

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 筋萎縮の病態に迫るミトコンドリアのメカノバイオロジー
(英語) Mitochondrial mechanobiology to unravel its role in muscular atrophy

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院生命科学研究科・教授・東谷 篤志
所属 役職 氏名： (英語) Higashitani Atsushi (Professor, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ミトコンドリアを中心としたメカノセンシング機構の研究
開発課題名： (英語) Mitochondria's roles in mechano-sensing

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院生命科学研究科・教授・東谷 篤志
所属 役職 氏名： (英語) Higashitani Atsushi (Professor, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

II. 成果の概要（総括研究報告）

筋肉を長時間使わない寝たきりや微小重力環境に長く滞在した宇宙飛行士には、廃用性筋萎縮が生じる。メカニカルストレス負荷の欠落が、廃用性筋萎縮の一つの原因として考えられているが、骨格筋においてメカニカルストレスの感知やそれに伴うシグナル伝達、そして、メカニカルストレスによる筋機能の維持の仕組みについて詳細は分かっていない。我々は、これまでの知見や我々自身の予備実験結果よりミトコンドリアが深く筋萎縮に関わっていると確信し、「メカニカルストレスは、ミトコンドリアー小胞体ー細胞骨格のオルガネラ・ネットワークにより筋機能制御シグナルに変換される」という仮説を持つに至った。本研究ではその仮説を検証し、ミトコンドリアを含むオルガネラ・ネットワークを制御することにより筋萎縮の予防・治療方法の新たな開発への道筋を探索する。具体的には、①ミトコンドリアを含むオルガネラ・ネットワークがメカノセンシングに関与していることを検証し、②メカノストレスに誘導されるミトコンドリア・シグナルが筋機能維持に働き、その欠如が筋萎縮を導くメカノトランスダクションの解明を目指す。

研究代表者である東北大学・東谷の研究グループでは、培養細胞・筋管モデル・線虫を用いて、ミトコンドリア・筋小胞体・細胞骨格から成るオルガネラ・ネットワークがメカノセンシングに関与していることを検証し、その仕組みを明らかにすることを目指している。本年度は、これまで培養細胞で得られてきた予備的な結果（メカニカルストレス負荷によるミトコンドリア・シグナルの誘導）の詳細な解析に取りかかった。また、筋細胞より形成誘導した筋管モデルにおいて、ミトコンドリアおよび接着構造の解析に着手した。線虫では、筋細胞ミトコンドリアとそれ由来のシグナルの可視化、および、メカニカルストレス負荷のための実験系の構築に取りかかった。

徳島大学・二川らの研究グループでは、メカニカルストレスがどのようなメカニズムでミトコンドリア・シグナルを誘導するのか、また、誘導されたミトコンドリア・シグナルがどのように筋機能の維持に寄与しているのかについて、遺伝子改変した培養筋細胞やマウスを用いて検討している。特に、ミトコンドリアと筋小胞体との相互作用に注目しており、今年度、その相互作用に対するメカニカルストレス変化の影響の解析、および、相互作用に関連する分子の遺伝子変異体の作出とその分子の構造解析に着手した。

久留米大学・石原らの研究グループでは、ミトコンドリア・ネットワークに注目し、その制御に関わる分子の遺伝子改変したマウスを利用し、メカニカルストレス依存的な筋萎縮／筋肥大とミトコンドリアとの関連を明らかにすることを目指している。今年度はこれまでに構築した筋萎縮モデルマウスの詳細な解析を進めている。

京都府立医科大学・佐藤らの研究グループでは、ミトコンドリアと筋小胞体の間、および、ミトコンドリア間の相互作用に注目し、ミトコンドリアと筋萎縮の関係解明を目指している。今年度は、関連分子の時期特異的な遺伝子欠損マウスの作出、および、ヒト培養筋細胞を用いた実験系の立ち上げに着手した。

Skeletal muscle is one of the most sensitive organs to human activity, and it is strongly influenced by the degree of physical activity. For example, disuse skeletal muscle atrophy can occur during extended durations of inactivity, including long periods of bed rest, or spaceflight; muscle hypertrophy can also be induced by physical training. Skeletal muscle is exposed to mechanical stress during its activities, and now it's been known that moderate mechanical stress plays an important role in maintaining muscle function. The ability of skeletal muscle to respond to mechanical stress suggests that skeletal muscle has mechanosensors that sense and convert mechanical signals into biochemical signals. However the details of those sensors or signals remain unclear.

