

Nitration/dysfunction of myogenic stem
satellite cell activator HGF: the physiological
impact on age-related muscle atrophy with
impaired regeneration

アラ, マグジ, ハサニン, イルガバリ

<https://hdl.handle.net/2324/5068265>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

氏名	アラ マグジ ハサニン イルガバリ (Alaa Magdi Hassanein Elgaabari)		
論文名	Nitration/dysfunction of myogenic stem satellite cell activator HGF: the physiological impact on age-related muscle atrophy with impaired regeneration (筋幹細胞活性化因子 HGF のニトロ化による不活化：加齢性筋萎縮・再生不全に対する生理学的インパクト)		
論文調査委員	主査	九州大学	職名 教授 氏名 辰巳 隆一
	副査	九州大学	職名 准教授 氏名 鈴木 貴弘
	副査	九州大学	職名 准教授 氏名 中村 真子

論文審査の結果の要旨

加齢に伴い筋肥大・再生能が減弱し、筋細胞(筋線維)が徐々に萎縮することが知られている。また、筋が損傷した場合には再生不全が起こりやすく、結合組織や脂肪組織の浸潤も散見される。この加齢性筋萎縮・再生不全は生物学的加齢変化であるが、その程度が大きい場合には加齢性サルコペニアと呼ばれる疾病に至る。筋肉量が減少し筋力や身体機能が低下することから、生活の質の低下を招く大きなリスク要因となる。超高齢社会において、加齢性筋萎縮・再生不全を抑制し健康寿命を延伸することは喫緊の課題であるが、健康維持のための一般的な方策(栄養バランスに配慮した高タンパク質な食事や適度な運動)以外に有効策がないのが現状である。加齢に伴う諸現象に関わる遺伝子発現プロファイルの変化を誘導する上流因子、特に、細胞増殖因子を含めた細胞外微小環境の変化とその作用機構を明らかにし、これに基づいた抑制方法を構築することが強く求められている。本研究では、筋の維持・肥大・再生に必須な筋幹細胞に着目し、加齢性筋萎縮・再生不全を引き起こす翻訳後修飾機構を提起するに至った。その概略を以下に記す。

1) 筋幹細胞(衛星細胞)の活性化因子 HGF のニトロ化による不活化 (*in vitro* 実験)

運動や筋損傷に伴い筋幹細胞が物理刺激を受容すると、細胞外マトリックス(ECM)に結合・保持されている肝細胞増殖因子(HGF; α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体)が遊離し、細胞膜受容体 c-met に結合する。これにより休止状態の筋幹細胞は活性化し増殖を開始する。従って、HGF 依存的な筋幹細胞の活性化は筋肥大・再生の最初の必須なステップと言える。本研究では、加齢に伴い ECM に存在する HGF がニトロ化され生理活性を失うと洞察し、この作業仮説を先ず *in vitro* で検証した。ニトロ化とは、芳香族アミノ酸(主にチロシン残基)の側鎖にニトロ基(-NO₂)が導入される翻訳後化学修飾であり、ニトロシル基(-NO)が導入されるニトロシル化(ニトロソ化)とは異なる。生体内においては、NO ラジカルと活性酸素ラジカルの反応により速やかに生成するペルオキシナイトライト(ONOO⁻: 過亜硝酸イオン)によって非酵素的にニトロ化が起こることが知られている。pH 7.2、37°Cの生理的条件下でマウスリコンビナント HGF 標品にペルオキシナイトライトを添加すると、チロシン残基のニトロ化を示す 3-ニトロチロシンが ECL- Western blotting により検出された。この HGF のニトロ化は、i) c-met 結合ドメインを含む α 鎖で起こること、ii) ペルオキシナイトライトの対 HGF モル比の上昇に伴い亢進すること、iii) pH 7.4 で極大となる顕著な pH 依存性を有すること、iv) ペルオキシナイトライト添加後数秒以内に完了すること、v) SIN-1(生体内を模倣する目的で、NO ラジカルと活性酸素ラジカルを生成しペルオキシナイトライトを徐々に産生するよう設計された化合物)の添加によっても起きることを明らかにした。また、HGF がニトロ化されると受容体 c-met に結合できな

