

令和 1 年 11 月 12 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 527

氏 名

吉原 利典

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: フロリダ大学 (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

エピジェネティクスで解く骨格筋萎縮制御機構

3. 派遣期間: 平成 29 年 10 月 13 日 ~ 令和 1 (平成 31) 年 10 月 12 日

4. 受入機関名及び部局名

フロリダ大学・Scott K. Powers

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

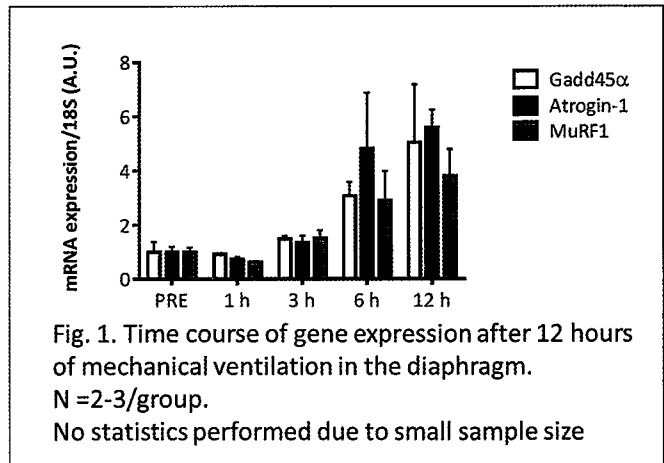
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

近年の精力的な研究の成果により、人工呼吸器の装着による機械的人工換気(controlled Mechanical Ventilation; CMV)に誘発される横隔膜の萎縮および収縮機能の低下(ventilator-induced diaphragmatic dysfunction; VIDD)には、活性酸素種(Reactive Oxygen species; ROS)の増加による酸化ストレスの亢進、ならびにそれによって活性化される筋タンパク質分解経路が密接に関与していることが明らかにされてきた。この ROS の増加が如何にして生じるかについては未だに議論の余地があるが、ミトコンドリアは筋萎縮時における主要な ROS の発生源として、VIDD およびその他の筋の廃用に関連した筋萎縮(廃用性筋萎縮)のメカニズムを探る上では重要なターゲット器官であると言える。すなわち、ミトコンドリア機能不全は VIDD および廃用性筋萎縮において非常に重要なトリガーの一つとなっている可能性が高いと考えられている(Powers et al., 2011)。このミトコンドリアの機能不全は、ラットやマウスなどの実験動物モデルのみならず、ヒトにおいても共通に認められる現象であることから、ミトコンドリアの機能不全を制御するメカニズムについて探求することは非常に意義があると考えられる。

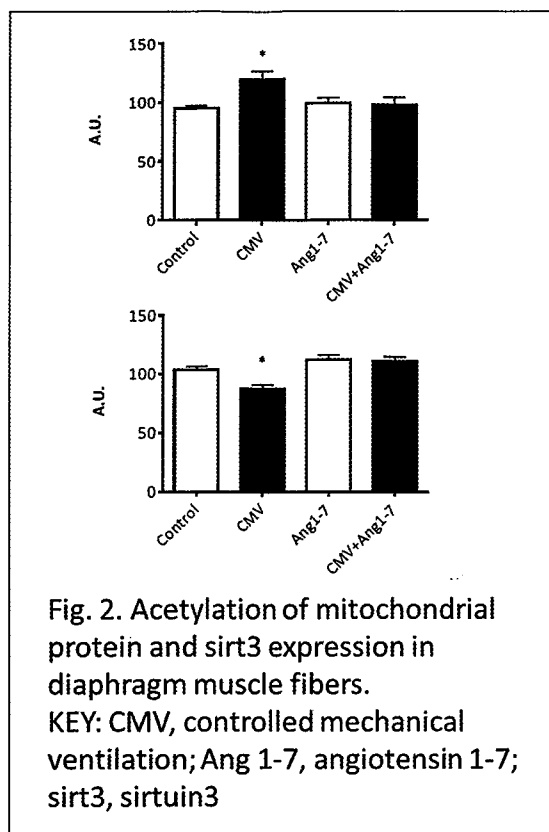
近年、骨格筋萎縮を調節する新たなメカニズムとして、生育環境や栄養などの環境要因によって DNA 配列の変化を伴わない後天的なゲノム修飾(DNA のメチル化やヒストンのアセチル化など)によるエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が注目されている。現在までに 10 日間のギプス固定により萎縮したラット腓腹筋の核内において、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC4 (histone deacetylase 4) 発現量およびその下流に位置する標的遺伝子として筋萎縮誘導に関わる Atrogin-1 および growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45- α (Gadd45 α) 発現量が増加することを明らかにしてきた。しかしながら、それらの因子が VIDD や CMV に誘導されるミトコンドリアの機能不全にどのように関わっているかについては不明のままである。本研究により、CMV に誘発される横隔膜の萎縮および収縮機能の低下を調節する新たなメカニズムとして、ヒストン修飾(アセチル化・メチル化など)やヒストン修飾酵素によるエピジェネティックな遺伝子発現調節機構とミトコンドリア機能不全の関係を明らかにできれば、VIDD を抑制するための新規分子ターゲットの同定や治療的なアプローチとして応用可能であると考えられる。

