

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800051

研究課題名（和文）関節リウマチに伴う骨格筋の機能低下における活性酸素・窒素種の役割

研究課題名（英文）The role of reactive oxygen and nitrogen species in rheumatoid arthritis-induced skeletal muscle dysfunction.

研究代表者

山田 崇史 (YAMADA TAKASHI)

札幌医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：50583176

研究成果の概要（和文）：

ペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) は、関節リウマチに伴う筋力低下の要因の一つであることが示唆されている。しかしながら、ONOO<sup>-</sup>が骨格筋に及ぼす生物学的な作用は十分明らかにされていない。そこで本研究では、ONOO<sup>-</sup>ドナーである 3-morpholinosynonimine (SIN-1) が、マウスの足部から採取した単一筋線維の収縮機能に及ぼす影響を検討した。その結果、ONOO<sup>-</sup>は筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出チャネルの酸化的修飾を引き起こすことで、骨格筋の機能低下を誘引することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Peroxynitrite anion (ONOO<sup>-</sup>) has been proposed to be one of the principal causes of the muscle wasting and weakness observed in rheumatoid arthritis. However, the biological effects of ONOO<sup>-</sup> on skeletal muscle remains poorly understood. The present study investigated the effects of ONOO<sup>-</sup> donor 3-morpholinosynonimine (SIN-1) on the contractile properties of intact fibres from a mouse foot muscle. Our results suggest that ONOO<sup>-</sup> induces the skeletal muscle dysfunction due to an irreversible oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：関節リウマチ，骨格筋，収縮機能，活性酸素・窒素種，ペルオキシナイトライト，細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度，リアノジン受容体，酸化的修飾

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) 等の関節疾患は、介護保険が適用される主要な原因である。RA では、関節障害に加え、筋力が著しく低下するために、介護や支援の必要性が増大する。し

たがって、RA に伴う筋機能低下の要因を明らかにし、効果的な筋力低下防止プログラムを確立することは喫緊の課題である。これまで申請者らは、RA モデル動物であるコラーゲン誘発性関節炎マウスの骨格筋において

認められる筋力の低下が、筋量の減少よりも、むしろ固有張力（単位断面積当たりの張力）の低下に起因することを明らかにし、ペルオキシナイトライト（ONOO<sup>-</sup>）による筋タンパク質の酸化的修飾がそのメカニズムに関与することを示唆した。しかしながら、ONOO<sup>-</sup>が骨格筋の機能に及ぼす影響については十分明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ONOO<sup>-</sup>による酸化ストレスが、関節リウマチにおける骨格筋機能低下の要因であると仮説し、その基礎的研究として、ONOO<sup>-</sup>が筋線維の機能に及ぼす影響とそのメカニズムについて検討した。

## 3. 研究の方法

本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け実施された。なお、一部の実験は、北ストックホルム動物実験倫理委員会の承認を受け、カロリンスカ研究所の筋生理学研究室（Prof. Håkan Westerblad）において実施された。

### (1) 単一筋線維の採取

NMRI系あるいはC57BL/6系マウスから短趾屈筋を採取し実験に供した。単一筋線維の採取には、実体顕微鏡下で切り出す方法と、コラゲナーゼにより単離する方法を用い、それぞれを目的に応じて使用した。

### (2) 単一筋線維における収縮機能及び細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）

ONOO<sup>-</sup>が張力及び細胞内Ca<sup>2+</sup>ハンドリングに及ぼす影響を検討するために、供与体である3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 溶液へ単一筋線維を曝露し、強縮（70 Hz）時の張力および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を経時的に測定した。なお、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の測定には、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬であるindo-1を用いた。

### (3) 筋小胞体Ca<sup>2+</sup>放出チャネル（RyR）の酸化還元動態

ONOO<sup>-</sup>が筋機能に及ぼす作用のメカニズムを検討するために、筋線維をSIN-1溶液へ曝露した後、RyRにおけるグルタチオン化及びニトロシル化の量をWestern blotting法により解析した。

### (4) ミトコンドリアのスーパーオキシド生成及び膜電位

ONOO<sup>-</sup>がミトコンドリアの機能に及ぼす影響を検討するために、SIN-1溶液へ筋線維を曝露し、蛍光指示薬であるTMREを用いてミトコンドリア膜電位を、一方、MitoSox Redを用いてミトコンドリアのスーパーオキシド生成量の変化を経時的に測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ONOO<sup>-</sup>が骨格筋の収縮機能及び[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に及ぼす影響