くなり衛星細胞を活性化する生理活性を失うことを、固相化 c-met に対する ELISA 様結合アッセイおよび衛星細胞の初代培養系でのプロモデオキシウリジン取り込みアッセイにより明らかにした。筋肥大・再生に關与する他の重要な細胞増殖因子 (FGF2、IGF1、TGF- β 3) ではペルオキシナイトライトによるニトロ化は認められなかったことから、HGF のチロシン残基のニトロ化による不活化は特異な生理学的意義を持つと洞察された。

2) HGF のニトロ化・不活化の加齢性筋萎縮・再生不全への関与 (*in vivo* 実験)

加齢に伴い ECM に結合・保持されている HGF のニトロ化・不活化が進行するかどうかを検証するため、ニトロ化 HGF を特異的に認識するモノクローナル抗体の作出を試みた。HGF の α 鎖のどのチロシン残基 (Y: マウスでは計 22 残基) がニトロ化修飾を受けるのか不明であったため、抗原設計にあたり側鎖の露出面積 (ASA 値: Accessible Surface Area) を指標として Y198 と Y250 を選択し、それらのニトロ化体を含む約 10 残基の合成ペプチドをそれぞれ調製した。腸骨リンパ節法によりラットを免疫し得られた B 細胞のスクリーニングとクローニングを経て、2 種のハイブリドーマの作出に成功した。産生抗体の特異性をニトロ化・非ニトロ化合成ペプチド (抗原) およびニトロ化・非ニトロ化 HGF の ELISA と Western blotting により確認した。

これらの蛍光標識抗体を用いて、若齢期 (2 か月齢)・成熟期 (10 か月齢)・老齢期 (20 か月齢) の S. D. 系雄性ラットの後肢下腿部筋を蛍光免疫染色した ($n = 3$ 個体/月齢群)。その結果、加齢に伴い ECM に保持されている HGF のニトロ化を示す蛍光強度が顕著に増加することがはじめて可視化された。また、HGF のニトロ化は筋線維型と強い関連性があることを抗 myosin 重鎖アイソフォーム抗体による多重染色により明らかにした。即ち、HGF のニトロ化が顕著に認められるのは速筋型 (II 型) 筋線維のうち IIx と IIa 型であり、IIb 型 (ヒトの筋では殆どない) と遅筋型 (I 型) 筋線維では HGF のニトロ化は殆ど検出されなかった。これらの知見は、速筋型筋線維が遅筋型に比べて萎縮しやすいというヒトの加齢性筋萎縮の特徴と符合した。

ECM に存在している HGF がニトロ化し生理活性を失うことは、物理刺激を受容しても筋幹細胞は活性化できず増殖から分化と休止化 (筋幹細胞の自己複製) に至る一連の細胞動態が阻害されることを意味する。その直接的な影響が加齢変化 (筋萎縮と再生不全、および筋幹細胞数の減少) として徐々に顕在化すると考えられた。この HGF に関する細胞外微小環境での翻訳語修飾はこれまでの「細胞老化 (説)」とは異質な先駆的知見であり、結合組織や脂肪組織の浸潤も含めた筋の加齢性変化の多くを明確に説明できることに本研究成果の学術的インパクトがある。今後、HGF のニトロ化・不活化抑制活性を有する生体内分子や機能性食品成分を見出すことができれば、筋の加齢性変化を積極的に予防・軽減する方策を見出せると期待される。

以上要するに本論文では、筋幹細胞活性化因子 HGF のニトロ化・不活化を見出し、これが加齢性筋萎縮・再生不全の新奇要因であることを提起した。従って、ヒトおよび愛玩動物の健康寿命の延伸を目指す健康科学や動物福祉科学、および家畜・家禽の産肉量と肉質を改善する食肉生産科学に寄与する価値ある業績と認める。よって、本論文は博士 (農学) の学位に値すると認める。