

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18271

研究課題名(和文)メトフォルミンは敗血症における筋組織の蛋白異化亢進を抑制する

研究課題名(英文)Metformin mitigates skeletal muscle degeneration in a sepsis model.

研究代表者

鈴木 堅悟 (Suzuki, Kengo)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90734658

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)：本研究では、Metforminの敗血症モデルにおける骨格筋への影響を検討するため、*in vitro*実験を行った。Metforminは、ユビキチンプロテアソーム経路の代表的筋萎縮原因遺伝子であるAtrogin-1とMuRFの発現量を増加させたことから蛋白分解を亢進させることが示唆された。Metforminが蛋白分解を亢進させる機序としては、炎症性サイトカインの産生増加や転写因子であるHypoxia-inducible factor 1の活性化が関与している可能性がある。また、敗血症モデルとしたLPS投与下でもMetforminは蛋白分解亢進を抑制することはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、高用量のMetforminは筋萎縮を引き起こし、その機序として筋肉細胞からの炎症性サイトカイン産生増加と転写因子HIF-1活性化の関与が考えられることが明らかになった。LPS投与下で蛋白分解亢進を抑制することはなく、メトフォルミンがICU-AWの増悪因子となる可能性を示した。しかし、酸化ストレス下ではメトフォルミン投与によりHIF-1活性が抑制しており各刺激に対して及ぼす効果についてはさらなる検討が必要である。骨格筋の細胞内代謝に及ぼす影響を詳細に解析することは、ICU-AWを予防する薬剤の発見につながると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed *in vitro* experiments to investigate the effects of Metformin on skeletal muscle in a sepsis model. Metformin increased the expression of Atrogin-1 and MuRF, which are E3 ubiquitin ligases in the ubiquitin-proteasome pathway. These findings suggest that Metformin induces muscle atrophy. The mechanism by which Metformin induces muscle atrophy may involve increased production of inflammatory cytokines and activation of the transcription factor Hypoxia-inducible factor 1. In addition, Metformin did not suppress increased proteolysis under LPS administration in a sepsis model.

研究分野：麻酔

キーワード：筋萎縮 敗血症 メトフォルミン HIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症では侵襲生体反応に伴い、筋組織において蛋白異化が亢進し筋肉量は減少する。これは、筋力低下を特徴とする疾患である ICU acquired weakness (ICU-AW) を引き起こす原因となる。ICU-AW の発症は、人工呼吸期間や ICU 在室日数を延長させるだけでなく、QOL 低下など長期的アウトカムにも影響を及ぼす。特に、本邦では高齢者が多く、筋力低下の予防は喫緊の課題と言える。

これまで侵襲から早期回復を図るために蛋白異化の抑制と蛋白合成の促進を目指した栄養療法に関する研究が盛んに行われてきた。インスリン療法による高血糖の是正が ICU-AW 発症に予防効果を示したが、栄養療法のみでは骨格筋減少は予防できず、余剰な栄養摂取は筋組織内の脂肪形成を促すとされている (Crit Care Med. 41:2298-2309, 2013)。栄養療法のみでは蛋白異化を抑制することは難しく新たな予防方法の確立が望まれる。

メトフォルミン (Metformin) はピグアナイド系薬剤に分類される糖尿病薬であるが、近年細胞内のエネルギーバランスセンサーである AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化を介して、糖代謝の改善のみならず抗炎症作用を有することが明らかになってきた。さらに、細胞内代謝に深く関わる Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) 活性にも影響することが示された (Sci Rep.20;6:35788, 2016)。HIF-1 活性は低酸素刺激だけでなく炎症によっても活性化する。敗血症モデルでは、HIF-1 活性化が示されている (Exo Ther Med. 15:4637-4642, 2018)。HIF-1 活性化は細胞内代謝を好気性から嫌気性に移行させ、蛋白代謝に関連する REDD-1 (Regulated in development and DNA damage responses 1) 遺伝子発現量を増加させる。

