

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01755

研究課題名(和文)サルコペニアにおけるオートファジー機能不全の包括的解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of autophagy-dependent functional defect in sarcopenia

研究代表者

佐久間 邦弘 (Sakuma, Kunihiro)

東京工業大学・リベラルアーツ研究教育院・教授

研究者番号：60291176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニア(加齢性筋減弱症)において、オートファジーの機能不全が起こる。加齢筋と除神経筋のミトファジー(ミトコンドリアのオートファジー：Parkin)、シャペロン介在性オートファジー(Bag3)の変化を比較検討し、より短期間の簡便なサルコペニアのオートファジー機能不全モデルの開発を目指した。本研究の結果により、加齢筋で特徴的なオートファジー関連物質の変化は、除神経筋において部分的に再現できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近筋萎縮の分野で注目を浴びているのは、ノーベル医学生理学賞を受賞したオートファジー(自食)という機構である。高齢マウスの大腿四頭筋の筋線維において、オートファジー関連物質(p62)の免疫活性が異常に亢進していることを以前我々は証明した(Sakuma K et al., JCSM, 2016)。すなわちサルコペニア(加齢性筋減弱症)においてオートファジーの機能不全が認められるが、この現象の短期間モデルがこれまで開発できていなかった。本研究の結果から、加齢筋で特徴的なオートファジー機能不全は、除神経筋において部分的に再現できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy dysfunction occurs in sarcopenia (age-related myopathy). Using age-related and denervated muscles, we compared the manner of adaptive changes of mitophagy (mitochondrial autophagy: Parkin) and chaperone-mediated autophagy (Bag3) and aimed to develop a shorter, more convenient model of autophagy dysfunction in sarcopenia. Our result shows that the changes in autophagy-related modulation of ageing muscles occurs in the denervated muscles. It was found to be partially reproducible.

研究分野：運動生化学、運動生理学、細胞生物学

キーワード：オートファジー サルコペニア 骨格筋 ミトファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

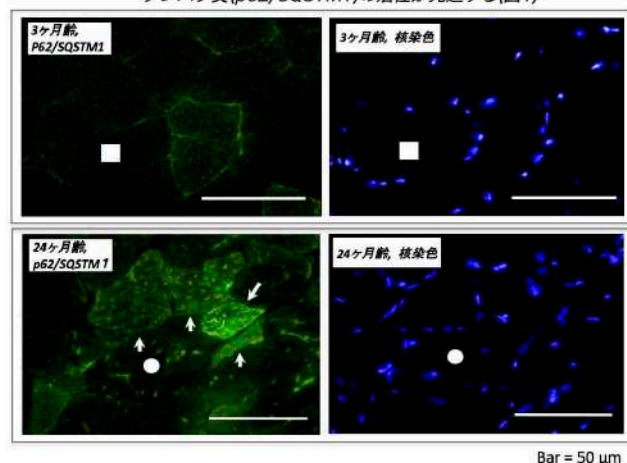
## 1. 研究開始当初の背景

ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するために、高齢化に関する研究が様々な分野で押し進められている。ゲートボールやジョギング、ストレッチといった適度な運動は、肩こりや肥満あるいは精神的ストレスを軽減してくれる。加齢にともなう筋力の著しい低下をサルコペニア(加齢性筋減弱症)という。超高齢化が進む我が国では、このサルコペニアをいかに食い止めるかが大変重要な課題である。

年を取ると個々の筋細胞が萎縮、脱落するために、筋力が著しく衰える。今まで普通に持ち上げることができたものでも、年齢を重ねるごとに上がらなくなってくる。この老化にともなう筋萎縮の理由の一つとして、骨格筋内で Serum response factor (筋分化因子)が減少することが挙げられる (Sakuma K et al., Biochimica Biophysica Acta Mol Basis Dis 1782: 453-461, 2008)。一方、様々な萎縮筋(除神経、後肢懸垂、筋固定)において亢進し、タンパク分解を促進する Atrogin-1 や FOXO (Forkhead box O)は、加齢筋において知見が安定していない (Sakuma K et al., Pflügers Archiv 467: 213-229, 2015)。Atrogin-1 や FOXO の増加を確認するすべての研究が、急性の筋萎縮モデル(早い時間での急激な変化)を採用している。したがってゆっくり萎縮が進行するサルコペニアの場合は、別の機構が調節している可能性が高い。

