

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04035

研究課題名（和文）マイトファジー制御による筋萎縮の遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Mitophagy-mediated gene therapy for muscle atrophy

研究代表者

井上 敬一（Inoue, Keiichi）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30396981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子治療によりマイトファジー活性を人為的に操作することで、筋萎縮の進行を阻止する技術の開発を目指した。その結果、マウス骨格筋においては、ミトコンドリア外膜タンパク質であるBNIP3とNIXが協働してマイトファジーを誘導することを明らかにした。しかし、BNIP3/NIXの過剰発現によるマイトファジー誘導は、細胞死も誘導することから、遺伝子治療に利用するには適切ではないことが解った。一方で、BNIP3/NIXダブルKOマウスの骨格筋では、ミトコンドリアネットワーク構造の乱れが見られたことから、マイトファジーによる新たな骨格筋制御機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳動物個体レベルにおいて、マイトファジーを誘導する責任分子としてBNIP3とNIXを同定した。このことは、これまで不明であった個体レベルでのマイトファジー誘導の分子機構を明らかにした。また、骨格筋におけるマイトファジー不全は、ミトコンドリアネットワーク構造の形成に異常をきたすことを発見した。本研究成果は、今後ますます社会的に重大な問題となる筋萎縮の、分子・細胞レベルでの理解を促進するとともに、今後新たな治療法を開発する上で重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a technique to prevent the progression of muscle atrophy by artificially manipulating mitophagy activity through gene therapy. As a result, it was revealed that in mouse skeletal muscle, the mitochondrial outer membrane proteins BNIP3 and NIX cooperate to induce mitophagy. However, it was found that the induction of mitophagy by the overexpression of BNIP3/NIX also induces cell death, making it unsuitable for use in gene therapy. On the other hand, in the skeletal muscle of BNIP3/NIX double knockout mice, a disruption of the mitochondrial network structure was observed, suggesting the presence of a novel skeletal muscle regulatory mechanism involving mitophagy.

研究分野：生理生化学

キーワード：マイトファジー ミトコンドリア 骨格筋 遺伝子治療 マウス

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会をむかえた我が国では寝たきり患者が急増している。寝たきりは廃用性筋萎縮を引き起こし、患者の生活の質を低下させる。また長期にわたるリハビリや治療は、介護者負担や社会保障費の増大をもたらす。それゆえ廃用性筋萎縮に至る機構の解明と、リハビリに加えた速やかな治療法の開発が待たれる。

廃用性筋萎縮が起こる主な原因のひとつは、ミトコンドリアから産生される活性酸素種(ROS)である(Hoodら *Annu Rev Physiol* 2019)。ROSは筋タンパク質の分解を誘導し、筋萎縮を促進する。ミトコンドリアは、細胞活動に必要なエネルギー分子ATPを産生するオルガネラであり、不要となったミトコンドリアはオートファジー・リソソーム経路により分解除去されている(以下、マイトファジー)。不要となりROSをより多く産生するミトコンドリアは、マイトファジーにより分解されることから、廃用性筋萎縮時にはマイトファジー活性が変動していると考えられてきた。

研究代表者は、廃用性筋萎縮時におけるマイトファジー動態を解析するため、新規にマイトファジーモニターマウスを作製した。このマウスは、ミトコンドリアにmCherry-EGFP連結タンパク質を発現しており、マイトファジーによりミトコンドリアがリソソームに取り込まれるとEGFPが分解され、マイトファジー活性がmCherry陽性/EGFP陰性シグナルとして検出される。研究代表者は、このモニターマウスに後肢ギプス固定により廃用性筋萎縮を誘導した結果、ミトコンドリアの減少やROSの増加とともに、マイトファジーが増加することを発見した。一方、マイトファジー誘導剤であるウロリチンAの長期投与は、げっ歯類の加齢性の筋力低下を改善することが報告された(Ryuら *Nat Med* 2016)。

