

研究結果報告書

平成 26 年 11 月 20 日

研究課題：サルコペニアにおける鉄／フェリチンの役割の解明

研究代表者名 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

薬理学分野・准教授 池田康将

共同代表者名 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

薬理学分野・教授 玉置俊晃

薬理学分野・助教 木平孝高

薬理学分野・助教 石澤有紀

【まとめ】

鉄と骨格筋萎縮の関連について検討した。マウスへの鉄負荷は、骨格筋萎縮を呈し、ユビキチンリガーゼ E3 atrogen-1 と MuRF1 遺伝子発現は上昇して、それらの制御経路 Akt-FOXO3 のリン酸化は低下していた。培養骨格筋細胞においても、鉄負荷は Akt-FOXO3 リン酸化を低下、atrogin-1, MuRF1 発現を増加して萎縮を引き起こしたが、FOXO3 siRNA 導入によって鉄による atrogen-1, MuRF1 発現増加と筋萎縮は抑制された。鉄は Akt-FOXO3-atrogen-1/MuRF1 を介して骨格筋萎縮に関与していることが示唆された。

1. 研究の目的

筋萎縮（サルコペニア）は、高齢者の運動機能をはじめとする全身機能の低下に関与する。我が国では今後さらに高齢化社会が進むため、サルコペニアの病態解明および筋肉量低下の抑制は高齢者の ADL・QOL の維持・改善につながる重要な課題である。

鉄は必須微量金属元素である一方で、Fenton/Haber-Weiss 反応を触媒して酸化ストレス産生に関与する。生体内鉄量は加齢に伴って上昇する。筋肉量と鉄量について動物モデルの検討では、老齢ラットでは若齢ラットよりも骨格筋鉄濃度が高値であり、筋肉鉄濃度と筋肉量は負の相関があること (Exp Gerontol. 2008)、廃用性萎縮骨格筋における組織鉄濃度が増加していること (Exp Gerontol. 2008)、筋萎縮における酸化ストレス増加は鉄キレート剤で抑制され、萎縮も軽減されること (Pflugers Arch. 1992)、鉄投与は骨格筋酸化ストレス増加と運動耐容能低下を引き起こすこと (Exp Physiol. 2009) など、骨格筋萎縮と鉄-酸化ストレスの連関が示唆されている。臨床的にも、老齢女性において、生体内鉄量の指標である血清フェリチン値と骨格筋量に負の相関がある (PlosOne 2014) と報告された。しかしながら加齢に伴う骨格筋鉄蓄積のメカニズムや鉄-骨格筋萎縮に関わる因子やその経路の詳細は未解明のままで

ある。

筋萎縮に関わる因子として、ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 や muscle ring finger protein-1 (MuRF1) に代表される atrogenes が注目されている。筋萎縮状態では筋肉タンパク分解が促進しており、Atrogin-1, MuRF1 がタンパク分解に関与することが知られている。よって筋肉への鉄蓄積は atrogenes 発現の増加につながり筋萎縮を引き起こす可能性が示唆され、鉄制御は筋萎縮抑制につながる可能性がある。本研究では、骨格筋萎縮における鉄の役割と分子機序について解析した。また鉄保持タンパクフェリチンの骨格筋萎縮への関与について調べた。

2. 研究の方法と経過

2-1. マウスを用いた鉄と骨格筋萎縮の検討
8週齢の雄性 C57BL6/J マウスを用いて、デキストラン鉄 (10mg/マウス/日) の連日投与群 (Fe 群) と等量の vehicle 投与群 (Veh 群) の 2 群で検討した。投与方法は腹腔内投与を用いた。骨格筋萎縮、atrogenes 遺伝子・タンパク質発現を調べた。

2-2. 鉄-筋萎縮の制御経路の解析

鉄-atrogenes 制御を詳細に検討するために培養骨格筋細胞 C2C12 を用いた。10%ウシ血清添加 DMEM で subconfluent になった後、2%ウマ血清添加 DMEM に変更、2日毎に交換して4日目に筋管状に分化していることを確認の後、実験に用いた。鉄は硫化鉄 FeSO_4 100 μM 、tempo 100 μM 、FOXO3a siRNA は Signal silence (cell signaling)、Lipofectamine RNAiMAX (Life Sciences) を使用した。

2-3. フェリチンと筋萎縮の関連についての検討

前述と同様、培養骨格筋細胞 C2C12 を筋管状に分化させたものを用いた。フェリチンタンパクは、ウマフェリチン (Sigma-Aldrich) でエンドトキシン除去を行い、LAL test で $<0.2\text{EU/ml}$ を確認したものを使用した。Ferritin heavy chain (H-ferritin) siRNA は Mission siRNA (Sigma-Aldrich)、発現プラスミドはヒト H-ferritin をクローニングし pF21A ベクターに組み込み、Lipofectamine2000 でトランスフェクションを行った。