以上のことから、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて、Metformin が敗血症モデルにおける蛋白代謝に及ぼす影響について、HIF-1 活性化による代謝リプログラミングの解析に焦点を当て分子生物学的手法で検証することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病薬である Metformin の敗血症モデルにおける蛋白代謝に及ぼす影響を HIF-1 活性化による代謝リプログラミングの解析に焦点を当て解明することである。

## 3. 研究の方法

マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を、2%ウマ血清を含む DMEM 培地で 4 日間培養し、筋管細胞へと分化させ、0.5mM または 5mM の Metformin 投与を行った。Lipopolysaccharide (LPS) を投与し敗血症モデル、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与し酸化ストレスモデルとした。Metformin の影響を検討するため、RT-PCR を用いて標的遺伝子の mRNA 発現量を解析した。内在性コントロール遺伝子には、GAPDH を用いた。解析した遺伝子は、下記のとおりである。

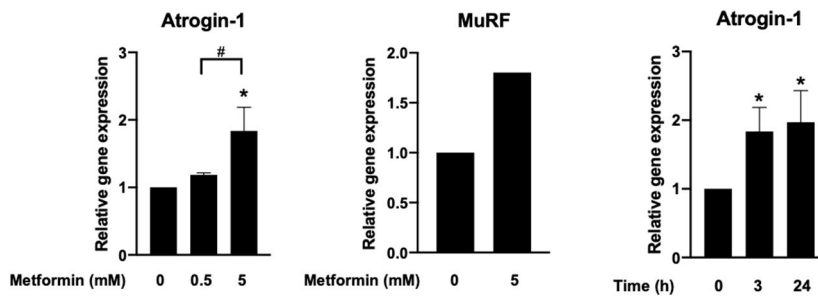
- ・蛋白分解に関わる検討 > ユビキチンプロテアソーム経路: Atrogin-1, MuRF
- > マイオスタチンシグナル経路: Myostatin
- ・炎症性サイトカイン産生の検討 > 炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- )
- ・HIF-1 活性の検討 > HIF-1 支配遺伝子 (VEGF, REDD-1)

## 4. 研究成果

*in vitro* 実験を確立させるため、C2C12 細胞株を、2%ウマ血清を含む DMEM 培地で 4 日間培養し、筋管細胞へと分化させた。この C2C12 筋管細胞を用いて、Metformin の骨格筋に及ぼす影響を検討した。

### 1) Metformin によるユビキチンプロテアソーム経路に及ぼす影響

Metformin (0.5mM と 5mM) を投与し、3 時間後にユビキチンプロテアソーム経路の代表的筋萎縮原因遺伝子である Atrogin-1 と MuRF の mRNA 発現量を解析した。Metformin (5mM) は Atrogin-1, MuRF mRNA 発現量を増加させた。次に、Metformin (5mM) 投与後 3 時間と 24 時間での Atrogin-1 mRNA の発現量を比較した。Metformin (5mM) は投与 24 時間後においても Atrogin-1 mRNA の発現量を増加させた。



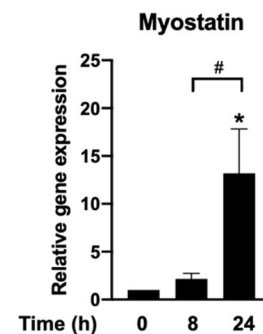
\*p<0.05 compared with metformin 0mM, #p<0.05 for comparisons between the indicated groups

