka Naoki, Seino Tsugumi, Hatakeyama Kingya, Mori Mitsuru, Ito Yoichi M., Takami Akiyoshi, Hinotsu Shiro, Kuno Atsushi, Kawasaki Yukihiko, Horio Yoshiyuki, Tsutsumi Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Resveratrol improves motor function in patients with muscular dystrophies: an open-label, single-arm, phase IIa study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77197-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Daisuke, Iwahara Naotoshi, Sebori Rio, Hosoda Ryusuke, Shimohama Shun, Kuno Atsushi, Horio Yoshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0218329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 堀尾嘉幸
2. 発表標題 レスベラトロールの生体作用とその標的としてのタンパク質脱アセチル化酵素SIRT1
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学医学部薬理学講座
<https://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------