初年度までに、CMV に誘発される横隔膜の萎縮および収縮機能の低下に関わるエピジェネティクス制御因子を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析および CMV によって誘導される遺伝子発現の変化に着目して分析を行い、変動遺伝子の候補として、Atrogin-1 および MuRF1 のような筋萎縮に関連するマスターレギュレーター遺伝子の他に、ゲノムの安定性維持や DNA 修復、細胞の増殖抑制に関わる核タンパク質である Gadd45 α を見出した。また、それらの遺伝子の経時的な変化を明らかにするために CMV 開始 3、6、12 時間後の遺伝子発現レベルを評価したところ、Atrogin-1、MuRF1 および Gadd45 α 共に時間の経過に伴って増加することが確認された (図 1)。さらに、サンプルサイズを増やして CMV に関連する遺伝子発現量を分析した結果、HDAC4、Myogenin、Atrogin-1、MuRF1 および Gadd45 α の mRNA 発現量は CMV によってそれぞれ 2.3、3.8、9.7、10.8、23.4 倍に増加しており、いずれも $P < 0.01$ の高い水準で有意な差が認められた。これらのことから、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC4 やその下流で筋萎縮時に誘導される遺伝子の発現は、CMV に誘発される横隔膜の萎縮および収縮機能の低下に関わる重要な因子である可能性が高いと考えられる。



最終年度は、VIDD を抑制するための新規分子ターゲットとして G タンパク質共役受容体の一つである MAS 受容体に着目し、MAS 受容体を活性化させるためにリガンドであるアンジオテンシン 1-7 (Ang1-7) を静脈内へ 12 時間に渡って投与した。先行研究では、Ang1-7 の投与は筋萎縮過程における Akt/mTOR/p70S6K のようなタンパク質合成シグナルの低下や Atrogin-1 および MuRF1 を介したタンパク質分解を抑制することにより、CMV を始めギプス固定や筋ジストロフィー症に誘導される筋萎縮に抑制的に働くことが明らかにされているが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。また、ミトコンドリアの機能不全に対する抑制効果やその制御メカニズムについては明らかにされていない。

