

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700531

研究課題名（和文） 老齢性筋萎縮におけるオートファジーの誘導と運動刺激の効果

研究課題名（英文） The induction of autophagy and exercise effect in age-related muscle atrophy.

研究代表者

緒方 知徳（OGATA Tomonori）

早稲田大学・総合研究機構・助手

研究者番号：30434343

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、老化骨格筋におけるオートファジーの誘導とこれに関わるシグナルの解明を目的とした。その結果、筋萎縮が進行した老齢ラットでは変性タンパク質の蓄積に伴い惹起される小胞体ストレスシグナル活性化（Caspase-12 の発現増加を特徴とする）が確認された。しかしながら、オートファジーのマーカーである LC3-II は変化を示さなかった。また、成熟ラットへの運動トレーニングは、LC3-II の発現に大きな変化はもたらさないことも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study was to examine the induction and signal transduction of autophagy in age-related muscle atrophy. This study showed the activations of ER stress signal which induced by accumulation of denature protein, in aged-rat skeletal muscle. However, LC3-II, macroautophagy marker protein, was no change in aged muscle. On the other hand, prolonged exercise training was no effect on LC3-II expression level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：老齢性筋萎縮、オートファジー、小胞体ストレス、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

（1）老化に伴い、細胞内において変性したタンパク質や機能不全に陥った細胞器官が増加することが知られている。これが老齢性

筋萎縮につながる細胞死や筋機能の弱体化を招くことが推察されてきている。オートファジーは、生体が飢餓状態に陥った場合に細胞のタンパク質を分解しアミノ酸を供給す

ることでは知られているが、最近の研究では、オートファジーは変性タンパク質の除去や機能異常に陥ったミトコンドリアや小胞体といった細胞器官を除去する働きを持つことが明らかになってきている。細胞器官の異常は、アポトーシスの過剰な誘導をもたらし、細胞死を介した老化を促進させることが示されている (Paschen and Mengesdorf 2005, Pharmacol Ther)。これに関して、老化した骨格筋でも同様に形態異常や機能低下に陥ったミトコンドリアや核が増加するという報告 (Bota and Davies 2001; Bruusgaard et al. 2006) がある。このため、オートファジーの異常細胞器官の除去機能は骨格筋の老化の抑制 (アポトーシスの抑制) に深く関与することが示唆されるが、このことは未だ明確とはなっていない。そこで本研究では、老化に伴い萎縮した骨格筋内ではオートファジーの誘導機能が低下していることを仮説立てた。

2. 研究の目的

(1) 老化骨格筋の萎縮とオートファジー誘導レベルの関連性を明らかにすること。

(2) 老化骨格筋内におけるオートファジー関連シグナルの変化を検討すること。

(3) 運動トレーニングとオートファジー誘導の関連性を明らかにすること。

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) オートファジー誘導の検出方法の確立。オートファジーが誘導されるような条件下 (絶食) で、LC3-II のようなマクロオートファジーのマーカータンパク質が筋内で検出できるかどうかを検討した。

オートファジーの誘導には絶食モデルを

用い、ウェスタンブロットング法によって発現量を検討した。

(2) 老化骨格筋における変性タンパク質の増加およびオートファジー誘導と制御シグナル変化の検討。

実験には、6ヶ月齢の成熟ラットと26ヶ月齢の老齢ラットを用い、分析は前脛骨筋を用いて行った。変性タンパク質の増加は、小胞体ストレス経路の活性化の程度により評価した。また、オートファジー制御シグナルとしては、FOXO3a、mTOR の発現およびリン酸化状態を指標とし、ウェスタンブロットングにより発現量の評価を行った。

(3) 運動トレーニングがオートファジー誘導に及ぼす効果

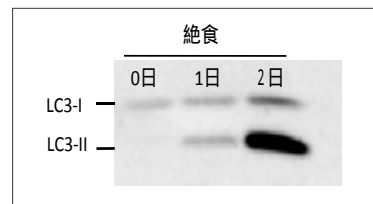
成熟ラットに対して8週間のトレッドミル走運動トレーニングを行い、LC3-II および FOXO3a、mTOR の発現とリン酸化を評価した。