筋線維を0.2 mM SIN-1へ曝露する前と、120分間曝露した時点における最大張力およびCa<sub>50</sub>（最大張力の50%を発揮するために必要な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）に差異は認められなかった。しかしながら、曝露時間を延長すると、180±20（mean±SE, n=5）分後に強縮時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>とともに張力は消失した。一方、安静時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は、曝露前の値と比べ漸増的に増加した。また、収縮機能が停止した後も筋線維をSIN-1へ曝露し続けると、すべての筋線維は拘縮を起した。なお、SIN-1によるこれらの作用は、0.1 mM以上の濃度で誘引され、Ca<sup>2+</sup>が存在しない溶液中においても観察された。これらの知見から、筋線維をONOO<sup>-</sup>へ長時間曝露すると、筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出機能が阻害され、収縮機能が停止することが明らかとなった。また、ONOO<sup>-</sup>の曝露により生じる安静時[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加は、筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>漏出あるいはCa<sup>2+</sup>取り込み能力の低下に起因することが示唆された。

### (2) 還元剤がONOO<sup>-</sup>誘因性の筋機能低下に及ぼす影響

ONOO<sup>-</sup>による細胞内Ca<sup>2+</sup>ハンドリング機能の低下が、筋小胞体タンパク質におけるチオール基の酸化により生じると仮説し、還元剤であるジチオトレイトール（DTT）の作用を検討した。筋線維を0.5 mM SIN-1溶液へ60分間曝露すると、強縮時[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の低下及び安静時[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加が認められたが、1 mM DTT溶液への15分間の曝露により、それらはSIN-1溶液へ曝露する前の値まで回復した。しかしながら、その効果は一時的なものであり、さらに30分ほど生理食塩水への曝露を継続すると、強縮時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は消失し収縮機能は停止した。したがって、ONOO<sup>-</sup>による筋小胞体Ca<sup>2+</sup>放出機能の低下には、チオール基の酸化が部分的に関与していることが示唆された。

### (3) ONOO<sup>-</sup>がRyRの酸化還元動態に及ぼす影響

前述の知見は、ONOO<sup>-</sup>による酸化ストレスが、筋小胞体のCa<sup>2+</sup>ハンドリング能力の低下を誘引し、筋機能の低下を招くことを示すものであるが、その分子機構は不明である。そこで我々は、ONOO<sup>-</sup>による筋機能低下のメカニズムについて、酸化還元動態に対する感受性の高いRyRに焦点をあてて検討した。その結果、RyRのニトロシル化の量に変化は認められなかったが、グルタチオン化の量が低下することが明らかとなった。先行研究において、グルタチオン化の量の低下は、遊離チオール

基の不可逆的な酸化的修飾とともに生じることが示されている。したがって、ONOO<sup>-</sup>による筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出機能の低下は、RyRにおいて、酸化的修飾が増大することにより生じると考えられる。

#### (4) ONOO<sup>-</sup>がミトコンドリアのスーパーオキシド生成に及ぼす影響

本研究の結果から、SIN-1を曝露した筋線維においてMitoSox Redの蛍光値の蛍光強度がSIN-1への曝露時間に依存して増大した。先行研究において、ONOO<sup>-</sup>はミトコンドリア呼吸鎖における複合体IIIの働きを抑制しスーパーオキシド生成を増大させることが示されている。また、安静時[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加は、ミトコンドリアにおけるCa<sup>2+</sup>濃度の増大を招くことで、スーパーオキシドの生成を誘引することが報告されている。したがって、前述したRyRの酸化的修飾には、ONOO<sup>-</sup>自体による酸化ストレスとともに、これらのメカニズムを介したミトコンドリア由来の酸化ストレスが関与することが示唆された。

#### (5) ONOO<sup>-</sup>がミトコンドリアの膜電位に及ぼす影響

ONOO<sup>-</sup>はその濃度や曝露時間に依存して、細胞のアポトーシス及びネクローシスを引き起こすことが示されている。また、アポトーシスの要因の一つとして、ミトコンドリア内における酸化ストレスの増大が挙げられる。本研究では、長時間のSIN-1への曝露により、TMREの蛍光強度が増加したことから、ミトコンドリアにおけるアポトーシス経路の活性化が、ONOO<sup>-</sup>誘因性の筋細胞死に関与することが示唆された。また、ONOO<sup>-</sup>によるミトコンドリア呼吸の抑制は、ATPの合成を阻害することで、最終的に筋線維の硬直型の拘縮を誘引すると考えられる。本研究において筋収縮機能停止後に認められた緩徐進行性の拘縮は、この考えを支持するものである。

