

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500778

研究課題名(和文)オートファジーによるタンパク分解は、加齢性筋肉減弱症を誘発するか？

研究課題名(英文) Does protein degradation by autophagy induce sarcopenia?

研究代表者

佐久間 邦弘 (Sakuma, Kunihiro)

豊橋技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：60291176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢マウス(24ヶ月齢)を用い、骨格筋におけるオートファジー関連物質の変化を調べた。加齢した骨格筋では、p62/SQSTM1およびBeclin-1蛋白の有意な増加がみられ、両物質とも細胞質で変化が顕著であった。蛍光免疫組織化学染色による検討でも、細胞質内にp62/SQSTM1は沈着していた。長期間の自発的な走運動はサルコペニアを軽減したが、オートファジー関連物質に顕著な変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Using senescent mice (24-month-old), I investigated the adaptive changes in autophagy-linked molecules in skeletal muscle. In aged mice, we observed the marked increase in the amount of p62/SQSTM1 and Beclin-1 protein in cytosol fraction but not membrane and nuclear fraction in quadriceps muscle. Immunofluorescence indicated the marked accumulation of p62/SQSTM1 but not LC3 in the cytosol of sarcomeric muscle fibers of mice. Although voluntary exercise attenuated the sarcopenic symptom, there is no significant change in autophagy-linked molecule.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 スポーツ生化学

キーワード：加齢 骨格筋 運動 サルコペニア オートファジー

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(加齢性筋肉減弱症)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。サルコペニアを軽減するための定期的な運動の重要性は経験的に知られているが、この現象に対する実際の科学的証明はあまりなされていない。

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、筋肥大の最も主要な Akt-mTOR (mammalian target of rapamycin)経路の関連物質は、加齢期の萎縮筋で有意に減少していない。また様々な萎縮筋(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)も、加齢筋において安定した知見が得られていない (Sakuma K et al., *Curr Aging Sci* 3: 90-101, 2010)。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のかもしれない。

最近筋萎縮の分野で注目を浴びているのは、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、遠位型ミオパチー)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始めてきた。実際に高齢マウスの大腿四頭筋を用いた私の予備実験で、オートファジー関連物質 (p62 と Beclin-1)の免疫活性が非常に多くの筋線維で亢進していた。

一方、最も有名な筋萎縮促進経路である Atrogin-1-FOXO は、加齢筋における結果が安定していない。その多くの研究で、mRNA やタンパク質のみの解析を行っている。またタンパク質解析についても、分画サンプルを用いていないので、加齢筋における Atrogin-1-FOXO の詳細な変化はわからない

のが現状である。さらに言えば、加齢期の骨格筋において、運動がこれらの物質にどのような変化をもたらすのかについても興味深い。

加齢期の運動効果を検証する大部分の研究が、トレッドミルを用いた強制運動を用いており、期間も長くて 3 ヶ月程度である。この運動方法の場合、運動強度を規定できるという利点があるが、ノルマどおり走れない動物に加えられる電気ショックは、かなりのストレスになると推測される。そこでストレスのより少ない自発回転ケージを、本研究では採用する。これによりマウスは好きな時に自由に走行する(トレーニングする)ことができる。また習慣的な運動が骨格筋に及ぼす効果を見るためにも、約 6 ヶ月間の長期に渡り走運動を行なう予定である。

2. 研究の目的

本研究では、高齢の実験動物(マウス)を用いて、以下の 3 つについて検証を行う。

- 1) 骨格筋内におけるオートファジー関連物質 (LC3, p62, Beclin-1)の加齢にともなう変化を詳細に調べる。
- 2) 通常に加齢および自発運動群の骨格筋において、一般に筋萎縮の主要経路だと考えられている Atrogin-1 系の構成物質【Atrogin-1, FOXO, Muscle Ring Finger-1 (MuRF1)】の変化を調べる。
- 3) 筋萎縮を抑制する自発的な走運動群の骨格筋では、オートファジー関連物質 (LC3, p62, Beclin-1)およびその調節因子 (mTOR, FOXO3)の発現量に変化(改善)が認められるのかどうかについて調べる

3. 研究の方法

◎平成23年度

加齢筋におけるオートファジー関連物質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。ヒト、ラットおよびマウスの骨格筋を用いた我々の先行研究で、この方法により数種類の蛋白質 (FOXO1, プレセニリン1, SRF)の細胞内局在を検出することに成功している (Sakuma K et al., *Biochimica Biophysica Acta General Subjects* 1760: 980-987, 2005)。分画後の各 Homogenate を蛋白定量した後、オートファジー関連物質【(LC3, p62, ATG7, Beclin-1)】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 μ 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、LC3(Santa Cruz, ヤギ)、p62(MBL, ウサギ)、Beclin-1(MBL, ウサギ)に対する一次抗体には、それぞれ抗ウサギ-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、オートファジー関連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。