最近筋萎縮の分野で注目を浴びているのは、ノーベル医学・生理学賞を受賞したオートファジー(自食)という機構である。これには、代表的なタンパク分解系であるプロテアソーム-ユビキチン系ではなく、リソソームが関与している。数種類の筋変性疾患(筋ジストロフィー症など)や除神経、飢餓状態で筋萎縮が起こる場合に、オートファジーが重要な役割をすることが最近解明されてきた。また以前採択された科研費で、高齢マウスの大腿四頭筋の筋線維において、オートファジー関連物質 (p62 と Beclin-1)の免疫活性が非常に亢進していることを我々は証明した (図1, Sakuma K et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 7: 204-212, 2016)。

加齢筋(24ヶ月齢)では、オートファジー関連タンパク質(p62/SQSTM1)の活性が亢進する(図1)



マクロオートファジーを上流で調節する物質として AMPK [Adenosine monophosphate (AMP)-activated kinase]、SIRT1 (Sirtuin1)、ULK1 (UNC-51-like kinase)が挙げられる。加齢筋における p62 と Beclin-1 の異常発現亢進は、どの物質によって調節されているのか、これらのオートファジー上流物質の発現様相

は p62 や Beclin-1 のものと一致するのかどうか非常に興味深い。特に AMPK の筋特異的な遺伝子欠損マウスは、p62 の筋細胞内沈着を誘導し、サルコペニアを軽減する可能性がある (Bujak AL, et al., Cell Metab 21: 883-890)。通常のサルコペニア時にも、AMPK の発現減少が p62 の発現増強に結びつく可能性が十分に考えられる。

オートファジーの一種で、ミトコンドリアを選択的に分解する機構をマイトファジーといい、機能不全になったミトコンドリアを分解する。除神経を施すことで筋萎縮が起こる場合に、このマイトファジーがやはり活性化するようである。我々の先行研究で観察された加齢筋細胞質内の p62/SQSTM1 の発現は、ミトコンドリア内の沈着に由来する可能性がある。加齢性筋減弱症にマイトファジーが関与するのではないかという仮説が、最近登場してきている (Romanello V and Sandri M, Front Physiol 6: Article 422, 2016)。しかしながら加齢筋において、マイトファジーの変化を体系的に調べた論文は見当たらない。一方、シャペロンが異常蛋白質に結合し、液胞やリソソームに取り込んで分解する機構は、シャペロン介在性オートファジーといわれる。これまで骨格筋を用いた大部分の研究は、マクロオートファジーに関するものである。非常に興味深いことに、この機構は力学的負荷によって調節されるので、筋収縮 (運動) の影響を受けるようだ (Ulbricht A, et al. Autophagy 11: 538-546, 2015)。加齢にともなう不活動がサルコペニアをもたらす一因であるので、シャペロン介在性オートファジーにも加齢の影響が見られる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、科学研究費の交付期間内に以下の3つについて検証する。

- 1) 骨格筋内におけるマクロオートファジー調節因子 (AMPK, SIRT1, ULK1 etc) の加齢にともなう変化を詳細に調べる。
- 2) 通常に加齢筋において、マイトファジーの変化を生化学的および形態学的に調べる。
- 3) 筋収縮の程度に依存するタイプのシャペロン介在性オートファジーの加齢筋における変化を詳細に調べる。

## 3. 研究の方法

### ◎2017年度

加齢筋におけるマクロオートファジー調節物質 (AMPK, SIRT1, ULK1) の分布様相をリアルタイムPCR、分画後のサンプルを用いたWestern blot、蛍光免疫組織染色で詳細に調べる。

1. 生後3ヶ月齢 (adult)、12ヶ月齢 (middle)、24ヶ月齢 (old) のC57Black/6J系雄マウスを実験に用いる。それぞれのマウスから、前脛骨筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋を摘出し、テフロン型ホモジナイザー (現有設備) と細胞分画キット (Calbiochem) により筋肉を細胞質 (cytosol)、核 (nucleus)、細胞膜、細胞骨格の4つの画分 (Fraction) に分離する。分画後の各Homogenate を蛋白定量した後、マクロオートファジー調節物質 (AMPK, SIRT1, ULK1) の蛋白量を解析する。
2. 生後3ヶ月齢と24ヶ月齢のマウス骨格筋から、凍結した7 $\mu$ mの組織切片を作成し蛍光免疫組織染色を行う。DAPI入りの蛍光退色防止封入剤により細胞内の核 (筋核、衛星細胞核) を同定し、AMPK (Santa Cruz, ヤギ)、SIRT1 (Santa Cruz, マウス)、

ULK1(Cell Signaling, ウサギ)に対する一次抗体には、それぞれ抗マウス-FITC、抗ウサギ-FITC、あるいは抗ヤギ-Rhodamineの二次抗体を反応させる。そのプレパラートを、蛍光顕微鏡解析システム (オリンパス DP70, 現有設備)により観察し、オートファジー調節物質の細胞内局在様相を若齢と加齢した筋で比較検討する。また加齢筋を用いて、発現亢進されたp62/SQSTM1の局在様相とこれらの上流物質の発現部位を比較検討する。

#### ◎2018年度

ミトコンドリアを選択的に分解する機構をマイトファジーといい、サルコペニアに関係する可能性がある。加齢筋におけるマイトファジー関連物質 (Parkin)発現量と、その細胞内発現様相を調べる。

1. 生後3ヶ月齢 (adult)、12ヶ月齢 (middle)、24ヶ月齢 (old)のC57Black/6J系雄マウスを実験に用いる。それぞれのマウスから、前脛骨筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋を摘出し、テフロン型ホモジナイザーと細胞分画キットにより、筋肉からミトコンドリア画分(Fraction)と細胞質のそれ以外の画分に分離する。分画後の各Homogenateを蛋白定量した後、Parkinの量的な変化を解析する。またこのParkinの筋細胞内発現様相を、オートファジー関連物質 (p62, Beclin-1)と比較検討する (方法には、蛍光免疫組織化学を使用)。
2. 筋収縮の程度に依存するタイプのシャペロン介在性オートファジーの加齢筋における変化を詳細に調べる。

これまで骨格筋を用いた大部分の研究は、マクロオートファジーに関するものである。非常に興味深いことに、シャペロン介在性オートファジーは力学的負荷によって調節されるので、筋収縮 (運動)の影響を受ける (Ulbricht A, et al. Autophagy 11: 538-546, 2015)。この機構の加齢筋における変化について詳細に検証する。生後3ヶ月齢 (adult)、12ヶ月齢 (middle)、24ヶ月齢 (old)のC57Black/6J系雄マウスを実験に用い、Western blot 法、蛍光免疫組織化学を行う。シャペロン介在性オートファジーで重要な3つの蛋白質 [FLNC (フィラミン C)、BAG3 (Bcl-2-associated athanogene)]について検証する予定である。

#### 4. 研究成果

(1)加齢筋における AMPK2 および SIRT1 の変化を調べた。大腿四頭筋の凍結横断切片 (8 $\mu$ m)を用いた蛍光免疫染色から、加齢筋における AMPK2 免疫活性亢進が認められたが、SIRT1 活性には加齢にともなう明らかな変化が認められなかった。AMPK2 の活性亢進の場所は複数の筋細胞内に認められたが、オートファジー関連物質 (p62/SQSTM1)の発現場所とはあまり一致していなかった。以上のことからサルコペニアによるオートファジー機能不全は、その上流物質である AMPK2 や SIRT1 には制御を受けていない可能性がある。

(2)大腿四頭筋の凍結切片を用いた蛍光免疫染色から、加齢筋における Parkin 免疫活性の亢進が認められ (図 2)、オートファジー関連物質である p62/SQSTM1 の発現箇所とかなり類似していた。しかしながら Parkin を発現する細胞に、別のオートファジー関連物質 (ULK1) の活性は認められなかった。また 同様なオートファジー機能不全をもたらす除神経後の筋萎縮モデルにおいても、ほぼ同じ細胞に Parkin (図 2)、p62/SQSTM1 の発現亢進が認められた。一方、Western blot による解析からも、Parkin タンパク質量は除神経により有意に増加し、加齢筋においても増加する傾向が認められた (図 3)。以上のことから、サルコペニアの筋ではミトファジーの有意な変化が認められ、除神経による筋萎縮モデルがサルコペニアの短期間モデルとなる可能性が示唆された。

図2 結果 Parkinの蛍光免疫組織染色

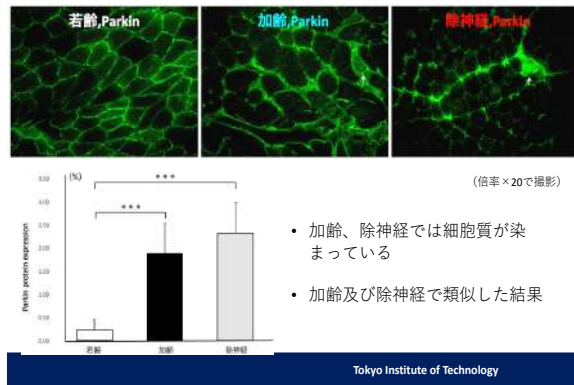
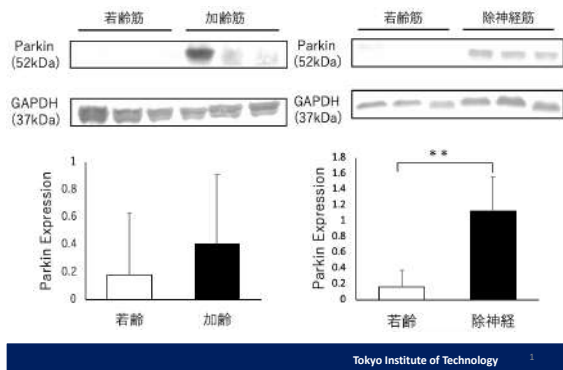
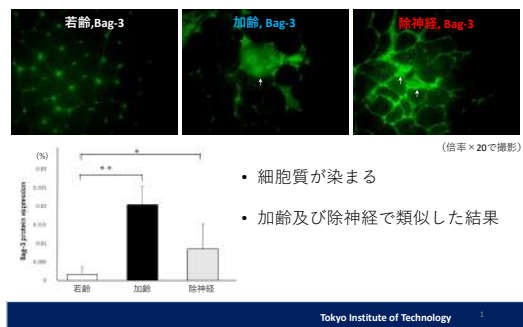


図3 結果 Parkinのウェスタンブロット



(3)本研究では、オートファジー機能不全を有する簡便な加齢筋モデルを作成するために、シャペロン介在性オートファジー関連物質 Bag-3 の変化を調べた。蛍光免疫染色から、Bag-3 については、加齢筋、除神経筋とも細胞質に発現の増加が認められたが、除神経筋においては有意な変化では無かった (図 4)。また若齢筋、加齢筋、除神経筋のいずれにおいても観察された Bag-3 免疫活性を有する核の割合は、各群間で有意な違いはみられなかった。加齢筋と除神経筋の、ミトファジー関連物質 Parkin の変化における類似性の昨年度の結果を踏まえると、加齢筋で特徴的なオートファジー関連物質の変化は、除神経筋において部分的な再現が可能であることが明らかになった。

図4 結果 Bag-3の蛍光免疫組織染色



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakuma K, Yamaguchi A	4. 巻 470
2. 論文標題 Recent advances in pharmacological, hormonal, nutritional intervention for sarcopenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv	6. 最初と最後の頁 449-460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-017-2077-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asami Y, Aizawa M, Kinoshita M, Ishikawa J, Sakuma K	4. 巻 15
2. 論文標題 Resveratrol attenuates denervation-induced muscle atrophy due to the blockade of atrogen-1 and p62 accumulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 628-637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijms.22723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 佐久間邦弘	4. 巻 1
2. 論文標題 サルコペニア発症の分子機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本サルコペニア・フレイル学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-22
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 Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A	4. 巻 469
2. 論文標題 Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv	6. 最初と最後の頁 573-591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-016-1933-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐久間邦弘	4. 巻 6
2. 論文標題 高齢者にアミノ酸の摂取は有効か	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 介護予防・健康づくり	6. 最初と最後の頁 47-48
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 Wataru Aoi, Hirano N, David G. Lassiter, Marie Bjornholm, Alexander V. Chibalin, Kunihiro Sakuma, Yuko Tanimura, Katsura Mizushima, Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Juleen R. Zierath, Anna Krook	4. 巻 33
2. 論文標題 Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) improves glucose tolerance via AMP-activated protein kinase activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 10551-10562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900453R	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 該当する

1. 著者名 佐久間邦弘	4. 巻 57
2. 論文標題 タンパク分解とサルコペニアの機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatric Medicine	6. 最初と最後の頁 775-779
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 Tabata S, Aizawa M, Kinoshita M, Ito Y, Kawamura Y, Takebe M, Pan W, Sakuma K	4. 巻 58
2. 論文標題 The influence of isoflavone for denervation-induced muscle atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 291-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00394-017-1593-x	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7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐久間邦弘.
2. 発表標題 オートファジー機能不全によるサルコペニア
3. 学会等名 第5回日本サルコペニアフレイル学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 サルコペニアのメカニズムとリハ栄養の可能性
3. 学会等名 第8回日本リハビリテーション栄養学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 シンポジウム3 専門外でもよくわかるサルコペニアの分子生物学・細胞生物学 "オートファジー機能不全によるサルコペニア"
3. 学会等名 第4回日本サルコペニア・フレイル学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 シンポジウム1 サルコペニア研究の基礎科学と臨床の間にあるもの. サルコペニアの発症メカニズム: オートファジー機能不全に着目して
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Kunihiro Sakuma
2. 発表標題 Autophagy-dependent Signaling in Sarcopenic Muscle
3. 学会等名 3rd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 加齢筋におけるオートファジー機能不全と肥満による影響
3. 学会等名 第6回日本サルコペニア・フレイル学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 サルコペニアの分子メカニズムとその軽減方法
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計8件

1. 著者名 Sakuma K, Yamaguchi A	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 624
3. 書名 Muscle Atrophy	

1. 著者名 Sakuma K	4. 発行年 2018年
2. 出版社 InTech Open	5. 総ページ数 358
3. 書名 Muscle Cell and Tissue: Current Status of Research Field	

1. 著者名 Kotomi S, Sakuma K	4. 発行年 2017年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 243
3. 書名 Frailty and Sarcopenia - Onset, Development and Clinical Challenges	

1. 著者名 Sakuma K, Aizawa M, Wakabayashi H, Yamaguchi A	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 292
3. 書名 The Plasticity of Skeletal Muscle-from Molecular Mechanism to Clinical Applications-	

1. 著者名 Iida Y, Sakuma K	4. 発行年 2017年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 168
3. 書名 Physical Disabilities- Therapeutic Implications	

1. 著者名 Kunihiro Sakuma, Hidetaka Wakabayashi, Akihiko Yamaguchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 432
3. 書名 Sarcopenia: Molecular, Cellular, and Nutritional Aspects, 1st Edition	

1. 著者名 Hidetaka Wakabayashi, Kunihiro Sakuma	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 432
3. 書名 Sarcopenia: Molecular, Cellular, and Nutritional Aspects, 1st Edition	

1. 著者名 Kunihiro Sakuma	4. 発行年 2019年
2. 出版社 InTech Open	5. 総ページ数 117
3. 書名 Muscular Dystrophies	

〔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
---------------------------	-----------------------	----