

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19639

研究課題名（和文）ストレス応答分子H0-1を介した新規抗筋萎縮シグナルの解明

研究課題名（英文）Novel anti-muscle atrophy signaling via the stress response molecule H0-1

研究代表者

内田 貴之（UCHIDA, Takayuki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：00803561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋量を維持するためには、鉄代謝とミトコンドリア代謝の関係が重要である。これまでの研究では、鉄欠乏がミトコンドリアの機能低下や筋細胞の異常を引き起こすことが示されている。本研究では、鉄量の変動が筋細胞の代謝にどのような影響を与えるかを調査した。結果として、鉄キレート剤であるDFOの処理によってミトコンドリアのタンパク質やたんぱく質合成のバランスが低下し、筋機能も低下することがわかった。また、筋萎縮モデルでは、鉄量の変動が筋萎縮関連遺伝子発現に影響を与えることも示された。これらの結果から、筋細胞内の鉄代謝とミトコンドリア代謝の相互関係が筋萎縮の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、鉄・エネルギー代謝異常から筋萎縮へと繋がる新規経路が明らかになり、大きな学術的意義を持つ。さらに、萎縮環境における鉄付加で筋萎縮抑制傾向がみられたことは、寝たきり状態や消耗性疾患等による筋萎縮を予防するために、食事やサプリメントとしての鉄付加が有効である可能性を示唆しており、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：To maintain skeletal muscle mass, the relationship between iron metabolism and mitochondrial metabolism is crucial. Previous studies have demonstrated that iron deficiency leads to mitochondrial dysfunction and abnormalities in muscle cells. In this study, we investigated how fluctuations in iron levels affect muscle cell metabolism. The results revealed that treatment with the iron chelator DFO resulted in a decrease in mitochondrial proteins and an imbalance in protein synthesis in muscle cells, leading to reduced muscle function. Furthermore, in a muscle atrophy model, it was observed that changes in iron levels affected the expression of muscle atrophy-related genes. These findings suggest that the interplay between iron metabolism and mitochondrial metabolism in muscle cells may contribute to the development of muscle atrophy.

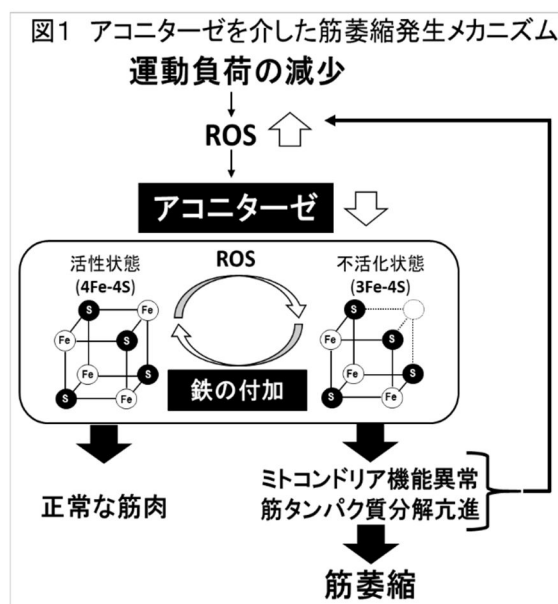
研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：筋萎縮 鉄代謝 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

2007年に超高齢社会を迎えた我が国においては、平均寿命と健康寿命の差をいかにして減少させるかが解決すべき喫緊の課題となっている。特に骨格筋をはじめとした運動機能を維持することは、健康寿命の延伸のために非常に重要である。骨格筋量は加齢や運動負荷の減少(寝たきりなどの unloading 環境)によって低下することが知られている(図1)。これら筋萎縮の誘導因子についてはミトコンドリアの機能低下や酸化ストレスの産生亢進、鉄代謝異常など様々な報告が為されている。しかし、未だ筋萎縮発生メカニズムの全容は不明な点が多く、筋萎縮に対する根本的な治療法は存在しない。