◎平成24-25年度

筋萎縮の主要経路だと一般に考えられている Atrogin-1-FOXO 経路構成物質 (Atrogin-1, FOXO, MuRF1)の蛋白発現量を、加齢した骨格筋において調べる。

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)と細胞分画キットにより筋肉を細胞質(cytosol)、核(nucleus)といった4つの画分 (Fraction)に分離する。オートファジータンパク質解析の時と同様に、分画後の各Homogenateを蛋白定量した後、Atrogin-1、FOXOファミリー (FOXO1, FOXO3a, FOXO4)、MuRF1の量的な変化を解析する。

自発的な走運動が骨格筋内のオートファジー関連物質、およびその調節因子(mTOR, FOXO3)の発現量を亢進させるかどうかについて調べる。

ストレスの少ない自発的で習慣的な走運動が、サルコペニア(加齢性筋肉減弱症)を軽減するかどうか? その場合には、オートファジー関連物質およびその調節因子に量的な変化がみられるのかどうか? について検討するのが目的である。生後18ヶ月齢のマウスを実験に用い、6ヶ月間の自発的な走運動(自発回転ケージ内で飼育, 現有設備, 図1)を施したマウスと、安静にしていたマウスの腓腹筋(内側頭、外側頭)、大腿四頭筋、上腕三頭筋について、オートファジー関連物質(LC3, p62, Beclin-1)およびその調節因子(FOXO3, mTOR)のmRNAおよび蛋白発現量を比較する。分析には、分画Homogenateを用いたWestern blot法および蛍光免疫組織染色を用いる予定である。

4. 研究成果

(1) 加齢にともない大腿四頭筋、上腕三頭筋、腓腹筋のいずれにおいても有意な筋萎縮が認められた。また大腿四頭筋において、筋線維

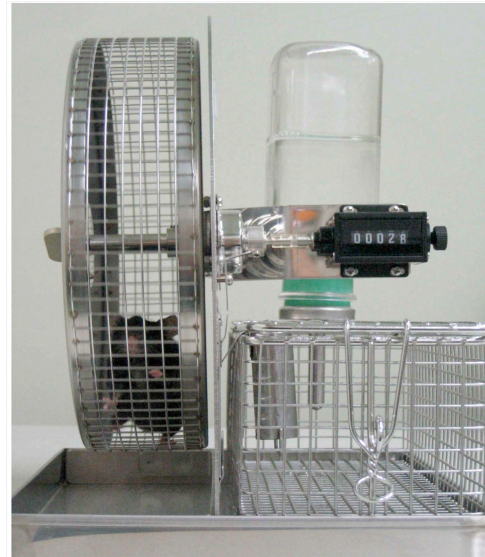
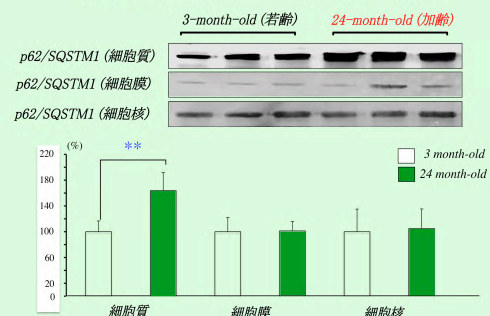


図1 自発回転ケージで運動するマウス
飼育ケージと回転ケージが一体型となっており、マウスは自分の好きな時間に、自分のペースで運動することができる。水と餌は自由摂取。

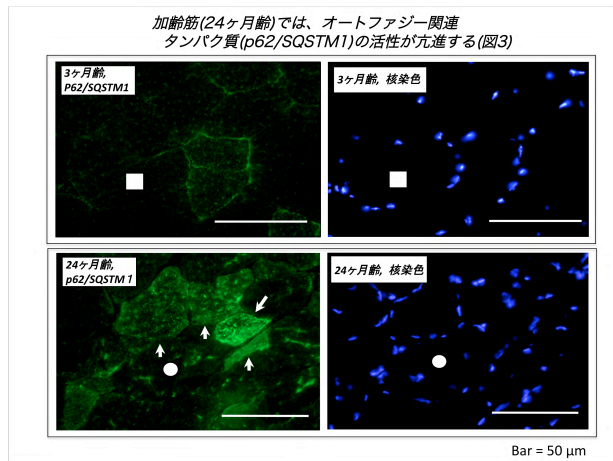
の平均横断面積が加齢マウス(24ヶ月齢)で有意に低値を示した(30%程度)。また筋変性と関連が示唆される中心核は、若齢筋では検出されなかったものの、加齢筋では20%の筋線維で中心核が認められた。

