

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670109

研究課題名(和文) 転写因子Nrf2の酸化ストレスと自食作用脆弱化の病態制御による高齢者筋萎縮の予防

研究課題名(英文) Prevention of muscle atrophy in aged subjects by transcription factor Nrf2 through the modulation of anti-oxidative stress and autophagy systems.

研究代表者

正田 純一 (Shoda, Junichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90241827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：運動は骨格筋の萎縮を予防し筋量を保つ。一方、筋収縮は、骨格筋内での活性酸素種(ROS)の過剰な産生を誘導する。ROSの増加は、筋組織の機能異常をもたらす。本研究では、C2C12筋管細胞の過度な収縮は、ROS生成を引き起こし、転写因子Nrf2とその標的遺伝子はROSの消去に働くこと、そして、過剰なROSは筋管細胞の細胞死を誘導するが、Nrf2の活性化はROSを消去し、その反応を抑止することを実証した。Nrf2は骨格筋の過度な収縮に伴う酸化ストレスから、筋機能を維持するために組織保護の役割を担っている。Nrf2が運動時における骨格筋のエネルギー代謝機能の維持にも深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exercise plays an important role in preventing skeletal muscle atrophy and maintaining muscle volume. On the other hand, muscle contraction yields excessive amounts of reactive oxygen species (ROSs) in the tissues. The increased amounts of ROSs disturb the function of muscles. In this study, we revealed that excessive contractions of C2C12 myotube cells generate excessive amounts of ROS, that transcription factor Nrf2 and its targeting genes contribute to the deletion of the ROSs, that the excessive amounts of ROSs induce apoptosis of the myotube cells, and that activation of Nrf2 inhibits the cell apoptosis by deleting the ROSs. In other words, it is suggested that Nrf2 plays a role in protecting muscle tissues from the oxidative stress to maintain the function, and that the ROSs generated by muscle contractions are derived from the mitochondria in the muscles. Collectively, Nrf2 is closely involved in the maintenance of energy metabolic function during exercise.

研究分野：体力医学

キーワード：骨格筋 酸化ストレス 転写因子 細胞死 運動機能

1. 研究開始当初の背景

定期的な運動は骨格筋の萎縮を予防し、筋量を保つために重要な役割を果たす。一方、運動による筋収縮は、骨格筋内での活性酸素種および活性窒素種 (ROS/RNS) の過剰な産生を誘導することが知られている。骨格筋組織内での過剰なROS/RNSの増加は、筋組織の機能異常をもたらす、運動能力を低下させるだけでなく、最終的には身体へ様々な健康的悪影響をおよぼす。抗酸化応答の主要調節因子である転写因子; Nrf2は、細胞内での抗酸化応答を調節し、器官の構造と機能を保護することが知られている。しかし、運動や筋の収縮によって誘発されるROS/RNSに対する、骨格筋内でのNrf2の役割は明らかではない。

我々は運動時の骨格筋の機能調節に、転写因子Nrf2が深く関与していることを推測している。そこで本研究では、筋収縮時の酸化ストレス反応およびNrf2の役割を、分化したC2C12細胞および電気パルス刺激 (EPS) 装置を使用して解析した。

2. 研究の目的

筋芽細胞株 C2C12 と細胞電気パルス刺激 (EPS) 装置を用いて、運動時の骨格筋内での酸化ストレスの状態と Nrf2 の挙動を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

筋芽細胞株 C2C12 と EPS 装置を用いて、骨格筋収縮時の酸化ストレス状態および Nrf2 の挙動を分子生物学的な実験手法により解析した。C2C12 は、分化培地 (2%ウマ血清 / DMEM 培地) による分化誘導 5 日後に、筋管が形成されていることを確認し、実験に使用した。C2C12 筋管細胞への EPS 刺激は、0 ~ 40V、1Hz、2ms の強度によって行った。

4. 研究成果

分化させたC2C12に、EPS刺激による強制収縮刺激を加え、筋管細胞の収縮を確認した。また、EPS刺激時の活性酸素種の生成量を、2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) プローブを用いて観察した結果、電気刺激強度 (電圧) および、刺激時間依存的な、蛍光強度の増加を認めた。さらに、この時のNrf2活性化および、Nrf2転写標的分子のmRNA発現量を解析したところ、Nrf2の活性化による標的分子であるNQO-1、HO-1、GCLM mRNAの有意に増加を認めた。また、Nrf2発現をsiRNAプローブを導入して、ノックダウンさせると、EPS刺激によるNrf2の活性化と、Nrf2標的遺伝子の著しい発現抑制が認められた。すなわち、EPS刺激による筋管細胞の強制収縮は、過剰な活性酸素種および活性窒素種 (ROS/RNS) を産生させ、Nrf2の活性化を誘導することが示された。