筋細胞は微小重力環境に置かれると、酸化ストレス産生が亢進し、ミトコンドリアの分裂亢進とATP産生量低下(ミトコンドリア代謝異常)や鉄量の減少(鉄代謝異常)が引き起こされ、筋タンパク質の分解が誘導されることが明らかになっている。この時、ミトコンドリアの代謝異常はTCAサイクルの律速酵素である、アコニターゼの不活化によって引き起こされている。アコニターゼはその酵素活性の中心に鉄・硫黄クラスターを保持しており、酸化ストレスにより鉄・硫黄クラスターから鉄が遊離することで不活化状態となる。このため、萎縮環境における鉄の付加はアコニターゼの活性化を促し、筋萎縮抑制効果を示す。申請者は、萎縮環境におけるこれらの酸化ストレス・鉄・エネルギー代謝異常を中心的に制御する分子が存在するのではないかと考え、HO-1に着目した。



2. 研究の目的

酸化ストレス・鉄・エネルギー代謝異常が筋萎縮に与える影響を統合的に理解し、それらをHO-1が制御するメカニズムを解明する。具体的には、萎縮環境における酸化ストレス・鉄・エネルギー代謝異常が、どのように相互作用し合い筋萎縮を誘導しているかを明らかにする。さらに、それぞれの経路へのHO-1の寄与についても検証する。

3. 研究の方法

本研究では、以下の通り研究を遂行した。酸化ストレス・鉄・エネルギー代謝を制御するHO-1を介した筋萎縮誘導経路の解明を目的として、模擬微小重力装置を用いた微小重力刺激や、培養細胞伸展装置を用いた伸展刺激など様々な力学負荷を筋細胞に加えた(取り除いた)時の、ミトコンドリア形態・機能の変化、酸化ストレス産生量および鉄量やその調節因子を生化学的手法と構造生物学的手法で解析し、その相互作用メカニズムを検証した。並行して、HO-1のノックダウンを行った細胞を用いて同様の実験を実施した。

4. 研究成果

R2年度は、siRNAによるHO-1ノックダウンまたはHO-1の増強が筋細胞に与える影響を解析するため、これらの実験系の確立を行った。C2C12筋細胞へのHO-1 siRNA処理によってmRNAで80%以上、タンパク質レベルで70%以上のノックダウン効率が確認された。また、HO-1のノックダウンおよび増強は、C2C12筋細胞を用いた筋管形成試験においては著明な変化を認めなかった。

R3年度は、昨年度に引き続きHO-1ノックダウン細胞で、および筋萎縮モデルでのミトコンドリアの機能性評価・エネルギー代謝・筋萎縮抑制効果について検討を行った。また、筋細胞内の鉄量を鉄キレート剤で低下、あるいは増加させたときのHO-1の役割についても解析を行った。

R4年度は、まず筋細胞内の鉄量変化の影響性について検証した。鉄キレート剤であるDFO、およびFeSO4添加によって細胞内鉄量を変動させ、ミトコンドリア代謝への影響を確認した。その結果、DFO処理はミトコンドリア呼吸鎖複合体たんぱく質 および、ミトコンドリア融合タンパク質であるMfn2たんぱく質を大きく減少させ、以外の呼吸鎖複合体たんぱく質も減少傾向が見られた。これらのDFO処理による変化は、全てFeSO4添加により回復が見られ、筋細胞において鉄欠乏がミトコンドリア代謝を低下させることが示唆された。さらに、DFO処理はたんぱく質合成/分解バランスを司るAktのリン酸化レベルも低下させ、FeSO4添加によりリン酸化レベルの低下は回復が見られた。このことから、筋細胞内鉄量の変動は、たんぱく質合成/分解経路にも