3. 研究の成果

3-1. 鉄と骨格筋萎縮ならびにその経路の *in vivo* 検討

体重について、開始時には差を認めなかったが、2週間後は Fe 群で若干高値を示した。ELISA 法による血清フェリチン値測定ではフェリチンは3日目以降上昇がみられ、骨格筋鉄濃度についても3日目以降に増加していた。ウエスタンブロットによる骨格筋フェリチン発現も3日目以降に上昇する傾向が認められた。骨格筋重量について、1週間目において Fe 群の腓腹筋、ヒラメ筋、前頸骨筋は Veh 群と比較して低値を示した (表1)。

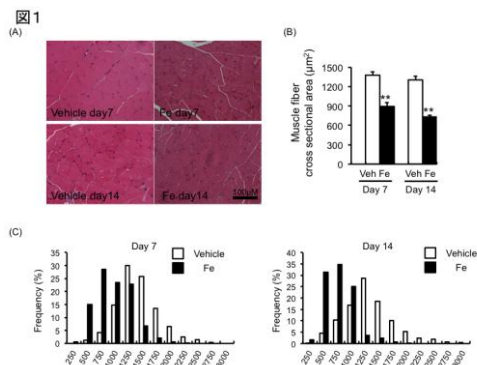
Table.1 Characteristics of Body weight and skeletal muscles weight

	Pre		7 days		14 days	
	Vehicle	Fe	Vehicle	Fe	Vehicle	Fe
Body weight (g)	22.4 ± 0.2	22.7 ± 0.2	23.3 ± 0.4	24.0 ± 0.4	23.3 ± 0.3	25.0 ± 0.4**
Gastrocnemius muscle (mg)	—	—	139.8 ± 3.0	125.1 ± 2.8**	135.9 ± 3.8	122.5 ± 1.8**
Soleus muscle (mg)	—	—	8.2 ± 0.2	6.3 ± 0.3**	8.3 ± 0.3	7.0 ± 0.2**
Tibialis anterior muscle (mg)	—	—	69.6 ± 3.5	64.1 ± 2.3	68.9 ± 3.6	58.1 ± 2.1*

Data are the mean ± SEM, n = 10-18, as indicated. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle treatment at the same time

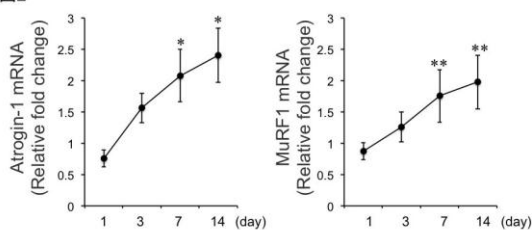
病理組織像における骨格筋線維断面面積の検討においては、重量と同様に1週間、2週間

ともに Fe 群で平均筋断面積の縮小が認められた。また骨格筋断面積分布は Fe 群で左方移



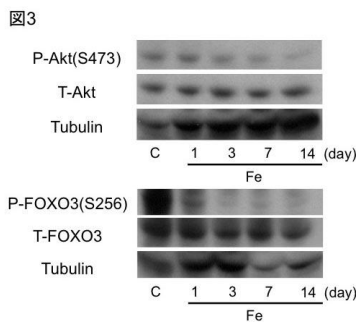
動しており、全体的に骨格筋線維径が縮小していることが確認できた (図 1)。

Fe 群では、全身の酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 排泄量の増加がみられ、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色による骨格筋局所の酸化ストレス評価では、Fe 群で骨格筋 DHE 輝度上昇が認められた。骨格筋萎縮に関わるユビキチンリガーゼ E3 の発現をリアルタイム PCR で検討した。Atrogin-1 と MuRF1 発現は Fe 群において 3 日目まで有意に増加しており、それは 1 週間目、2 週間目でも同様であった (図 2)



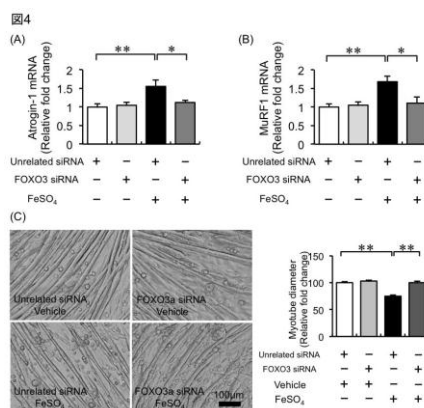
(図 2)。Atrogin-1 と MuRF1 発現の制御に関わる Akt と FOXO3 のリン酸化、発現についてウエスタンブロットで調べた。FOXO3 のリン酸化は Fe 群において 3 日目まで低下して 1 週間ではほぼ抑制されたが 2 週間目で回復した。FOXO3 タンパク発現には差がみられなかった。一方、Akt のリン酸化は Fe 群には 1 日目