以上の結果から、Metformin (5mM) はユビキチンプロテアソーム経路を介して蛋白分解を亢進させることが示唆された。

## 2) Metformin による Myostatin signaling 経路に及ぼす影響

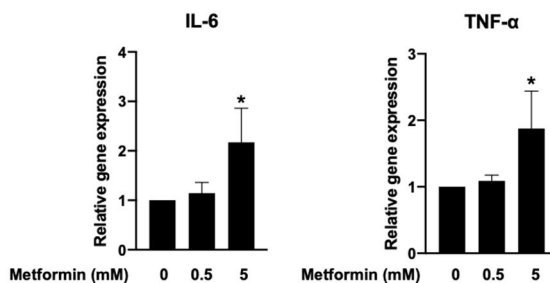
Myostatin は骨格筋で産生され、その受容体に結合することで Atrogin-1 や MuRF などの筋萎縮原因遺伝子の転写活性を誘導する。Metformin (5mM) を投与し、8, 24 時間後に Myostatin mRNA 発現量を解析した。Metformin (5mM) 投与後 24 時間で Myostatin mRNA 発現量を増加させた。

\*p<0.05 compared with metformin 0mM, #p<0.05 for comparisons between the indicated groups



## 3) Metformin による炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

Metformin が Atrogin-1 及び MuRF 発現量を増加させたことから、炎症性サイトカインである IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA の発現量を解析した。Metformin (0.5mM) では発現量増加は認めなかったが、Metformin (5mM) では、IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA は増加された。



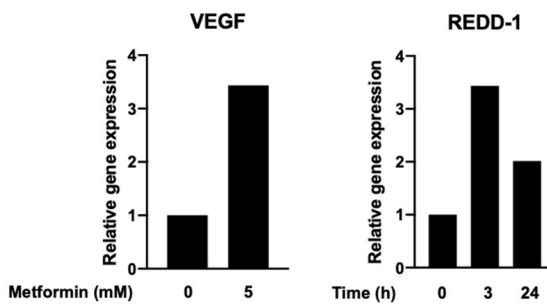
\*p<0.05 compared with metformin 0mM

以上の結果から、Atrogin-1 及び MuRF 発現量の増加に炎症性サイトカイン上昇が関与している可能性がある。

#### 4) Metformin による HIF-1 活性に及ぼす影響

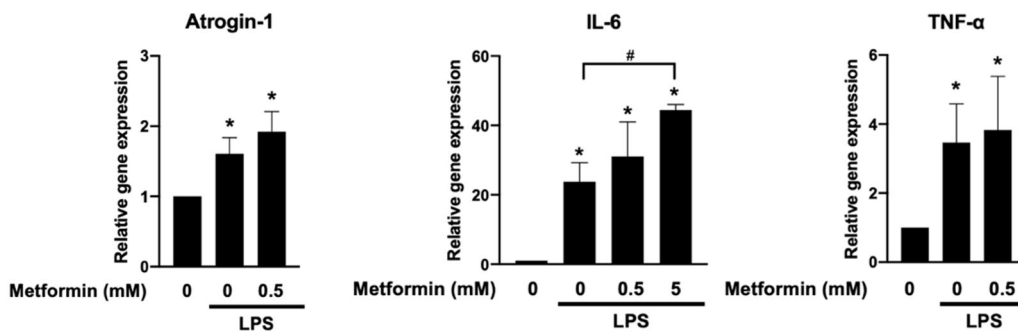
細胞内代謝に重要な役割を果たす転写因子である HIF-1 活性による影響を検討するため、HIF-1 支配遺伝子である VEGF および REDD-1 mRNA の Metformin (5mM) 投与 3, 24 時間後の発現量を解析した。VEGF は Metformin (5mM) 投与後 3 時間で mRNA 発現量の増加を認めた。REDD-1 も Metformin (5mM) 投与後 3, 24 時間で mRNA 発現量の増加を認めた。

以上の結果から、Metformin は HIF-1 活性化に関与していることが示唆された。



#### 5) LPS 刺激において Metformin が及ぼす影響

炎症下での Metformin の影響を検討するため、LPS (500ng/mL) と Metformin (0.5mM) を投与し 3 時間後の Atrogin-1 mRNA 発現量を解析した。LPS 刺激で Atrogin-1 mRNA の発現量は増加するが、Metformin (0.5mM) 投与による変化はみられなかった。次に、IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA の発現量を解析した。LPS 刺激で IL-6 と TNF- $\alpha$  mRNA の発現量は増加したが、Metformin (0.5mM) では変化を認めなかった。IL-6 に関しては、Metformin (5mM) で LPS 刺激下でもさらに IL-6 mRNA の発現量は増加した。



