

論文内容要旨

論文題目

骨格筋でのヘム欠乏はオートファジー不全を惹起する

責任講座：整形外科学講座

氏名：赤羽 武

【内容要旨】 (1, 200 字以内)

【緒言】 5-アミノレブリン酸合成酵素 1 (ALAS1) 遺伝子破壊マウスヘテロ接合体 (A1+/-マウス) は、加齢依存的なヘム欠乏を背景に骨格筋の形態変化 (空胞形成の増加やミトコンドリアの萎縮)、トレッドミル走行距離の低下を認めることが報告されている。一方、オートファジーは異常な細胞内小器官の処理に重要な役割を果たしており、加齢 A1+/-マウス骨格筋では異常ミトコンドリアの蓄積所見からオートファジー活性が低下している可能性がある。また、オートファジー不全はサルコペニアとの関連も報告されている。本研究では、A1+/-マウスがサルコペニア様の表現型を呈するか調査し、かつ加齢 A1+/-マウス骨格筋のオートファジー活性とその調節経路を解析することで、骨格筋オートファジーに対するヘム欠乏の影響を解明することを目的とした。

【方法】 A1+/-マウスの表現型解析のため、野生型マウス (WT 群) と A1+/-マウス (A1+/-群) の体重を 45-60 週齢、75-90 週齢時に測定し、75-90 週齢時には運動耐性解析のため Hanging wire test を行った。90-100 週齢時に腓腹筋を採取し重量を測定した。オートファジー解析には 30-40 週齢の WT 群と A1+/-群、2 週間以上ヘム生合成前駆体である 5-アミノレブリン酸 (ALA) の経口投与を行った A1+/-マウス (ALA 投与群) の大腿四頭筋をサンプルとして用いた。オートファジー関連蛋白のタンパク質発現量やリン酸化状態、mRNA 発現量を解析した。マウス骨格筋 C2C12 細胞 (コントロール株: CT 株、ALAS1 knockdown 株: A1KD 株) のオートファジーも評価した。

【結果】 45-60 週齢時、75-90 週齢時ともに体重は A1+/-群で有意に軽かった。Hanging wire test も A1+/-群で有意に低値であり、腓腹筋重量も A1+/-群で有意に軽かった。オートファジーマーカーである LC3 は、絶食条件下では A1+/-群で有意に総タンパク量、LC3-II 発現量が低下し、グルコース飢餓培養条件下の A1KD 株も同様であった。一方、自由摂食条件下の A1+/-群と非グルコース飢餓培養条件下の A1KD 株はタンパク発現量の有意な低下は認めなかった。しかし、オートファゴソームとリソソームの融合阻害薬であるクロロキンで処理した C2C12 細胞の評価では、A1KD 株で有意に総タンパク量と LC3-II 発現量が低下した。また、ALA 投与群や ALA 処理下 A1KD 株では LC3 タンパク量は増加した。オートファジー調節経路解析では、AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化体量が絶食および摂食条件下 A1+/-群で低下したのに対し、真核生物翻訳開始因子 (eIF) 2 α のリン酸化体量は、絶食条件下では低下したが摂食条件下では逆に増加した。また、グルコース飢餓培養条件下 A1KD 株において、AMPK 活性化剤である AICAR 処理下では総 LC3 タンパク量と LC3-II タンパク量が上昇したのに対し、eIF2 α リン酸化体を増加させる Salubrinal 処理では、有意な変化はなかった。

【考察】

本研究により、ヘム欠乏は栄養飢餓の有無に関わらず AMPK シグナルの低下によりオートファジー不全を骨格筋にもたらし、骨格筋形態変化やサルコペニア様変化を惹起することが示唆された。また、ALA 投与がオートファジー不全の改善を通じてサルコペニア病態を改善できる可能性がある。

令和4年 1月14日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：赤羽 武

論文題目：骨格筋でのヘム欠乏はオートファジー不全を惹起する

審査委員：主審査委員 後藤 薫

印

副審査委員 欠畑 誠治

印

副審査委員 内藤 輝

印

審査終了日：令和4年 1月13日

【 論文審査結果要旨 】

5-アミノレブリン酸合成酵素1 (ALAS1) はヘム合成の律速酵素である。ALAS1 遺伝子破壊マウスヘテロ接合体 (A1+/-マウス) は、加齢依存的にヘム欠乏状態となり、体重減少、骨格筋量減少および筋力低下などのサルコペニア様の症状を示す。本研究において赤羽氏は、A1+/-マウス骨格筋と ALAS1 ノックダウン細胞 (A1KD-C2C12 細胞) を用い、それらのオートファジー活性とその調節経路を分子生物学的な手法を用いて解析を行った。また、ヘム生合成前駆体である5-アミノレブリン酸 (ALA) の経口投与を行い、骨格筋におけるヘム欠乏とオートファジー活性調節機構の関連を検討した。オートファジー活性の指標として、LC3 タンパク質の発現解析を行った。

その結果、赤羽氏は、絶食条件下の A1+/-マウス群およびグルコース飢餓培養条件下の A1KD-C2C12 細胞において、LC3 総タンパク量と LC3-II タンパク量が低下することを明らかにし、ヘム欠乏状態の骨格筋細胞ではオートファジー活性が低下することを示した。また、ALA 投与の A1+/-マウス群や ALA 添加の A1KD-C2C12 細胞では、オートファジー活性が部分的に回復することから、ヘム欠乏状態を改善することにより、オートファジー活性が回復する可能性を示した。

次に、オートファジー調節シグナル経路の解析結果から、AMP 依存性リン酸化酵素 (AMPK) のリン酸化が、絶食および摂食条件での加齢 A1+/-マウス群、そして A1KD-C2C12 細胞でも低下することから、ヘム欠乏状態では、AMPK の活性化が抑制されていることを明らかにした。さらに、A1KD-C2C12 細胞を AMPK 活性化剤 AICAR で処理すると、オートファジー活性が上昇することを見出した。これらの結果から、ヘム欠乏骨格筋でのオートファジー不全は AMPK 活性化機構が抑制されていることにより惹起される可能性が示唆された。

これらの研究結果は、ヘム欠乏は、AMPK シグナルの低下によりオートファジー不全を骨格筋にもたらし、サルコペニア様の機能低下を惹起していること、また ALA 投与によりオートファジー活性が回復し、サルコペニア病態を改善できる可能性を示したものである。よって学位審査委員会は本研究が博士 (医学) の授与に値するものと判定した。