Recently it has been reported that mitochondrial dysfunction causes various diseases including muscle atrophy. In addition, mitochondria have been demonstrated to activate several intracellular signaling pathways upon mechanical stress. Therefore, we hypothesize that mitochondria can feel and respond to mechanical stress as mechanosensors, and that mitochondrial responses against the excess or deficiency of mechanical stress may collapse skeletal muscle homeostasis. In this project, we try to verify our hypothesis and to investigate the mitochondrial signaling pathways that regulate skeletal muscle atrophy or hypertrophy.

(Higashitani's group) To examine if mitochondria can function as mechanosensors, we analyze mitochondrial responses (dynamics or signaling) induced by mechanical stress by using cultured animal cells, myotubes formed in myoblast cells, or the nematode *C. elegans*. This year we confirmed that in response to mechanical stress live cells could elevate mitochondrial Ca^{2+} concentration in a minute, suggesting that mitochondria may be mechanosensors. We also started to develop ways to observe mitochondrial signaling in myotube cells and in intact nematodes, or to apply mechanical forces on them under microscopic observation.

(Nikawa's group) We have investigated how mechanical stresses can induce mitochondrial responses, and how those responses can regulate muscle functions. In particular, we focus on the association of mitochondria with ER (or SR). This year we examined if mechanical stress could change the amount of mitochondria-ER association, and started to produce the mice with conditional mutation of the gene that encodes the molecule responsible for mitochondria-ER association. We also have a plan to analyze the structure of that gene product.

(Ishihara's group) To elucidate the role of mitochondria in mechanical stress signaling under progression of disuse muscle atrophy, we established and analyzed several mutant mouse lines in mitochondrial morphology. In this year, we analyzed muscle-specific knock-out mice of mitochondrial fission regulating factor Drp1, and found that the Drp1 gene silencing in muscle caused severe defects.

(Sato's group) To examine the role of inter-organelle and intra-organelle interaction (inter-mitochondria or mitochondria-ER) in skeletal muscle homeostasis, we have started gene-targeting experiments in mice or human primary muscle cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国際誌 1件）

1. Kenta Momma, Takashi Homma, Ruri Isaka, Surabhi Sudevan, Atsushi Higashitani
Heat-induced calcium leakage causes mitochondrial damage in *Caenorhabditis elegans*
body-wall muscles. *Genetics*, 2017 in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “Neuromuscular Signaling via TGF- β /DBL-1 Acts to Alter Body Physique in Response to Environmental Conditions” 口頭, Shunsuke Harada, Toko Hashizume, Kanako Nemoto, Zhenhua Shao, Nahoko Higashitani, Timothy Etheridge, Nathaniel J Szewczyk, Keiji Fukui, Akira Higashibata, Atsushi Higashitani, 11th Asian Microgravity Symposium (AMS2016), 2016/10/25-29, 国内
2. “Cellular Active Touch Sensing of Substrate Rigidity” ポスター, Kobayashi T, Sokabe M, 5th Nagoya Biomimetics International Symposium (NaBIS), 2016/10/20, 国内.
3. “Initial Step of Gravi-Sensing in Mesenchymal Stem Cells” 口頭, Kobayashi T, Sokabe M, the 13th Korea -Japan Joint Seminar on Space Environment Utilization Research, 2016/10/25, 国内.
4. “Loss of Rigidity Sensing of Mesenchymal Stem Cells under Microgravity” 口頭, Kobayashi T, Tanaka M, Hashizume T, Higashibata A, Yano S, Nikawa T, Sokabe M, 11th Asian Microgravity Symposium (AMS2016), 2016/10/25-29, 国内
5. 模擬微小重力環境においた間葉系幹細胞の YAP/TAZ の活性化抑制, ポスター, 小林 剛, 橋爪藤子, 田中瑞奈, 丸山昭洋, 東端 晃, 矢野幸子, 成瀬恵治, 二川 健, 曾我部正博, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.
6. ストレス線維の張力低下により誘導された接着斑解体におけるエンドサイトーシスの役割, ポスター, 田中瑞奈, 齋木貴博, 島本祐哉, 曾我部正博, 小林 剛, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「小さな宇宙飛行士線虫の冒険」 東谷篤志, 武蔵野市寄付講座 現代教養特講 宇宙進出の最前線 (亜細亜大学), 2016/10/19, 国内.
2. 「モデル生物 線虫の宇宙実験を通して」 東谷篤志, 仙台第三高校 出前授業, 2017/1/17, 国内.

