

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07404

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸鎖超複合体による代謝と活性酸素を介する疾患・寿命制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating of the effect of mitochondrial respiratory supercomplex-regulated metabolism and reactive oxygen species on disease/lifespan.

研究代表者

柴 祥子 (Shiba, Sachiko)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：70633824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成促進因子COX7RPの遺伝子改変マウスにおいて、一部の炎症関連マーカーの変動が認められた。また、生活習慣病と関連の深く、ミトコンドリアの形態や機能異常が認められる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)のラットモデルにおいて、食餌性亜硝酸塩は活性酸素種(ROS)産生シグナルを抑制し、病態を改善した。さらに、食餌由来のエICOSAPENTAENOIC ACID(EPA)は、ROS産生を亢進させ、前立腺がん細胞の生存率を低下させることを示した。以上より、生活習慣病、老化などにおけるミトコンドリア代謝、ROS制御と食餌性因子の密接な関連が示され、新しい予防法・治療法への応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアはエネルギー産生の主要な役割を担っている。一方で、酸化ストレスの原因となる活性酸素の主要な発生源にもなっており、加齢・老化や生活習慣病において重要な役割を担うと考えられている。本研究によって、生活習慣病、老化などにおけるミトコンドリア代謝、ROS制御と食餌性因子の密接な関連が示され、加齢・老化や生活習慣病等の病因解明と新たな予防・治療法への応用が期待され、社会的にもこれら疾患の改善や健康維持などに資すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the genetically modified mice with alteration of mitochondrial respiratory supercomplex-promoting factor, COX7RP, several inflammation-related markers were affected. In a rat model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) which is closely related to lifestyle-related diseases and exhibits morphological and functional alteration of mitochondria, nitrite administration improved the pathological phenotypes through suppression of reactive oxygen species (ROS)-generating signals. In addition, eicosapentaenoic acid (EPA) enhanced ROS production and reduced the viability in prostate cancer cells. These results implicate a close relationship between mitochondrial metabolism, ROS generation, and dietary factors in lifestyle-related diseases and aging, which may be useful for new preventive and therapeutic medicine.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア 遺伝子改変マウス 糖代謝 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンをはじめとする内分泌系は、生命活動や生体恒常性に重要である。近年、食の欧米化、身体活動量の低下によるエネルギー収支バランスの崩れに併せて内分泌作用の破綻が重なり、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧、動脈硬化、脂肪肝の発症を増加させ、加齢に伴ってこれら疾患の発症リスクを増加させると考えられている。加えて、加齢に伴って骨粗鬆症を罹患する割合が増加し、この発症の主要原因として男女ともに血中エストロゲン量の低下によることが示唆されている。このように女性ホルモンであるエストロゲンは様々な代謝系の調節に関与しているが、詳細な分子機構は明らかではない。ステロイドホルモンの一つであるエストロゲンはエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) に結合し、応答遺伝子の発現制御を介して生理的および病態生理的な作用を発揮するが、この作用メカニズムの解明を目指し、我々の研究室では以前より、エストロゲン応答遺伝子の同定・解析を行ってきた ()。そのなかでミトコンドリア内膜に局在するシトクローム *c* オキシダーゼ (COX; 複合体 IV) の COX7A サブユニットと高い相同性を有する cytochrome *c* oxidase subunit 7a-related polypeptide (COX7RP) に注目した。ミトコンドリアは、エネルギー産生に中心的な役割を担う細胞内小器官であり、その機能の破綻は、筋力低下や中枢神経症状を主とするミトコンドリア病や、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病、がん、老化などの様々な疾患に深く関わっている。我々は、エストロゲン応答遺伝子 COX7RP が、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御因子であることを解明しており ()、この COX7RP がエストロゲンと代謝系とを結ぶ鍵分子として注目している。これらの論文の中で、我々は COX7RP 遺伝子改変マウスの解析から、COX7RP は骨格筋の運動と褐色脂肪組織における熱産生に、また、肝臓における糖新生に関与し、エネルギー産生に重要な役割を担っていることを解明した。ミトコンドリアはエネルギー産生の主要な役割を担っている一方で、酸化ストレスの原因となる活性酸素種 (ROS) の主要な発生源にもなっており、加齢・老化や生活習慣病において重要な役割を担うと考えられている。このような研究背景の下、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成・機能と密接に関連する代謝制御や ROS 産生とその疾患・病態における役割の解明が望まれている。