我々は、EPS刺激後のNrf2の活性化と下流遺伝子の発現増加は、ROS/RNSの消去に働いていると推測し、EPS刺激により生成されたROSの消去能を、siNrf2処理をしたC2C12 (siNrf2群) とコントロール群と比較した。その結果より、コントロール群では、EPS処理後1時間でROS/RNSの生成量は、EPS処理前の値まで戻っていたのに対し、siNrf2群では、EPS処理後3時間後まで、ROS/RNS生成量が増加したままであった。コントロール群と比べても、siNrf2群のEPS処理後1、3時間後のROS/RNS生成量は有意に高値を示した。

次に、EPS刺激によるNrf2の活性化がROS/RNSによって、誘導されているのかを確認するため、抗酸化剤であるN-アセチルLシステイン (NAC) を添加したところ、EPS刺激によるNrf2の活性化とNrf2下流遺伝子の発現増加は認められなかった。また、NOに代表されるRNSの関与を観察するため、NO合成阻害剤であるL-NAMEの添加を行ったところ、L-NAMEによるEPS刺激後のNrf2の活性化とNrf2下流遺伝子の発現抑制は認められなかった。以上の実験により、EPS刺激による強制収縮は、C2C12筋管細胞のミトコンドリア活性を増加させ、Nrf2の活性化は、ミトコンドリアより生成されるスーパーオキシド等のROSの発現増加によって誘導されることを示唆した。

細胞内での過剰なROS生成は、アポトーシスを誘導することが知られる。そこで、siNrf2群とコントロール群との間での、EPS後のアポトーシスマーカー発現比較を行った。その結果、初期アポトーシスマーカーであるAnnexinの発現が、EPS刺激3時間後にsiNrf2群でコントロール群と比較して有意に高値であった。また、EPS後の骨格筋細胞の生存率をMTTアッセイ法により観察したところ、EPS刺激3時間後のsiNrf2群はコントロール群と比較して有意な生存率の低下を示した。

本研究結果は、C2C12筋管細胞の過度な収縮は、過剰なROS生成を引き起こし、Nrf2およびその下流遺伝子は、生成されたROSの消去に働くこと。そして、過剰なROS生成は筋管細胞の細胞死を誘導するが、Nrf2の活性化はROSの消去を行うことで、その反応に対して抑止的に働くことが示された。すなわち、Nrf2は骨格筋の過度な収縮に伴う酸化ストレスから、筋機能を維持するための組織保護的な役割を担っていることが示唆された。また、本研究で観察された、筋収縮時の過剰なROS生成は、ミトコンドリア由来であることが推測され、Nrf2が運動時の骨格筋のミトコンドリア機能に対しても保護的な機能を有している可能性を示唆した。今後においては、Nrf2の発現レベルを調節することで、肥満患者等の運動療法などに対して、既存の方法と比較し