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 筋萎縮の病態に迫るミトコンドリアのメカノバイオロジー
(英語) Mitochondrial mechanobiology to unravel its role in muscular atrophy

研究開発担当者 (日本語) 東北大学 大学院生命科学研究科・教授・東谷 篤志
所属 役職 氏名： (英語) Higashitani Atsushi (Professor, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 筋萎縮におけるミトコンドリア・メカノバイオロジー研究
開発課題名： (英語) A novel function of mitochondria as sensor for unloading stress toward muscle atrophy

研究開発分担者 (日本語) 徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授・二川 健
所属 役職 氏名： (英語) Takeshi Nikawa (Professor, Institute of Biomedical Science, Tokushima University Graduate School)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：東北大学大学院生命科学研究科 東谷 篤志 教授 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 7件）

1. Takeya M, Okumura Y, Nikawa T. Modulation of cutaneous extracellular collagen contraction by phosphorylation status of p130Cas. *J Physiol Sci*. 2016. in press
2. Sakashita Y, Uchida T, Nikawa T. Impacts of physical exercise on remodeling and hypertrophy of skeletal muscle. *Clin Calcium*. 2017, 27(1), 79-85.
3. Ikeda H, Souda H, Puspitasari A, Held KD, Hidema J, Nikawa T, Yoshida Y, Kanai T, Takahashi A. Development and performance evaluation of a three-dimensional clinostat synchronized heavy-ion irradiation system. *Life Sci Space Res*. 2017, 12, 51-60
4. Ju H, Kim T, Chung CM, Park J, Nikawa T, Park K, Choi I. Metabolic suppression by 3-iodothyronamine induced muscle cell atrophy via activation of FoxO-proteasome signaling and downregulation of Akt1-S6K signaling. *Biol Pharm Bull*. 2017, 40(5), 576-582.
5. Kishimoto H, Uchida T, Kitahata K, Nikawa T. Plasticity of skeletal muscle against unloading stress. *Clin Calcium*. 2017, 27(3), 351-356.
6. Abe T, Hirasaka K, Nikawa T. Involvement of Cbl-b-mediated macrophage inactivation in insulin resistance. *World J Diabetes*. 2017, 15(8), 97-103.
7. Sakai A, Hamada H, Hara K, Mori K, Uchida T, Mizuguchi T, Minaguchi J, Shima K, Kawashima S, Hamada Y, Nikawa T. Nutritional counseling regulates interdialytic weight gain and blood pressure in outpatients receiving maintenance hemodialysis. *J Med Invest*. 2017, 64(1-2), 129-135
8. Uchida T, Sakashita Y, Kitahata K, Yamashita Y, Kohno S, Hirasaka K, Ohno A, Nakao R, Higashitani A, Higashibata A, Ishioka N, Rudwill F, Kobayashi T, Okumura Y, Choi I, Oarada M, Mills EM, Teshima-Kondo S, Takeda S, Ishihara N, Tanaka E, Tanaka K, Sokabe M, Nikawa T. Unloading induces reactive oxygen species associated signal transduction toward atrophy in skeletal muscle cells. *Sci Signal* (under submission)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 寝たきりや無重力環境における筋蛋白質代謝とその制御による廃用性筋萎縮の治療法開発、口頭、二川健、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016/10/13、国内
2. Microgravity-induced signal transduction in skeletal muscle cells、口頭、Takeshi Nikawa、第13回日韓宇宙環境利用研究セミナー、2016/10/25、国内