以上の結果から「廃用状態によりミトコンドリアから産生されたROSにตอบสนองしてマイトファジーが誘導されるが、ROSを産生するミトコンドリアの除去が追いつかないため筋萎縮が進行する」と推測された。そして研究代表者は、マイトファジーを促進することができれば、廃用性筋萎縮を治療できると考えた。一方、現在世界中で遺伝子治療研究が進んでいる。なかでもアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子導入は、感染後すみやかかつ長期に発現し、他のウイルスに比べ安全性も高い。そこで本研究では「AAVを用いた遺伝子導入によるマイトファジー促進は、筋萎縮の新たな治療法になりうるのではないか？」を研究課題の核心をなす学術的「問い」として設定し、以降の研究を行う。

2. 研究の目的

最終的な目標を「マイトファジー促進による筋萎縮の遺伝子治療法の確立」とする。

3. 研究の方法

(課題1) マイトファジーの筋萎縮抑制機能の検証

マイトファジー誘導剤ならびに欠損マウスを用いて、廃用性筋萎縮におけるマイトファジーの生理的意義を解明し、マイトファジー促進による筋萎縮治療を行うエビデンスを得る。

(課題2) マイトファジー促進遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

マイトファジーを促進させる遺伝子を、クリスパー転写活性化を用いてゲノムワイドにスクリーニングする。

(課題3) マイトファジー促進遺伝子導入による筋萎縮モデルマウスの遺伝子治療

AAVを用いてマイトファジー促進遺伝子を発現させることにより、筋萎縮モデルマウスの治療を試みる。廃用性筋萎縮とデュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療対象とする。

4. 研究成果

(1) マウス生体内におけるマイトファジー誘導分子の同定

骨格筋を含むマウス全身の組織において、マイトファジーの誘導に関わる分子の決定を行なった。代表者の過去の研究から、マウスを24時間絶食させると、その心筋組織において、一過性にマイトファジーが誘導されることが明らかとなっていた。一方、培養細胞を用いた研究から、これまでにマイトファジー誘導候補遺伝子として、9種類の遺伝子が報告されていた(PINK1、Parkin、MUL1、ARH1、BNIP3、NIX、FUNDC1、FKBP8、BCL2L13)が、このいずれの分子が生体内のマイトファジー誘導に関わるかは不明であった。そこで、24時間絶食したマウスの心筋における、これらの遺伝子の発現量変化から、マイトファジー誘導候補遺伝子を探索した。その結果、絶食させたマウス心筋においては、Parkin、BNIP3、NIXの3種類の遺伝子の発現量が有意に増加していた。

そこで、Parkin、BNIP3、NIXそれぞれの遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、これらをマイトファジーモニターマウスと交配することで、それぞれの遺伝子欠損が生体内のマイトファジー活性レベルに及ぼす影響を調べた。Parkin_KOマウスにおいては、心筋や骨格筋(ヒラメ筋)を含む解析した全ての臓器において(脳、肺、肝臓、膵臓、腎臓、脾臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織)、マイトファジー活性の変化は見られなかった。さらに、Parkin_KOマウスに絶食によりマイトファジーを誘導しても、心筋においてマイトファジーは正常に誘導された。以上から、マウス生体内においてParkinはマイトファジーの誘導には関わっていないことが示唆された。BNIP3_KOマウスにおいては、心筋、骨格筋においてマイトファジー活性が有意に減少していた(それぞれ約75、85%の減少)。さらに、マイトファジー活性の低下にともない、心筋、骨格筋においてミトコンドリア量も増加していた(約50、60%の増加)。一方、NIX_KOマウスにおいては、膵臓においてマイトファジー活性が有意に減少していた(約40%の減少)。また、マイトファジー活性の低下にともない、膵臓においてミトコンドリア量も増加していた(約40%の増加)。次に、BNIP3/NIXの二重欠損(DKO)マウスを作製し、同様に解析した。BNIP3/NIX_DKOマウスの心筋、骨格筋、膵臓では、それぞれの単独KOマウスに比べ、相乗的なマイトファジー活性の減少が見られた(それぞれ約95、95、90%の減少)。同時にこれらの組織では、ミトコンドリア量も有意に増加していた(それぞれ約70、70、180%の減少)。さらに、これら以外のすべての臓器において、ミトコンドリア量が相乗的に増加していた。以上から、BNIP3とNIXは全身の組織において、相補的に機能することでマイトファジーを誘導していることが示唆された。さらに、絶食によりBNIP3/NIX_DKOマウスの心臓にマイトファジーを誘導しても、その増加率は極めて小さかった。これらの結果から、BNIP3/NIX_DKOマウスは全身性にマイトファジーが欠損したマウスであると結論づけた(マイトファジー不能マウス)。