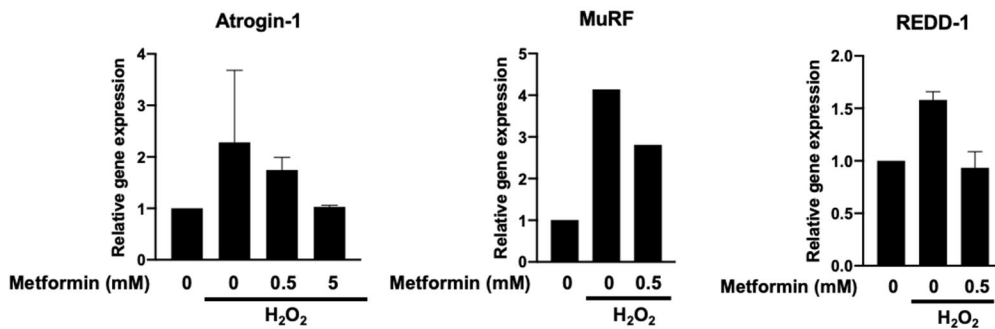
\*p<0.05 compared with metformin 0mM, #p<0.05 for comparisons between the indicated groups

以上の結果から、LPS 刺激下で Metformin は蛋白分解の亢進を抑制しないことが示唆された。

## 6) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与下において Metformin が及ぼす影響

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による刺激は細胞に酸化ストレスモデル、または不働化モデルとして用いられる。そこで、Metformin 投与が酸化ストレスに及ぼす影響を検討するため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM) と Metformin (0.5, 5mM) を投与し8時間後の Atrogin-1 と MuRF mRNA の発現量を解析した。Atrogin-1 と MuRF mRNA 発現量は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与で増加し Metformin はその発現量増加を抑制した。次に、HIF-1 活性の関与を検討するため REDD-1 mRNA 発現量を解析した。REDD-1 mRNA 発現量は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与で増加し、Metformin はその発現量増加を抑制した。

以上の結果から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与下では Metformin による蛋白分解の亢進を抑制する可能性が示



唆された。HIF-1 活性との関連は更なる検討が必要であるが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与下で HIF-1 支配遺伝子である REDD-1 発現量は Metformin により抑制された。

## 5. 今後の展望

Metformin は高濃度投与によりユビキチンプロテアソーム経路を介して蛋白分解を亢進させる可能性がある。低濃度では蛋白分解の亢進は認められなかったが、LPS 投与による敗血症モデルにおいても蛋白分解の抑制には作用しなかった。一方で、不働化モデルともされる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与下では蛋白分解の亢進を抑制し、HIF-1 支配遺伝子である REDD-1 も同様の傾向を示した。今後さらなる検討を重ね、細胞内代謝に深く関わる HIF-1 と骨格筋萎縮との関連を明らかにしていかなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shino Matsukawa, Shinichi Kai, Hideya Seo, Kengo Suzuki, Kazuhiko Fukuda	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Activation of the $\alpha$ -adrenergic receptor exacerbates lipopolysaccharide-induced wasting of skeletal muscle cells by increasing interleukin-6 production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251921	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲斐慎一、松川志乃、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 IL-6はLPS投与によるAtrogin-1遺伝子の発現量を増加させる
3. 学会等名 第48回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 カテコラミンは 2 刺激によるIL-6産生増加を介してLPS投与による筋萎縮を増悪させる
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、鈴木堅悟、瀬尾英哉、福田和彦
2. 発表標題 カテコラミンは 2 刺激によるIL-6産生増加を介してLPS投与による筋萎縮を増悪させる。
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020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
研究協力者	甲斐 慎一  (KAI SHINICHI)  (30770177)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

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