3. Microgravity-induced signal transduction in skeletal muscle cells、口頭、Takayuki Uchida, Tomoki Abe, Ayako Maita, Reiko Nakao, Katsuya Hirasaka, Atsushi Higashitani, Takeshi Kobayashi, Masahiro Sokabe, Akira Higashibata, Takeshi Nikawa、11th Asian Microgravity Symposium、2016/10/26、国内
4. Effects of dietary soy protein on unloading mediated muscle atrophy、口頭、Takeshi Nikawa, Rie Hashimoto, Katsuya Hirasaka, Chiaki Yano, Kana Aibara, Takayuki Uchida, Tomoki Abe, Ayako Ohno(Maita), Kazuhito Akama、11th Asian Microgravity Symposium、2016/10/26、国内
5. Elucidation of the interaction between UCP3 and Hax-1、ポスター、Saki Tsugita, Katsuya Hirasaka, Marie Haruna, Edward M.Mills, Aki Bando, Tomoki Abe, Cory U. Lago, Sara M. Nowinski, Ken-ichi Akagi, Hidehito Tochio, Ayako Ohno, Shigetada-Teshima-Kondo, Yuushi Okumura, Takeshi Nikawa、11th Asian Microgravity Symposium、2016/10/26、国内
6. 廃用性筋萎縮原因酵素 Cbl-b と阻害ペプチド Cblin との相互作用様式の解明、口頭、小西明貴、真板綾子、真板宣夫、次田早希、安倍知紀、平坂勝也、奥村裕司、近藤茂忠、二川健、第 49 回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2016/11/12、国内
7. 坐骨神経切除による筋萎縮に対するホエイペプチドと大豆タンパク質の効果、口頭、二宮みゆき、高木麻理奈、井田くるみ、岸本ひかる、高津絵梨香、石田祐子、加藤健、越智ありさ、内田貴之、真板綾子、安倍知紀、近藤茂忠、中尾玲子、平坂勝也、二川健、第 49 回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2016/11/12、国内
8. Unloading 環境による筋萎縮とその栄養学的治療法、口頭、二川健、第 23 回アミノ酸セミナー：基礎と臨床を結ぶ会、2016/11/18、国内
9. II型膜貫通型セリンプロテアーゼ MSPL とペプチド性阻害剤との複合体結晶格解析、ポスター、真板綾子、真板宣夫、奥村裕司、永野ひかる、次田早希、有田恭平、田畑考統、平坂勝也、安倍知紀、近藤茂忠、二川健、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/12/2、国内
10. 骨格筋蛋白質代謝と骨格筋量調節、口頭、二川健、第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会、2017/1/15、国内
11. Prevention of muscle atrophy under microgravity through an activation of IGF-1 signaling pathway、口頭、Katsuya Hirasaka, Akinori Yamada, Takayuki Uchida, Shigeto Taniyama, Katsuyasu Tachibana, Akira Higasibata, Takeshi Nikawa、11th Asian Microgravity Symposium、2016/10/26、北海道札幌市。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
特になし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名 : (日本語) 筋萎縮の病態に迫るミトコンドリアのメカノバイオロジー
(英語) Mitochondrial mechanobiology to unravel its role in muscular atrophy

研究開発担当者 (日本語) 東北大学生命科学研究科 教授 東谷篤志
所属 役職 氏名 : (英語) Higashitani Atsushi (Professor, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

実施期間 : 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) マウス骨格筋のミトコンドリア・ネットワーク動態とその制御に関する研究
開発課題名 : (英語) Analysis of dynamics and regulation of mitochondrial network in mice skeletal muscle.

研究開発分担者 (日本語) 久留米大学 分子生命科学研究所 教授 石原直忠
所属 役職 氏名 : (英語) Naotada Ishihara (Professor, Institute of Life Science, Kurume University)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：東北大学大学院生命科学研究科 東谷 篤志 教授 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 4件）