増加するも 1 週間目では抑制され、Akt タンパク発現も 1 週間目で抑制を認めた (図 3)。

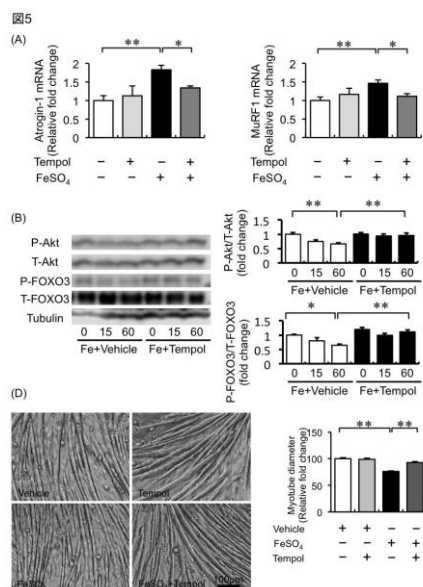


2-2. 鉄による筋萎縮制御機序の解析

C2C12 細胞を筋管状に分化させた後に鉄負荷を行ったところ、Atrogin-1, MuRF1 発現は Fe 負荷後 8 時間でピークを認めた。また Akt, FOXO3 のリン酸化は FeSO₄100µM 負荷後 60 分で抑制されていた。培養骨格筋の萎縮評価を行ったところ、Fe 負荷 48 時間後において、Fe 群は対照群と比較して骨格筋横径は約 75%に抑制されていた。鉄による atrogenin-1, MuRF1 発現増加に Akt-FOXO3 経路が関与しているかを調べるために FOXO3 siRNA を C2C12 細胞に導入して mRNA、タンパク質とも約 50%強抑制されることを確認の後、前述と同様に FeSO₄100µM による鉄負荷を行った。鉄負荷による atrogenin-1, MuRF1 発現の増加は、FOXO3 siRNA 導入によって抑制された。また鉄負荷によって誘発される骨格筋細胞萎縮も FOXO3 siRNA によって抑制された (図 4)。



また鉄による筋萎縮が酸化ストレスによるものかどうかを検討するために、Tempol を前処置後に鉄負荷を行った。Tempol 前処置により、鉄負荷による Akt-FOXO3 抑制、atrogenes 増加、筋萎縮は全て改善された (図 5)。



以上の結果から、骨格筋への鉄蓄積は骨格筋萎縮を誘発し、その機序として酸化ストレスによる Akt-FOXO3 経路抑制による atrogenes 発現増加が関与することが示唆された。

2-2. フェリチンと筋萎縮の関連

培養骨格筋細胞 C2C12 を筋管状に分化させた後、フェリチンで刺激した。フェリチン刺激後、1 時間では変化が見られなかったが、刺激後 4 時間、8 時間では atrogen-1 遺伝子発現は低下する傾向を認めた内因性フェリチンには H-ferritin (Fth), L-ferritin (Ftl) の 2 つのサブユニットがあるが、今回は ferroxidase 活性を有する Fth に焦点をあてた。siRNA による Fth 遺伝子ノックダウン、プラスミドによる遺伝子過剰発現では、atrogen-1 発現に変化はみられなかった。

4. 研究の課題

今回、鉄過剰モデルとして腹腔内鉄投与を用いたが、高鉄食を用いて、食餌性・慢性に生体内鉄量が増加する場合にも、Akt-FOXO3-atrogenes 経路を介した骨格筋萎縮を呈するかの検討が必要と思われる。またヒトでも生体内鉄量と骨格筋量に関連性があるかについて、臨床検体を用いての検討も考慮される。

フェリチンについて、培養細胞へのフェリチン刺激によって、atrogen-1 はむしろ低下傾向を示し、siRNA やプラスミド導入による Fth 発現の増減によっても atrogen-1 発現には変化がみられなかった。定常状態では変化がないため、機能解析には萎縮刺激を与えて行う必要があるかもしれない。In vivo 解析のための骨格筋特異的 Fth 欠損マウス作成は、マウス胚輸入手配に手間取り当初の計画より遅れているが、現在個体化中であり、今後、骨格筋特異的 Cre トランスジェニックマウスと掛け合わせて、骨格筋特異的 Fth 欠損マウスを作成し、in vivo での表現型解析の予定である。また Ftl についてもノックダウン、過剰発現を行い、in vitro 解析の予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部は、日本薬理学会第 87 回年会 (2014 年 3 月 20 日仙台)、日本鉄バイオサイエンス学会第 38 回学術集会 (2014 年 9 月 8 日仙台) にて報告した。また論文投稿の準備中である。

以上