#### (6) 今後の展望

本研究の結果から、ONOO<sup>-</sup>による筋小胞体のCa<sup>2+</sup>放出チャネルの酸化的修飾が、骨格筋の機能低下を誘引する因子であることが示唆された。先行研究において、我々はRAモデルマウスで観察される著しい筋力の低下が、ONOO<sup>-</sup>による筋タンパク質の酸化的修飾を伴うことを示していることから、本研究で得られた知見は、RAで認められる筋機能の低下に、ONOO<sup>-</sup>による酸化ストレスが関与する可能性を示唆するものである。近年、運動あるいは物理療法により、骨格筋における抗酸化能力の向上が図られることが示されていることから、今後は、抗酸化ストレスの向上という観点から、RAにおける安全で効果的な筋力強化方法について検討していく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 山田崇史：関節リウマチにおける筋力低下のメカニズムとその対策. *日本基礎理学療法学会雑誌* 15: 9-16, 2011 (査読無)
- ② 山田崇史：骨格筋を知る—分子レベルから覗く骨格筋研究—7, 老化に伴う筋弱化的メカニズム, *体育の科学*, 61: 127-133, 2011 (査読無)
- ③ Andersson, DC., Fauconnier, J., Yamada, T., Lacampagne, A., Zhang, SJ., Katz, A. and Westerblad, H. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the {beta}-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* 589: 1791-1801, 2011 (査読有)
- ④ Bruton, JD., Aydin, J., Yamada, T., Shabalina, IG, Ivarsson, N., Zhang, SJ., Wada, M., Tavi, P., Nedergaard, J., Katz, A. and Westerblad, H. Increased fatigue resistance linked to Ca<sup>2+</sup>-stimulated mitochondrial biogenesis in muscle fibres of cold-acclimated mice. *J. Physiol.* 588: 4275-4288, 2010 (査読有)
- ⑤ Yamada, T., Zhang, SJ., Westerblad, H. and Katz, A. {beta}-Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299: E364-E373, 2010 (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① Matsunaga, S., Kanzaki, K., Kuratani, M., Yamada, T., Matsunaga, S. and Wada, M.: Effects of disuse on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and sarcolemma Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-cycling properties. *40<sup>th</sup> European Muscle Conference*. Berlin, September 2011
- ② Kanzaki, K., Kuratani, M., Matsunaga, S., Yamada, T. and Wada, M.: The effect of eccentric contractions on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-sequestering capacity and proteolytic activity in fast-twitch muscle of the rat. *40<sup>th</sup> European Muscle Conference*. Berlin, September 2011
- ③ Kuratani, M., Kanzaki, K., Yamada, T., Matsunaga, S. and Wada, M.: Effects of diabetes on myofibrillar protein content in cardiac muscle. *40<sup>th</sup> European Muscle Conference*. Berlin, September 2011
- ④ Yamada, T., Ivarsson, N., Kanzaki, K., Kuratani, M., Matsunaga, S., Wada, M., Westerblad, H. and Bruton, JD.: Effects of peroxynitrite on intact, single skeletal

muscle fibres from the mouse. **40<sup>th</sup> European Muscle Conference**. Berlin, September 2011

- ⑤ 山田崇史：関節リウマチにおける筋力低下のメカニズムとその対策. **第1回日本基礎理学療法学会学術大会**. 宮崎県宮崎市, 2011年5月
- ⑥ 山田崇史：筋肉弱化的メカニズム. **東海大学体育学研究科FD研究会**. 神奈川県平塚市, 2010年11月
- ⑦ 山田崇史：筋弱化的メカニズム. **第27回筋肉の会**. 千葉県市川市, 2010年9月
- ⑧ 山田崇史：ベルオキシナイトライトがマウスの単一筋線維に及ぼす影響. **第65回日本体力医学会大会**. 千葉県千葉市, 2010年9月

[図書] (計1件)

- ① Westerblad, H., Place, N. and Yamada, T.: Muscle biophysics. From molecule to cells. Rassier, DE. (Ed.), Chapter 16, Mechanisms of skeletal muscle weakness. **Adv. Exp. Med. Biol.** 682: 279-296, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 崇史 (YAMADA TAKASHI)  
札幌医科大学・保健医療学部・講師  
研究者番号：50583176