実験に先立ち Ang1-7 の投与濃度を決定するために予備的な検討を行った結果、150~300 $\mu\text{g/kg/h}$ へと投与する濃度を増加させると、濃度依存的に VIDD 抑制効果は高まり、その効果は 300 $\mu\text{g/kg/h}$ でおよそプラトーに達した。また、Ang1-7 の長時間投与による血圧の低下を考慮して、投与する濃度は 300 $\mu\text{g/kg/h}$ に決定した。投与する濃度を決定した後、成熟したラットを Control 群 ($n=11$)、CMV 群 ($n=11$)、Ang1-7 投与群 ($n=10$) および CMV+Ang1-7 投与群 ($n=10$) の 4 つの群に分け、CMV 後に横隔膜を摘出した。まずは、横隔膜の機能不全を評価するために、横隔膜の筋線維に沿ってストリップを作成し、細胞外における発揮張力の測定を行い、その後凍結・包埋した筋サンプルから凍結切片を作成することにより、筋線維タイプ毎の筋線維横断面積を評価した。横隔膜の機能不全に関して、横隔膜の発揮張力は 30~60Hz の周波数においてのみ抑制効果が認められ、部分的な抑制効果に留まった。一方、形態的な横隔膜筋線維の萎縮は全ての筋線維タイプ (タイプ I、IIa および IIb) において抑制され、Ang1-7 投与による有意な抑制効果が認められた。次に、摘出後の横隔膜からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアにおける活性酸素種 (ROS) の産生や Respiratory Control ratio を測定し、ミトコンドリアの機能不全について評価した。その結果、CMV 群ではミトコンドリアにおける ROS (H_2O_2) の産生は有意に増加したが、その増加は CMV+Ang1-7 投与群では抑制されていた。また、CMV 群の Respiratory Control ratio には有意な低下が認められたのに対し、CMV+Ang1-7 投与群ではその低下は認められず、Ang1-7 の投与によってミトコンドリアの機能不全は抑制されていた。そこで、Ang1-7 投与がミトコンドリアの機能不全を抑制したメカニズムを明らかにするために単離したミトコンドリアからミトコンドリアタンパク質を抽出し、ミトコンドリア内におけるヒストン脱アセチル化酵素である Sirtuin (Sirt) 3 の発現について分析を行った。Sirt3 は、ミトコンドリア由来の ROS の増加によって低下し、ミトコンドリアタンパクのアセチル化を誘導することでミトコンドリアの機能不全に関与すると考えられる。ミトコンドリア分画における Sirt3 発現量は、12 時間の CMV による有意な低下が認められた。それに対し、Ang1-7 投与群は Control



群と同等の Sirt3 発現量を示し、その低下は抑制されていた (図 2)。つまり、Ang1-7 の投与は、ミトコンドリア由来の ROS の産生を抑制することによって、CMV による SIRT3 発現量の低下を抑制し、ミトコンドリアタンパク質の過剰なアセチル化を防ぐことでミトコンドリアの機能不全を抑制したものと考えられる。このミトコンドリアにおける ROS 産生の抑制が、筋線維中の酸化ストレスの抑制に貢献していたのかを確認するために、筋原線維分画における酸化ストレス状態を評価した。筋原線維分画内の 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) 発現量およびユビキチン化タンパク質発現量は、CMV によって有意な増加が認められたが、Ang1-7 投与によってその増加は抑制されていた。さらに、初年度に遺伝子発現解析により見出した Atrogin-1 および MuRF1 のような筋萎縮に関連するマスターレギュレーター遺伝子についても、CMV 群では Control 群と比較して 10 倍程度の増加が認められたのに対し、Ang1-7 を投与した群ではその増加は有意に抑制されていた。以上のことから、CMV に対する Ang1-7 の投与は、ミトコンドリア内におけるヒストン脱アセチル化酵素である Sirt3 の発現低下を抑制することでミ

トコンドリアの機能不全を抑制し、結果として、筋線維内の酸化ストレスの亢進を抑えることによって、筋表現型の維持に貢献したと考えられる。

一方、これまでの先行研究では Akt の活性化を介した Atrogin-1 および MuRF1 の発現制御が Ang1-7 の投与を介した筋萎縮抑制効果の主要な制御メカニズムであると考えられてきたが、本研究では Akt のリン酸化率は CMV と比較して CMV+Ang1-7 投与群で 40%程度高い値を示したものの、そのレベルは Control 群または Ang1-7 投与群と比較すると 60%程度の低下が認められた。また、MuRF1 の調節因子として、p38 のリン酸化に着目して分析を行ったものの、有意な変化は認められず、Atrogin-1 および MuRF1 のような E3 リガーゼの詳細な制御メカニズムについては本研究では明らかではない。