影響を与えていることが明らかになった。続いて、デキサメタゾン (DEX) を用いた筋萎縮モデルへの鉄量変化の影響性を検証した。その結果、DEX 添加による筋萎縮関連遺伝子の転写に関わる FOXO3 上昇が、FeSO₄ 添加によって抑制傾向がみられた。このモデルにおいて、siRNA を用いた H0-1 のノックダウンは、これらの鉄量変動による変化に影響を与えなかった。本研究において、筋細胞内の鉄代謝・ミトコンドリア代謝の相互関係の変化が、筋萎縮誘導に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ayano Kato, Iori Sakakibara, Taku Fukushima, Kosuke Sugiura, Tomoya Fukawa, Takeshi Nikawa and Takayuki Uchida	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantitative Proteome Analysis in Response to Glucose Concentration in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12031553	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 Taku Fukushima, Miho Takata, Ayano Kato, Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa and Iori Sakakibara	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome Analyses of In Vitro Exercise Models by Clenbuterol Supplementation or Electrical Pulse Stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app112110436	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 Adachi Y, Masuda M, Sakakibara I, Uchida T, Niida Y, Mori Y, Kamei Y, Okumura Y, Ohnishi H, Ohnishi K, Yamanaka-Okumura H, Nikawa T, Taketani Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 All-trans retinoic acid changes muscle fiber type via increasing GADD34 dependent on MAPK signal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101345	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 Nakao R, Shen W, Shimajiri Y, Kainou K, Sato Y, Ulla A, Ohnishi K, Ninomiya M, Ohno A, Uchida T, Tanaka M, Akama K, Matsui T, Nikawa T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Oral intake of rice overexpressing ubiquitin ligase inhibitory pentapeptide prevents atrophy in denervated skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Sci Food	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41538-021-00108-0.	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 Sugiura K, Hirasaka K, Maeda T, Uchida T, Kishimoto K, Oarada M, Labeit S, Ulla A, Sakakibara I, Nakao R, Sairyo K, Nikawa T.	4. 巻 40
2. 論文標題 MuRF1 deficiency prevents age-related fat weight gain, possibly through accumulation of PDK4 in skeletal muscle mitochondria in older mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 1026-1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.25131	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 Ulla A, Uchida T, Miki Y, Sugiura K, Higashitani A, Kobayashi T, Ohno A, Nakao R, Hirasaka K, Sakakibara I, Nikawa T.	4. 巻 704
2. 論文標題 Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108873	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 Ohno A, Maita N, Tabata T, Nagano H, Arita K, Ariyoshi M, Uchida T, Nakao R, Ulla A, Sugiura K, Kishimoto K, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Nikawa T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Crystal structure of inhibitor-bound human MSPL that can activate high pathogenic avian influenza	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13020379	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷口瑠菜, 藤岡大樹, 内田貴之, 二川健
2. 発表標題 Mitofusin 2を介した筋内Ca ²⁺ -ROSシグナルの変化
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川端いずみ、内田貴之、加藤彩乃、Anaytulla、内田裕子、森貞夫、森田稔、二川健
2. 発表標題 ピセアタンノールの筋萎縮抑制効果の検討
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤彩乃、内田貴之、杉浦宏祐、池田泰隆、濱田広一郎、二川健
2. 発表標題 細胞内エネルギー代謝が筋繊維タイプに与える影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡大樹、内田貴之、杉浦宏祐、小林剛、東谷篤志、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 Unloadingによる筋萎縮におけるCa ²⁺ -ROSシグナルの変化
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田貴之、三木裕加里、杉浦宏祐、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、小林剛、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 筋肉におけるミトコンドリアタンパク質Mfn2の役割
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西良浩一、杉浦宏祐、内田貴之、二川健
2. 発表標題 ミトコンドリア-小胞体接触領域(MAM)は廃用性筋萎縮を制御する
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新垣 翼、谷口 瑠菜、青木 栄理香、佐藤 文香、高田 実穂、内田 貴之、二川 健
2. 発表標題 高脂肪食負荷によるMfn2と骨格筋エネルギー代謝の関連解明
3. 学会等名 第76回 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 穂、松木 大揮、中野 亘、杉浦 宏祐、布川 朋也、内田 貴之、榊原 伊織、二川 健
2. 発表標題 廃用性筋萎縮におけるアコニターゼ活性の低下とその栄養学的保護
3. 学会等名 第76回 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田 実穂、榊原 伊織、岸田 昂大、福島 拓、新垣 翼、内田 貴之、布川 朋也、二川 健
2. 発表標題 骨格筋におけるAconitase2の機能解明
3. 学会等名 第76回 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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