1. N. Ishihara, M. Maeda, T. Ban, and K. Mihara. Cell-free mitochondrial fusion assay detected by specific protease reaction revealed Ca^{2+} as regulator of mitofusin-dependent mitochondrial fusion. *J. Biochem.* (in press)
2. H. Tamada, S. Kiryu-Seo, H. Hosokawa, K. Ohta, N. Ishihara, M. Nomura, K. Mihara, K. Nakamura, H. Kiyama Three-dimensional analysis of somatic mitochondrial dynamics in fission-deficient injured motor neurons using FIB/SEM. *J. Comp. Neurol.* (in press)
3. M. Ariyoshi, M. Katane, K. Hamase, Y. Miyoshi, M. Nakane, A. Hoshino, Y. Okawa, Y. Mita, S. Kaimoto, M. Uchihashi, K. Fukai, K. Ono, S. Tateishi, D. Hato, R. Yamanaka, S. Honda, Y. Fushimura, E. Iwai-Kanai, N. Ishihara, M. Mita, H. Homma, and S. Matoba. D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria. *Sci. Rep.* 2017, 7: 43911
4. N. Ishihara and K. Mihara. PARL paves the way to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2017, 19: 263-265
5. 伴 匡人、尾上 健太、石原 直忠、ミトコンドリア形態変化の生理的意義、*医学のあゆみ* 2017, 260: 18-23

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The importance of mitochondrial fission in preventing disease phenotypes induced by a pathogenic mtDNA mutation、ポスター、○K. Ishikawa, S. Katada, E. Ogasawara, Y. Homma, T. Ishihara, T. Mito, K. Mihara, J. Hayashi, N. Ishihara, K. Nakada、The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM], The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit]、October, 2016, Tokyo、国内
2. 障害ミトコンドリアの選別・浄化の分子機構の解析、口頭、○石原 直忠、オートファジー学会、2016年11月、新潟、国内
3. ミトコンドリアの膜とゲノムの協調的な形態制御、第39回日本分子生物学会、口頭、伴 匡人、石原 孝也、太田 あずさ、○石原 直忠、2016年12月、横浜、国内
4. 成長期の骨格筋における Drp1 の機能、ポスター、○一村 紋佳、石原 孝也、石原 直忠、第39回日本分子生物学会、2016年11月、横浜、国内

5. ミトコンドリアの膜と mtDNA のダイナミクスを制御する因子の探索、ポスター、○石原 孝也、石原 直忠、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月、横浜、国内
6. ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発症におけるミトコンドリア分裂の役割、ポスター、○本間 耀、堅田 俊、小笠原 絵美、石原 孝也、三藤 崇行、三原 勝芳、林 純一、石原 直忠、中田 和人、石川 香、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月、横浜、国内
7. ミトコンドリア病の多様な病態発症機構の理解に向けたアプローチ～核-ミトコンドリア間クロストーク～、ポスター、○石川 香、堅田 俊、小笠原 絵美、本間 耀、石原 孝也、三藤 崇行、三原 勝芳、林 純一、石原 直忠、中田 和人、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月、横浜、国内
8. 抗がん剤 aclarubicin の細胞毒性は SUMO・ユビキチン修飾と核およびミトコンドリアの制御破綻に由来する、ポスター、○飯星 悠、黒田 将吾、石原 孝也、石原 直忠、斉藤 寿仁、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 12 月、横浜、国内
9. ミトコンドリアの融合と分裂による動的な形態制御とその意義、口頭、○石原 直忠、阪大蛋白研セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」、2017 年 3 月、大阪、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 筋萎縮の病態に迫るミトコンドリアのメカノバイオロジー
(英語) Mitochondrial mechanobiology to unravel its role in muscular atrophy

研究開発担当者 (日本語) 東北大学・教授・東谷 篤志
所属 役職 氏名： (英語) Higashitani Atsushi (Professor, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 新規遺伝子改変筋細胞によるミトコンドリア・メカノバイオロジー研究
開発課題名： (英語) Mitochondrial mechanobiology with novel gene-mutated skeletal muscle cells

研究開発分担者 (日本語) 京都府立医科大学・特任助教・佐藤 貴彦
所属 役職 氏名： (英語) Takahiko Sato (Assistant Professor, Kyoto Prefectural University of Medicine)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：東北大学大学院生命科学研究科 東谷 篤志 教授 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. Higashioka K, Koizumi N, Sakurai H, Sotozono C, Sato T*. Myogenic differentiation from *MYOGENIN*-mutated human iPS cells by CRISPR/Cas9. *Stem Cells International*. 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト iPS 細胞を用いた骨格筋発生研究の一例、ポスター、東岡航基、小泉範子、佐藤貴彦、第6回同志社大学先端医工学研究センターシンポジウム、2017/4/15、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし