

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01771

研究課題名（和文）加齢性筋萎縮におけるアクアポリン4の関与の検討

研究課題名（英文）The involvement of aquaporin 4 in age-related muscular atrophy

研究代表者

石道 峰典（Ishido, Minenori）

大阪工業大学・工学部・講師

研究者番号：80737536

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）：健康寿命の延伸において、加齢性筋萎縮の予防は最優先課題の1つである。しかし、加齢性筋萎縮の発症メカニズムは十分に理解されていない。本研究では、骨格筋の水の貯蔵庫としての役割に着目し、高齢期骨格筋における水分子輸送体であるアクアポリン4（AQP4）の発現特性の変化を検討した。その結果、速筋、遅筋ともに加齢に伴う筋重量や水分含有率の低下とともにAQP4の発現量も低下することが明らかとなった。したがって、本研究では、加齢性筋萎縮の発症メカニズムの1つとしてAQP4の発現特性や機能特性の変化が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性筋萎縮の予防はQOLを高く維持していく上で重要となる。しかし、加齢性筋萎縮の発症メカニズムが十分に理解されておらず、予防法の確立に至っていないのが現状である。本研究結果は、加齢により筋重量や水分含有率が低下するとともに水分子輸送経路AQP4の発現量も低下することを明らかにした。本研究で得られた知見は、加齢性筋萎縮発症メカニズムにおける従来の筋原性・神経原性由来とは異なる経路が存在している可能性を強く示唆するものであり、骨格筋における水の保持の必要性という全く新しい着眼点による加齢性筋萎縮の発症メカニズムの解明や予防法の開発などに効果が波及していく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：For increase the human health span, the prevention of age-related muscle atrophy is a most important issue. But the pathogenic mechanism of age-related muscle atrophy has been poorly understood and a preventive method has not yet been established, until now. The present study investigated the changes of water transporter “aquaporin 4 (AQP4)” in aged skeletal muscles, focusing on the role of skeletal muscles as a reservoir of water. As a result, both skeletal muscle weight and muscle water content were significantly decreased in the aged fast- and slow- twitch skeletal muscles. Moreover, it was demonstrated that the AQP4 expression level was also significantly decreased in aged fast- and slow- twitch skeletal muscles. Therefore, in the present study, it was suggested that the changes of expression and function of AQP4 may be closely related to onset of age-related muscle atrophy.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 加齢性筋萎縮 AQP4

1. 研究開始当初の背景

(1) 体重の3%の水分が喪失するだけで体温調整能や運動機能の低下が生じるなど水分子は生体において最も重要な物質である。また細胞内の水分低下は、タンパク質合成能にも影響を及ぼす。骨格筋の水分子は、1) 筋細胞内の環境維持、2) 筋線維の形態維持、3) 加水分解酵素であるATPaseとともにATPを分解し筋収縮に必要なエネルギーをつくりだすなど、筋活動を維持する上で必要不可欠となる。骨格筋における水分子の主要な移動経路には、水チャネル“アキュアポリン4 (AQP4)”が働いている。さらにAQP4が難治性筋疾患である筋ジストロフィー発症に関与していることが明らかとなっている。一方、筋線維膜上の分布量や筋機能に対するAQP4の生理的役割については、未解明の課題が多く残されている。

(2) 近年、高齢期骨格筋の健全性保持が重要視されている。加齢による速筋での著しい筋萎縮は、転倒や移動能力の低下を誘発することから要介護リスクの因子となる。速筋は遅筋に比べAQP4分布量が多いことは知られており、速筋の選択的加齢性筋萎縮に関係すると考えるなら、AQP4と加齢性筋萎縮の関係性を明らかにすることは、健康寿命の延伸につながる可能性があると思われる。

2. 研究の目的

健康寿命の延伸において、加齢性筋萎縮の予防は最優先課題の1つである。しかし、加齢性筋萎縮や筋力低下の原因が不明瞭であり、日常活動量の増加以外に効果的な予防や改善法が確立できていない。一方で高齢期骨格筋の主たる特徴として、水分含有量の低下がある。細胞内の水分子はタンパク質合成能にも影響を及ぼすことから、水分子は筋線維の形態維持においても重要な役割を担っている。しかし、生体の骨格筋における生来的な水分子輸送路AQP4の制御メカニズムは十分に理解されておらず、高齢期骨格筋におけるAQP4の特性は不明瞭なままである。

そこで本研究では、骨格筋の水の貯蔵庫としての役割に着目し、「水分子輸送体であるAQP4が加齢性筋萎縮や筋力低下に関与している」との仮説を立て、加齢性筋萎縮におけるAQP4の発現や機能特性の検討を行った。さらに骨格筋における生来的なAQP4の制御メカニズムについても合わせて検討した。

3. 研究の方法

本研究はF344系ラットを用いた動物実験を実施した。本研究では、高齢期骨格筋におけるAQP4の発現特性の検討と、骨格筋におけるAQP4の制御メカニズムに関する検討を行った。

(1) 生体の骨格筋の萎縮がAQP4の発現特性に及ぼす影響

高齢期骨格筋の特徴の1つに筋萎縮がある。そこで筋萎縮がAQP4の発現変化に及ぼす影響について検討した。被験筋を前脛骨筋とした。除神経による筋萎縮は、右脚坐骨神経の部分切除により実現した。除神経2週間後に被験筋を摘出し、筋重量を測定した。

筋サンプルをRIPA bufferでホモジナイズし、上清を回収した。その後、各サンプルのタンパク質濃度を均一に調整した。筋サンプルをSDS-PAGE電気泳動で分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜への転写を行った。PVDF膜に対しブロッキング処理を行った後、各種一次抗体でインキュベーションした。その後、各種二次抗体でインキュベーションした。最後に、化学発光試薬を用いて標的タンパク質を可視化した。得られた画像からImageJ softwareを用いて、AQP4や関連タンパク質の発現量を定量化した。

また被験筋内の水分含有率は、 $[\text{筋湿重量}-\text{筋乾燥重量}]/\text{筋湿重量} \times 100$ の計算式より算出した。

(2) 支配運動神経の離脱と再支配がAQP4の発現特性に及ぼす影響

高齢期骨格筋では、運動神経の変性や消失が生じる。そこで、支配運動神経がAQP4の発現特性に及ぼす影響について検討した。被験筋を前脛骨筋とした。坐骨神経を凍結し、一過性の脱神経と再神経支配を誘発した。神経凍結後1、4週間目に被験筋を摘出し、筋重量を測定した。AQP4や関連タンパク質の発現量の変化は、SDS-PAGE電気泳動により筋タンパク質を分離した後、ウェスタンブロット法により、標的タンパク質を特異的に検出し、定量化することで検討した。

(3) 骨格筋の収縮活動の低下がAQP4の発現特性に及ぼす影響

高齢期骨格筋では、収縮活動の低下などの筋機能の低下が生じる。そこで、骨格筋の収縮活動の低下がAQP4の発現特性に及ぼす影響について検討した。被験筋は前脛骨筋とした。ラットの右脚下肢をキャストリングテープで固定することで骨格筋の収縮活動の低下を誘発した。2週間後に被験筋を摘出し、筋重量を測定した。AQP4や関連タンパク質の発現量の変化は、SDS-PAGE電気泳動により筋タンパク質を分離した後、ウェスタンブロット法により、標的タンパク質を特異的に検出し、定量化することで検討した。

(4) 加齢が骨格筋における AQP4 の発現特性に及ぼす影響について

高齢期と若齢期の骨格筋における AQP4 の発現特性の違いを直接比較することで、高齢期骨格筋の AQP4 の特性を顕在化させた。被験筋は前脛骨筋とヒラメ筋とした。高齢期および若齢期に被験筋を摘出し、筋重量および水分含有率を測定した。水分含有率は、 $[\text{筋湿重量} - \text{筋乾燥重量}] / \text{筋湿重量} \times 100$ の計算式より算出した。また AQP4 や関連タンパク質の発現量の変化は、SDS-PAGE 電気泳動により筋タンパク質を分離した後、ウェスタンブロット法により、標的タンパク質を特異的に検出し、定量化することで検討した。

4. 研究成果

(1) 生体の骨格筋の萎縮は AQP4 の発現量の低下をともなう

除神経により骨格筋の有意な萎縮が確認された ($p < 0.05$) (図1)。さらに除神経にさらされた骨格筋では、AQP4 の発現量が有意に低下することが明らかとなった ($p < 0.05$) (図2)。一方、骨格筋内の水分含有率については、除神経による筋萎縮の影響が生じないことが示された (表1)。これらのことから除神経による筋萎縮は、速筋における AQP4 の発現低下を誘発する可能性が示唆された。一方で、AQP4 の発現量の減少は、骨格筋内の水分貯蔵能には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

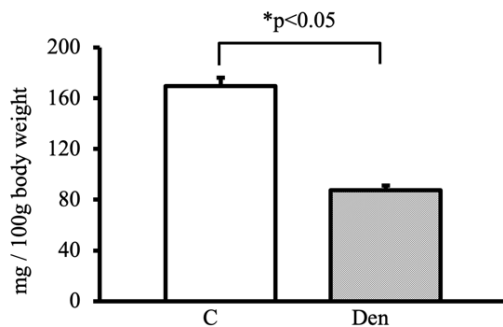


図1 神経支配の欠損による相対筋重量の変化
C: 対照群 Den: 除神経群

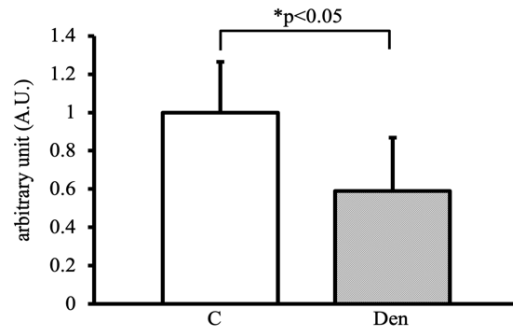


図2 神経支配の欠損によるAQP4の発現量の相対変化
C: 対照群 Den: 除神経群

表1 神経支配の欠損による水分含有率の変化

	C	Den
水分含有率(%)	73.75 ± 0.84	74.03 ± 1.49

C: 対照群. Den: 除神経群.

(2) 支配運動神経の状態が骨格筋の AQP4 の発現制御に関与している

神経凍結 1 週間後の脱神経期には、被験筋の萎縮による有意な筋重量の低下が認められた一方で、神経凍結 4 週間後の再神経支配期には筋重量の回復が認められた ($p < 0.05$) (図3)。一方、神経凍結 1 週間後の脱神経期には、AQP4 の発現量が有意に低下したのに対し、再神経支配期となる神経凍結 4 週間後には、AQP4 の発現量の回復が認められた ($p < 0.05$) (図4)。これらのことから脱神経期に減少した AQP4 の発現量が、再神経支配期には回復してきたことから、AQP4 の発現制御には運動ニューロン支配が関与している可能性が示唆された。

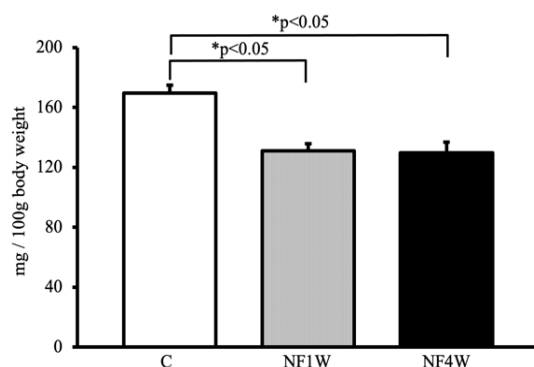


図3 再神経支配による相対筋重量の変化

C: 対照群 NF1W: 除神経群 NF4W: 再神経支配群

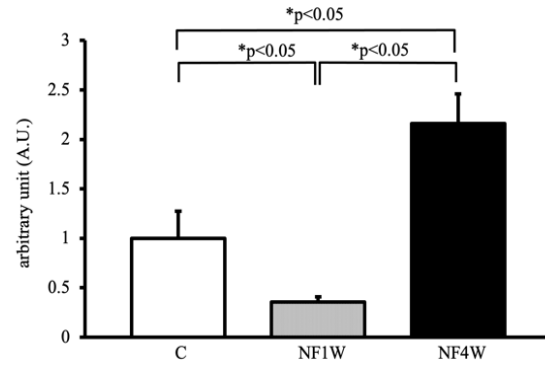


図4 再神経支配によるAQP4の発現量の相対変化

C: 対照群 NF1W: 除神経群 NF4W: 再神経支配群

(3) 骨格筋の収縮活動の低下は AQP4 の発現量の低下を誘発する

ギプス固定により骨格筋の収縮活動を著しく低下させた結果、有意な筋重量の低下が認められた ($p < 0.05$) (図5)。同様に AQP4 の発現量においてもギプス固定にさらされた骨格筋において有意な低下が認められた ($p < 0.05$) (図6)。これらのことから神経支配が維持された状態であっても、骨格筋の収縮活動が著しく抑制されることで AQP4 の発現量の低下が引き起こされたことから、骨格筋の運動量が AQP4 の発現制御因子の1つである可能性が示唆された。

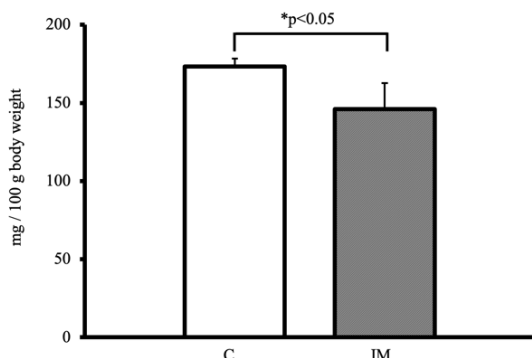


図5 収縮活動の制限による相対筋重量の変化

C: 対照群 IM: ギプス固定群

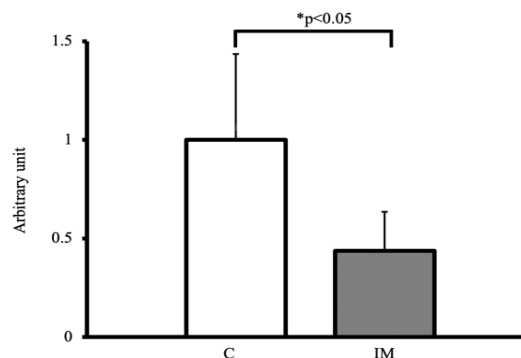


図6 収縮活動の制限による AQP4 の発現量の相対変化

C: 対照群 IM: ギプス固定群

(4) 加齢にともない骨格筋における AQP4 の発現量は低下する

若齢期に対し高齢期の前脛骨筋およびヒラメ筋において有意な筋重量の低下が認められた ($p < 0.05$)。骨格筋の水分含有率についても、筋重量同様に若齢期に対し高齢期の前脛骨筋およびヒラメ筋の両方において有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。さらに骨格筋における AQP4 の発現量についても、筋重量や水分含有率と同様に若齢期に対し高齢期において前脛骨筋、ヒラメ筋の両方で有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。これらの結果は、加齢に伴い骨格筋では、筋重量と水分含有率の低下とともに AQP4 の発現量の低下が引き起こされることを明らかにし、AQP4 を介した水分輸送能の低下が加齢性筋萎縮と密接に関与している可能性を示唆するものである。さらに、加齢による AQP4 の発現量の低下が前脛骨筋でもヒラメ筋でも確認されたことから、AQP4 を介した水分輸送能の低下は、速筋、遅筋に共通した加齢性筋萎縮誘発因子である可能性が示唆された。

以上のことより本研究結果は、加齢に伴う筋萎縮や水分含有率の低下に AQP4 の発現特性の変化が関与している可能性を強く示唆するものであり、本研究で得られた知見は、加齢性筋萎縮 (サルコペニア) の発症メカニズム解明の新機軸への波及効果をもたらす可能性が期待される。

さらに本研究では、AQP4 の発現制御には生来的に運動ニューロンの喪失や筋収縮活動の低下が密接に関与していることも明らかにしてきた。元々、高齢期骨格筋では、運動ニューロンの喪失や筋収縮活動の低下が生じる。したがって、加齢による「運動ニューロンの喪失」や「筋収縮活動の低下」をトリガーとした「AQP4 を介した水分輸送能の低下」が最終的に加齢性筋萎縮の発症を誘発している可能性が十分に考えられる。したがって、本研究により加齢性筋萎縮の発症メカニズムの解明や予防法の確立へと発展可能な有用性の高い知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 洪永豊, 石道峰典, 町田修一	4. 巻 41
2. 論文標題 閉経後の骨格筋における水分代謝とサルコペニア: 運動の予防効果の分子メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 デサントスポーツ科学	6. 最初と最後の頁 152-158
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Minenori Ishido, Tomohiro Nakamura	4. 巻 20
2. 論文標題 Time course changes in AQP4 expression patterns in progressive skeletal muscle atrophy during the early stage of denervation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions	6. 最初と最後の頁 114-120
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Minenori Ishido, Tomohiro Nakamura	4. 巻 39
2. 論文標題 The expression of aquaporin-4 is regulated based on innervation in skeletal muscles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-018-9494-z	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 Minenori Ishido, Tomohiro Nakamura	4. 巻 38
2. 論文標題 Marked decrease of aquaporin-4 protein is independent of the changes in 1-syntrophin and TRPV4 levels in response to denervation-induced muscle atrophy in vivo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-017-9471-y	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸澤義宗、浦野碧、石道峰典.
2. 発表標題 体内の水不足が骨格筋のAQP1とAQP4による水代謝に及ぼす影響について
3. 学会等名 第35回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦野碧、丸澤義宗、石道峰典
2. 発表標題 給水制限が心臓のAQP1とAQP4の発現量に及ぼす影響について
3. 学会等名 第35回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石道峰典
2. 発表標題 再神経支配が骨格筋でのAQP4発現に及ぼす経時的影響について
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yung-Li HUNG, Keigo OTA, Minenori ISHIDO, Shuichi MACHIDA
2. 発表標題 The effects of estrogen on muscle hypertrophy and muscular water homeostasis in skeletal muscle following resistance exercise
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川陸, 長田萌香, 石道峰典
2. 発表標題 過負荷による筋肥大におけるAQP1の変化について
3. 学会等名 第34回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長田萌香, 西川陸, 石道峰典
2. 発表標題 代償性筋肥大誘発時におけるAQP4とTRPV4の変化について
3. 学会等名 第34回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石道峰典, 中村友浩
2. 発表標題 一過性の脱神経と再神経支配がAQP4の発現に及ぼす影響について
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉門朋哉, 中村友浩, 石道峰典
2. 発表標題 ギプス固定による筋萎縮がアクアポリン4の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洪永豊, 中野大輝, 石道峰典, 張碩文, 町田修一
2. 発表標題 運動トレーニングによる筋肥大が骨格筋アクアポリンの発現特性に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉門朋哉, 中村友浩, 石道峰典
2. 発表標題 遅筋における除神経による筋萎縮がアクアポリン4の発現や水分含有率に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石道峰典, 中村友浩
2. 発表標題 除神経による筋萎縮が速筋におけるAQP4の発現に及ぼす影響について
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本将志, 石道峰典
2. 発表標題 除神経による筋萎縮におけるAQP1と内皮細胞接着分子の発現特性の変化
3. 学会等名 第33回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石道峰典, 中村友浩
2. 発表標題 過負荷による筋肥大がアクアポリン4の発現特性に及ぼす影響について
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉門朋哉, 石道峰典
2. 発表標題 長期間の除神経による筋萎縮がアクアポリン4と 1-syntrophinの発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 筋機能回復方法及びキット	発明者 石道峰典、五丁龍志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-143975	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 筋機能回復方法及びキット	発明者 石道峰典、五丁龍志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-143975	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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
---------	---------