2. 研究の目的

ミトコンドリアはエネルギー産生の主要な役割を担っている。一方で、酸化ストレスの原因となる ROS の主要な発生源にもなっており、加齢・老化や生活習慣病などの疾患において重要な役割を担うと考えられている。我々は、ミトコンドリアの電子伝達系を担う呼吸鎖複合体 (複合体 I、複合体 III、複合体 IV) の会合を促進し、さらに大きな超複合体 (I+III₂+IV、III₂+IV などの超複合体) の形成を促進する COX7RP の役割を解明し、呼吸反応を高めて効率的な ATP 産生を誘導すること、ならびに ROS の産生を抑制することを見出した。生体における COX7RP の作用として、骨格筋における持続運動、褐色脂肪における熱産生、肝臓における糖新生に関与することを明らかにしているが、生活習慣病や加齢・老化における役割は明らかになっていない ()。本研究では、COX7RP 遺伝子改変マウスの全身ならびに各種代謝における表現型とそのメカニズムを明らかにし、エネルギー制御、ROS 産生、ミトコンドリア代謝における作用を解析する。また、ミトコンドリアが主たる発生源である ROS の疾患・病態における作用について、*in vivo* ならびに *in vitro* の系を用いて解析し、ミトコンドリア代謝と疾患・病態・加齢との関係を解明することを目的とする。加えて、生活習慣による影響の解析として特に食餌性因子による代謝制御、ROS 産生制御について解析を行う。

3. 研究の方法

COX7RP 遺伝子改変マウスを長期に飼育し、全身、臓器の表現型解析を行った。COX7RP 遺伝子改変マウスより得た血液や組織サンプルを用いて、RNA やタンパク質を抽出し、定量的遺伝子発現解析 (qPCR) やウエスタンブロッティング法を用いて各種代謝、シグナル経路に関わる遺伝子発現量の解析を行った。ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成については、タンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま分子サイズに従って分離できる Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) 法にて検討した ()。自然発症高血圧症モデルの SHRSP5/Dmcr ラットを用い、高脂肪/高コレステロール食によって誘発される NASH モデルを作製し、この NASH モデルラットの血圧を測定し、肝臓および心臓の組織学的解析を行った ()。全ての動物実験は当該委員会の承認の下、実施した。

また、前立腺がん細胞株 PC3 細胞を用いて、n-3 多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) の 1 つであ

るエイコサペンタエン酸 (EPA) を添加し、細胞増殖、遊走、浸潤試験を行った。qPCR やウエスタンプロティング法を用いて各種代謝、シグナル経路に関わる遺伝子発現量の解析、ROS 産生量の測定を行った ()。

4 . 研究成果

我々が独自に作製した COX7RP 遺伝子改変マウスを用いて、生体における COX7RP の作用として、全身ならびに各種代謝における表現型とそのメカニズムを明らかにするため、血清マーカーや臓器レベルの遺伝子発現解析を行い、一部の炎症関連マーカーの変動が認められた。また、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成については、BN-PAGE 法にて検討した。

また、生活習慣病の病態として、飲酒やウイルス感染とは関係なく、肥満や糖尿病、高血圧症、脂質異常症などの影響で脂肪肝を呈する非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) に関して、なかでも肝組織で steatohepatitis を有し、肝硬変、肝細胞がんへ進行するリスクの高い非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) の実験動物モデルを用いて解析を行った。NASH の特徴の 1 つとして、ミトコンドリアの形態や機能の異常が観察されており、呼吸鎖の電子伝達系の障害によって ROS 産生が増加することが原因と考えられている。そこで、脳血管障害傾向の自然発症高血圧症モデルの SHRSP5/Dmcr ラットを用い、高脂肪/高コレステロール食によって誘発される NASH モデルを作製した。この NASH モデルラットに、最近、生体内で還元され一酸化窒素 (NO) の供給源としての役割を果たす可能性が注目されている硝酸塩/亜硝酸塩の 1 つである亜硝酸ナトリウムを飲水を介して投与し、食餌性亜硝酸塩の効果を検討したところ、食餌性亜硝酸塩は、高血圧 NASH モデルラットの血圧を低下させ、心臓重量、左心室肥大を抑制することを見出し、肝臓中の脂質蓄積量を減少させることが明らかになった ()。さらに、肝臓の炎症の評価として p47phox タンパク質発現量を免疫組織化学的に評価した結果、食餌性亜硝酸塩は高血圧 NASH モデルラットで炎症細胞を減少させることが認められた。p47phox タンパク質の発現は、活性酸素種 (ROS) の産生を誘発させ、炎症による細胞傷害・線維症、血管内皮機能障害を引き起こすため、硝酸塩/亜硝酸塩により、これらを抑制させるメカニズムを明らかにした。

また、食餌に由来する n-3 多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) の 1 つであるエイコサペンタエン酸 (EPA) は、心血管疾患に対して保護効果を発揮すると考えられているほか、がん細胞の増殖抑制効果が知られている。そこで、EPA の前立腺がん PC3 細胞における作用を解析したところ、EPA は用量依存的に前立腺がん PC3 細胞の生存率を低下させることが明らかになった ()。そのメカニズムとして、EPA は ROS の産生を亢進させることが示され、その効果は ROS 阻害剤により減少することによって確かめられた。一方で、EPA は proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) のリン酸化を抑制して、細胞増殖、遊走、浸潤を減少させるシグナル経路を明らかにした。

これらの結果より、生活習慣病、老化などにおけるミトコンドリア代謝、ROS 制御と食餌性因子の密接な関連が示され、新しい予防法・治療法への応用が期待された。

< 参考文献 >

Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun.* 270 (1), 1-10, 2000.

Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun.* 4, 2147, 2013.

Shiba S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Nakayama A, Tanaka T, Inoue S. Deficiency of COX7RP, a mitochondrial supercomplex assembly promoting factor, lowers blood glucose level in mice. *Sci Rep.* 7(1), 7606, 2017.

Sonoda K, Kono Y, Kitamori K, Ohtake K, Shiba S, Kasono K, Kobayashi J. Beneficial effects of dietary nitrite on a model of nonalcoholic steatohepatitis induced by high-fat/high-cholesterol diets in SHRSP5/Dmcr rats: A preliminary study. *Int J Mol Sci.* 23(6), 2931, 2022.

Oono K, Ohtake K, Watanabe C, Shiba S, Sekiya T, Kasono K. Contribution of Pyk2 pathway and reactive oxygen species (ROS) to the anti-cancer effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in PC3 prostate cancer cells. *Lipids Health Dis.* 19(1), 15, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunihiro Sonoda, Yuka Kono, Kazuya Kitamori, Kazuo Ohtake, Sachiko Shiba, Keizo Kasono, Jun Kobayashi	4. 巻 8:23(6)
2. 論文標題 Beneficial effects of dietary nitrite on a model of nonalcoholic steatohepatitis induced by high-fat/high-cholesterol diets in SHRSP5/Dmcr rats: A preliminary study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加園恵三、柴 祥子、大竹一男、加藤勇太	4. 巻 5巻 第12号 (通巻68号) 11月号
2. 論文標題 高齢者に不足しがちな微量栄養素の補充による認知機能低下予防効果の検討～亜鉛と認知症の関連～ (第2報)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 54-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sachiko Shiba, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Kotaro Azuma, Tomoka Hasegawa, Norio Amizuka, Tomoaki Tanaka, Toshihiko Takeiwa, Yasuaki Shibata, Takehiko Koji, Satoshi Inoue	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 Vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase in sertoli cells is essential for male fertility in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 404-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00404-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加園恵三、糸井郁美、本松 茂、柴 祥子、大竹一男、加藤勇太	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 高齢者に不足しがちな微量栄養素の補充による認知機能低下予防効果の検討 (第2報)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 60-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加園恵三、柴 祥子、大竹一男、加藤勇太	4. 巻 4 (通巻46)
2. 論文標題 高齢者に不足しがちな微量栄養素の補充による認知機能低下予防効果の検討～亜鉛と認知症の関連～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 櫛部静二、小林 悟、新井尚之、浜崎 景、野部浩司、竹之内康広、柴 祥子、大竹一男、白幡 晶、加園恵三	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 低酸素環境下トレーニングでの魚油濃縮物摂取によるヘモレオロジー的検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本脂質栄養学会	6. 最初と最後の頁 127-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加園恵三、糸井郁美、本松 茂、高村亜矢乃、柴 祥子、大竹一男、加藤勇太	4. 巻 22
2. 論文標題 高齢者に不足しがちな微量栄養素の補充による認知機能低下予防効果の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 67 - 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiichi Oono, Kazuo Ohtake, Chie Watanabe, Sachiko Shiba, Takashi Sekiya, Keizo Kasono	4. 巻 19
2. 論文標題 Contribution of Pyk2 pathway and reactive oxygen species (ROS) to the anti-cancer effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in PC3 prostate cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-019-1122-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加園恵三、柴 祥子、大竹一男、加藤勇太	4. 巻 52
2. 論文標題 高齢者に不足しがちな微量栄養素の補充による認知機能低下予防効果の検討～亜鉛と認知症の関連～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sachiko Shiba, Kazuhiro Ikeda, Takashi Suzuki, Daisuke Shintani, Koji Okamoto, Kuniko Horie-Inoue, Kosei Hasegawa, Satoshi Inoue	4. 巻 160
2. 論文標題 Hormonal regulation of patient-derived endometrial cancer stem-like cells generated by three-dimensional culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1895 - 1906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 東 浩太郎, 池田和博, 柴 祥子, 佐藤 航, 堀江公仁子, 田中伸哉, 井上 聡
2. 発表標題 エストロゲン応答遺伝子Ebag9欠損マウスにおける骨形成低下とオートファジー制御
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 浩太郎, 柴 祥子, 池田和博, 佐藤 航, 堀江公仁子, 田中伸哉, 井上 聡
2. 発表標題 エストロゲン応答遺伝子Ebag9欠損マウスにおける骨脆弱化とその分子メカニズム
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	池田 和博 (Ikeda Kazuhiro) (30343461)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------