BNIP3/NIX_DKOマウスは、正常なメンデル比で誕生し、生後3ヶ月までは外見上正常に成長し

た。しかしながら、生後3ヶ月以降 BNIP3/NIX_DKO マウスは散発的に死に始め、9ヶ月齢までに50%が突然死し、15ヶ月齢では21%のマウスが生存した(野生型マウスは94%生存)。このことから、全身性マイトファジー不能モデルである BNIP3/NIX_DKO マウスは著しく短命であることがわかった。また、オス・メスともに BNIP3/NIX_DKO マウスは、不妊であった。

さらに、BNIP3/NIX_DKO マウスの骨格筋組織を詳細に解析した。本来ミトコンドリアは、酸素を取り込み、骨格筋の収縮に必要な ATP を産生している。骨格筋を構成する筋線維(筋細胞)は、多数の筋原線維の束を持つ。筋原線維は、サルコメアという節構造の連結からなり、ATP を利用して物理的に収縮することで、骨格筋全体が収縮する。そのため筋線維には、多数のサルコメアに ATP を供給するために、2種類のミトコンドリアが存在する。ひとつは、筋線維の外周部に存在し、血管から酸素を取り込む「傍血管ミトコンドリア」である。もうひとつは、傍血管ミトコンドリアから細長くネットワーク状に張り巡らされた「網状ミトコンドリア(以下、ミトコンドリアネットワークと呼ぶ)」であり、すみずみのサルコメアにまで ATP を供給する(Glancy et al, *Nature* 2015)。

代表者が独自に開発したマイトファジー活性モニターマウスに、不働化により筋萎縮を誘導すると、筋線維のミトコンドリアネットワーク上にマイトファジーが強く誘導された。さらに、マイトファジーが起これないマウス(マイトファジー不全マウス)を作製したところ、筋線維のミトコンドリアネットワークの構造異常(乱れ)が見られた。以上の結果をもとに、代表者は、「マイトファジーは、不働化により筋線維のミトコンドリア上に誘導され、そのネットワーク構造を改変する。その結果、サルコメアへの ATP 供給が減少することで、筋萎縮を促進する」というモデルを立てるに至った。

以上より、BNIP3 と NIX を標的にしたマイトファジー活性調節を行うことで、筋線維内ミトコンドリアネットワークを改変することで、筋萎縮の予防・治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 井上敬一、神吉智丈	4. 巻 281
2. 論文標題 マイトファジーとミトコンドリア病	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 週間医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1145-1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yamashita Shun Ichi, Kyuuma Masanao, Inoue Keiichi, Hata Yuki, Kawada Ryu, Yamabi Masaki, Fujii Yasuyuki, Sakagami Junko, Fukuda Tomoyuki, Furukawa Kentaro, Tsukamoto Satoshi, Kanki Tomotake	4. 巻 236
2. 論文標題 Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse induced muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7612 ~ 7624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30404	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 -
1. 著者名 Inoue Keiichi	4. 巻 172
2. 論文標題 CRISPR-activated patient fibroblasts for modeling of familial Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 7 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.03.008	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 -
1. 著者名 Innokentev Aleksei, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Saigusa Tetsu, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e63694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.63694	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 Fukuda Tomoyuki, Ebi Yuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61245	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 Igarashi Ryoko, Yamashita Shun-ichi, Yamashita Tomohiro, Inoue Keiichi, Fukuda Tomoyuki, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Gencitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58315-w	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 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 井上敬一
2. 発表標題 哺乳類マイトファジーの分子機構と老化
3. 学会等名 第3回オートファジーコンソーシアムシンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能制御学分野Webサイト
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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	瀬原 吉英 (Sehara Yoshihide) (50721156)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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