て、より効率的な運動方法の確立が可能になるのではないかと期待する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- (1) Kawamoto T, Ishige K, Tomas M, Yamashita Y, Shu S, Ishikura N, Ariizumi S, Yamamoto M, Kurosaki K, Shoda J. Overexpression and gene amplification of EGFR, HER2, and HER3 in biliary tract carcinomas, and the possibility for therapy with the HER2-targeting antibody pertuzumab. *J Gastroenterol* 2015; 50: 467-479. (査読有)
- (2) Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective role of Nrf2 in electrical pulse stimulated C2C12 myotube. *PLoS One* 2015, 10. (査読有)
- (3) Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, Ikegawa Y, Irimura T, Yamamoto M, Nakanuma Y, Miyoshi E, Nakamori S, Nakanishi H, Viwatthanasittiphong C, Strivatanakul P, Miwa M, Shoda J, Narimatsu H.: Highly sensitive measurement of qualitative changes in glycosylation of mucin 1 for serodiagnosis of cholangiocarcinoma. *Anal Chem* 87:7274-81, 2015. (査読有)
- (4) Oh S, Tanaka K, Chiaki K, Tsujimoto T, So R, Shida T, Shoda J: Total Volume of Moderate-Vigorous Physical Activity a Week is an Important Factor Improving the Pathophysiology of Obesity-Related Liver Disease. *Hepatology* 61:1205-15, 2015. (査読有)
- (5) Suzuki H, Roa JC, Kawamoto T, Ishige K, Shoda J, Wistuba II, Li D, Thomas MB.: Expression of insulin-like growth factor receptor (IGFR) as a useful biomarker for predicting prognosis in biliary tract cancer patients. *Mol & Clin Oncol* 3:464-70, 2015. (査読有)
- (6) Yamaguchi T, Yokoyama Y, Ebata T, Matsuda A, Kuno A, Ikegawa Y, Narimatsu H, Shoda J, Nagino M. Verification of WFA-sialylated MUC1 as a sensitive biliary biomarker for human biliary tract cancer. *Anal Sug Oncol* 10: e0144835, 2015. (査読有)
- (7) Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Nakanuma Y, Kawakami Y. Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in biliary tract cancer cells. *Int J Hepatol* 2014, doi.org/10.1155/2014/584650 (査読有)
- (8) Oh S, Tanaka K, Tsujimoto T, So R, Eto M, Shoda J. Regular Exercise Coupled to Diet Regimen Accelerates Reduction of Hepatic Steatosis and Associated Pathological Conditions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolic Syndrome & Related Disorders* 12:290-98, 2014. (査読有)
- (9) Ito T, Kimura S, Seto K, Warabi E, Kawauchi Y, Shoda J, Tabuchi K, Yamagata K, Hasegawa S, Bukawa H, Ishii T, Yanagawa T.: Peroxidoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress. *J Dermatol Sci* 74:9-17, 2014. (査読有)
- (10) Miyahara N, Ishida H, Ueda T, Kawamoto T, Akimoto Y, Kawakami H, DiGiovanni J, Kiguchi K, Irimura T, Shoda J. Interaction of Muc4 and ErbB2 in a transgenic mouse model of gallbladder carcinoma: potential pathobiological implications. *Oncol Rep* 32:1796-1802, 2014. (査読有)
- (11) Onuki, K., Sugiyama, H., Ishige, K., Kawamoto, T., Ota, T., Ariizumi, S., Yamato, M., Kadota, S., Takeuchi, K., Ishikawa, A., Onodera, M., Onizawa, K., Yamamoto, M., Miyoshi, E., Shoda J.: Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol* 49:702-714, 2014. (査読有)
- (12) Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K: Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Report* 29:2147-53, 2013. (査読有)
- (13) Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow R, Mann G, Shoda J, Ishii T, Sakurai T: Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neuroscience* 33:14767-14777, 2013. (査読有)
- (14) Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J.: Exercise training decreases elevated serum ferritin and lipid peroxidation marker levels in middle-aged obese men with non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 45:2214-22, 2013. (査読有)
- (15) Matsuda A, Kuno A, Matsuzaki H, Kawamoto T, Shinkai T, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Ikegawa Y, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H: Glycoproteomics-based cancer marker discovery adopting dual enrichment with *Wisteria floribunda* agglutinin for high specific glyco-diagnosis of cholangiocarcinoma. *J Proteomics* 85:1-11, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Akiyama K, Warabi E, Okada K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J. *p62:Nrf2* double knockout mice develop steatohepatitis through the serum endotoxin overload. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (Tokyo) 2016.2.23.
- (2) 堀江正樹, 藤栄治, 小峰昇一, 正田純一: 持続的な骨格筋収縮時の酸化ストレス動態と抗酸化ストレス因子 Nrf2 の役割. 第 70 回日本体力医学会大会(和歌山県民文化会館, 和歌山) 2015.9.18.
- (3) 小峰昇一, 秋山健太郎, 堀江正樹, 藤栄治, 正田純一: 運動実践の継続は Kupffer 細胞の異物貪食能を増加させる. 第 70 回日本体力医学会大会(和歌山県民文化会館, 和歌山) 2015.9.19.
- (4) 小峰 昇一, 吳世昶, 志田隆史, 堀江正樹, 藤栄治, 正田純一: 転写因子 Nrf2 は高脂肪食による肝脂肪蓄積を抑止し, 運動実践は Nrf2 活性化を介して肝脂肪蓄積を改善する. 第 160 回日本体力医学会関東地方会(慈恵医大, 東京) 2014.3.8.
- (5) 小峰昇一, 藤 栄治, 吳 世昶, 堀江正樹, 岩脇隆夫, 正田純一: 運動による肝・骨格筋における Nrf2 活性化の解析. 第 69 回日本体力医学会大会(長崎大学, 長崎) 2014.9.20.
- (6) 堀江正樹, 小峰昇一, 蘇 リナ, 藤 栄治, 正田純一: 肥満予防を目的とした全身振動刺激の有用性の基礎的検討. 第 69 回日本体力医学会大会(長崎大学, 長崎) 2014.9.21.
- (7) Akiyama K, Ikeuchi M, Shoda J, Warabi E. *p62* and *Nrf2* deficiency is associated with progression of nonalcoholic steatohepatitis. The 17th biennial meeting of society for free radical research international (Kyoto) 2014.3.25.
- (8) Akiyama K, Warabi E, Okada K, Ikeuchi M, Kose K, Shoda J. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of steatohepatitis in mice. The Liver Meeting 2014 - AASLD, 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver (Boston) 2014.11.8.

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 正田純一: 胆汁酸とその分画 新・検査値のみかた 中外医学社(東京) 2 ページ, 2015.
- (2) Shoda J: Epidemiology and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. In: Hepatocellular Carcinoma. Ohkochi N, ed. NOVA Science Publishers, New York, 23 ページ, 2014.
- (3) 正田純一, 松田厚志, 久野 敦, 池原 譲,

成松 久, 大河内信弘, 山本雅一, 中沼安二: 肝内胆管癌の新規バイオマーカー Hepatology Practice 文光堂(東京), 3 ページ, 2014.

- (4) 正田純一: 生活習慣と胆道癌-胆管癌集団発症への対策も含めて Annual Review 消化器 2014 中外医学社(東京) 5 ページ, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正田 純一 (SHODA Junichi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241827

(2) 研究分担者

柳川 徹 (YANAGAWA Toru)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 10312852

酒井 俊 (SAKAI Syunn)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 30282362

藤 栄治 (WARABI Eiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 70396612