4. 研究成果

(1) オートファジーの検出の確認

オートファジーの検出マーカーとして LC3-II が同定されているが、実際に絶食のような誘導刺激で変化を見せるかをウェスタンブロットングにより検討した。

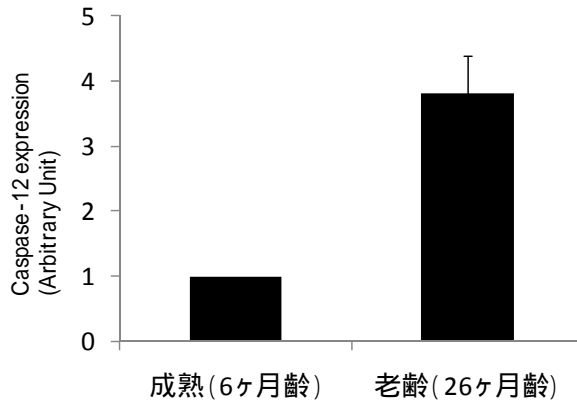
その結果、絶食時 (1~2日間の絶食) により LC3-II は、筋萎縮の程度に一致した発現増加を示した。これは、オートファジーの



図：絶食に伴うLC3の発現。LC3はオートファジー誘導を示す指標であり、LC3- がLC3- となることでオートファジー小胞が形成される。

マーカーとして、LC3-II が骨格筋でも有用であることを示すものであった。

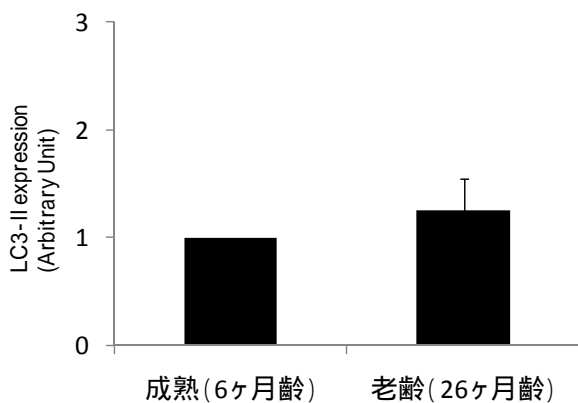
(2) 老化骨格筋への変性タンパク質の蓄積とオートファジー誘導



小胞体ストレスの活性化

筋萎縮が進行した老齢ラットでは変性タンパク質の蓄積に伴い惹起される小胞体ストレスシグナルの活性化が確認され、成熟ラット(6ヶ月齢)と比較して Caspase-12 の発現量が 3.8 ± 0.6 倍の増加していた(上図)。このことから、老化骨格筋において変性タンパク質の蓄積が顕著であることが示唆された。

しかしながら、オートファジーのマーカーである LC3-II は発現量の増加は、老化骨格筋では確認されなかった(下図)。また、オートファジーの誘導シグナルである FOXO3a も顕著な変化は示していなかった。



オートファジーの誘導(LC3-II)

(3) 運動トレーニングに対するオートファジーの誘導

長期間の運動がオートファジーの誘導に影響を与えるかどうかを検討するために、成熟ラットへの8週間のトレッドミルランニングを実施した。

その結果、抑制因子のリン酸化 mTOR は発現増加を示すものの、LC3-II の発現量に顕著な変化は認められなかった。

以上のように、老化骨格筋では、変性タンパク質の蓄積が顕著に認められるが、これを除去するオートファジーの誘導増加は認められなかった。また、運動による効果はさらなる検討が必要であると考えられるが、少なくとも成熟ラットにおいては、オートファジーの誘導レベルを大きく変化させるような働きは認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Tomonori Ogata, Shuichi Machida, Yasuharu Oishi, Mitsuru Higuchi, Isao Muraoka, Differential cell death regulations between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. Mechanisms of Ageing and Development 査読有, 2009, Vol.130(5) pp.328-336

Tomonori Ogata, Yasuharu Oishi, Mitsuru Higuchi, Isao Muraoka, Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle, American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 査読有, 2009, Vol.296(5) pp.1557-1563

Tomonori Ogata, Yasuharu Oishi, Mitsuru

Higuchi, Isao Muraoka, Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. Biochemical and biophysical research communications, 査読有, 2010, Vol. 394, pp. 136-140.

〔学会発表〕(計2件)

運動トレーニングは筋内 HSP70 を長期的に発現増加させる, 緒方 知徳(代表), 大石 康晴, 村岡 功, 第63回日本体力医学会, 大分, 2008年9月

絶食に伴うラット骨格筋内オートファジーの誘導と制御, 緒方 知徳(代表), 大石 康晴, 村岡 功, 第64回日本体力医学会大会, 新潟, 2009年9月

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒方 知徳 (OGATA TOMONORI)
早稲田大学総合研究機構 助手
研究者番号: 30434343

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

村岡 功 (MURAOKA ISAO)
早稲田大学スポーツ科学学術院 教授
研究者番号: 80112712