また、横隔膜の収縮機能の低下に対しては、部分的な抑制効果しか認められなかった原因について、筋原線維の翻訳後修飾に着目し、筋原線維タンパク質におけるアセチル化の低下について分析を行ったが、有意な変化は観察されなかった。一方、先に述べた筋原線維タンパク質のユビキチン化は、Ang1-7 の投与群で有意な抑制は認められたものの、依然として Control 群と比較すると高いレベルであったことから、形態的には保存されているものの、ミオシンやアクチンに対するタンパク質のユビキチン化または他の翻訳後修飾により、収縮時のクロスブリッジの形成に影響を与え、100Hz 以上の高周波数においては十分な抑制効果が得られなかった可能性が考えられる。しかしながら、普段横隔膜が収縮する際には ~60Hz 程度の周波数に限定されるため、本研究の成果は、VIDD に対する十分な臨床応用性を含んだ結果であると考えられる。

さらに最終年度には、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子導入技術を用い、MAS 受容体の過剰発現、すなわち受容体発現量の増加自体が VIDD の抑制に与える影響についても検討を行った。アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus : AAV) ベクターは、増殖または非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の目的遺伝子発現が可能であることが知られている。また、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較して、免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも適しているため、最適なツールであると考えられる。派遣先の研究室では、ラット横隔膜への AAV9 ベクターの導入に関して先駆的な技術を持っており、既にエンブティベクターや AAV9 ベクターの導入が横隔膜の筋線維サイズや発揮張力にネガティブな影響を与えないことを報告している (Smuder et al., 2013)。さらに、これまでに派遣先研究室の rAAV9 を用いた研究にも参画し、ミトコンドリアに存在する抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 2 を過剰発現させることにより、CMV による発

揮張力の低下やミトコンドリアの脱共役およびミトコンドリアの過酸化水素排出量から評価したミトコンドリアの機能不全が抑制されることを示している（研究業績 11）。加えて、VIDD に関わるタンパク質分解系として知られるカルパインを抑制する働きを持つカルパスタチンを rAAV9 により遺伝子導入した結果、80～100% 程度のカルパスタチンの発現増加が認められ、カルパスタチンの発現増加が CMV による横隔膜の萎縮や発揮張力の低下、ミトコンドリアの機能不全を抑制するメカニズムとして、筋タンパク質の合成および関連するシグナル伝達物質が関与している可能性を見出した（研究業績 19）。しかしながら、本研究では予想に反して、MAS 受容体の発現増加そのものが CMV による横隔膜の萎縮や発揮張力の低下を抑制するというエビデンスは得られておらず、ミトコンドリアの機能不全を抑制するメカニズムとしては、リガンドである Ang1-7 を投与することによって生じる Ang1-7/MAS の活性化による Sirt3 の発現低下の抑制が関与している可能性が高いと考えられる。

また、国際共同研究の一環として、共同研究者とともに CMV による横隔膜の萎縮を含めた廃用性筋萎縮によるミトコンドリアの機能不全およびそのメカニズム、ならびにミトコンドリア機能不全が筋萎縮の進行過程において果たす役割についてまとめ、総説として *Archives of Biochemistry and Biophysics (Special Issue)* に掲載された（研究業績 12）。これは、ミトコンドリアの機能不全が廃用性筋萎縮において重要な役割を果たすという事象について、最新の知見および確かなエビデンスに基づきサマライズしたもので、本領域において重要な位置付けを担う総説であると考えられる。その他、派遣期間の 2 年間を通して、筋萎縮の進行およびその対抗策に関する論文および総説を計 10 篇執筆し、既に学術雑誌に受理されており（研究業績 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15）、研究成果の公表に関しても積極的に行っている。また、2018 年 5 月 29 日～6 月 3 日に参加した第 65 回アメリカスポーツ医学会（The 65th American College of Sports Medicine Annual Meeting）では、ラットの尾部懸垂モデルにおける骨格筋萎縮に関わるヒストン修飾因子に着目した研究成果の発表を行い、これまで得られている結果の解釈や新たな研究方法に関するディスカッションを展開することができた（研究業績 20）。

以上のように、派遣期間を通して所期の計画内容を遂行し妥当な研究結果を得ることができ、また国際学会誌に多くの成果を発表することができたことから、充実した 2 年間の研究生活を送ることができたと考えられる。今後も海外特別研究員として採用された自覚と責任を持ち、日々の研究活動に取り組むことで、国内・国外で活躍することのできる研究者へと成長していきたい。