加齢した骨格筋では、細胞膜と核の両方の分画(Fraction)において、p62/SQSTM1の有意な変化は認められなかった。しかしながら細胞質のFractionでは、若齢筋に比べて明らかにp62/SQSTM1の量が増加していた(図2)。また蛍光免疫組織染色によっても、p62/SQSTM1が細胞質に異常に沈着する様子が認められた(図3)。このような細胞質分画での有意な増加は、他のオートファジー関連物質(Beclin-1)においても観察された。一方、オートファジー経路においてp62/SQSTM1と協力して働くLC3は、加齢にともなう有意な変化はまったく検出されなかった(生化学および形態学解析のいずれにおいても)。またリアルタイムPCR解析は、各オートファジー関連物質(LC3B, p62/SQSTM1, Beclin-1, ATG7)のmRNA発現量が加齢にともない有意に変化しないことを示唆した。

図2 p62/SQSTM1蛋白の細胞内分布 (Western blot)



加齢した大腿四頭筋では、細胞質においてp62/SQSTM1が増加する。



(2)加齢マウスに対する6ヶ月間の自発的な走運動は、有意な筋肥大をもたらした。Western blotを用いたデータから、活性化型mTORおよび不活性化型(リン酸化)FOXO3は、走運動により有意に増加した。しかしながら、p62/SQSTM1およびBeclin-1の骨格筋内蛋白量に、運動の影響は認められなかった。また蛍光免疫組織化学による検証でも、これらオートファジー関連物質の組織内分布様相に明らかな変化はみられなかった。

以上のことから、オートファジー機能不全がサルコペニアに関係する可能性が高いが、運動による筋萎縮抑制効果はオートファジー不全解消に起因したものでは無いと思われる。

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24件)

1. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A: Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. *Pflügers Arch* (in press) DOI: 10.1007/s00424-014-1527-x, 2014. (査読あり)
2. Wakabayashi H, Sakuma K: Comprehensive approach to sarcopenia treatment. *Curr Clin Pharmacol* 9: 171-180, 2014. (査読あり)
3. 佐久間邦弘. サルコペニアの発症メカニズム. *Geriatric Medicine* 52: 337-341, 2014.
4. Aoi W, Naito Y, Takagi T, Tanimura T, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Hang LP, Mizushima K, Hirai Y, Koyama R, Wada S, Higashi A, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T: A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut* 62: 882-889, 2013. (査読あり)
5. Sakuma K, Yamaguchi A: Sarcopenic obesity and endocrinal adaptation with age. *Int J Endocrinol* 2013: Article ID 204164, 12 pages, 2013. (査読あり)
6. Suwa M, Sakuma K: The potential role of sirtuins regarding the effects of exercise on aging-related diseases. *Curr Aging Sci* 6: 178-188, 2013. (査読あり)
7. Sakuma K, Yamaguchi A: Serum response factor (SRF)-dependent signaling in regenerating, hypertrophied, and pathological skeletal muscle. *Front Pathol Genet*, 1: 1-8, 2013. (査読あり)
8. Aoi W, Sakuma K: Skeletal muscle: novel and intriguing characteristics as a secretory organ. *BioDiscovery* 7: 2, 9 pages, 2013. (査読あり)
9. Wagatsuma A, Sakuma K: Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *Scientific World Journal* 2013: Article ID 593267, 9 pages, 2013. (査読あり)
10. Kano Y, Sakuma K: Effect of aging on the relationship between capillary supply and muscle fiber size. *Adv Aging Res* 2: 37-42, 2013. (査読あり)
11. Wakabayashi H, Sakuma K: Nutrition, exercise, and pharmaceutical therapies for sarcopenic obesity. *J Nutr Ther* 2: 100-111, 2013. (査読あり)
12. Sakuma K, Yamaguchi A: Recent research developments in regeneration of skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med* 1: 401-411, 2012.
13. Sakuma K, Yamaguchi A: Molecular determinants of skeletal muscle hypertrophy. *J Sports Med & Dopng Studies* 2012: S1-002, 2012. (査読あり)
14. Sakuma K, Yamaguchi A: Sarcopenia and age-related endocrine function. *Int J Endocrinol* 2012: Article ID 127362, 10 pages, 2012. (査読あり)
15. Yamaguchi A, Sakuma K, Fujikawa T, Morita I: Expression of specific IGF-BPs is associated with those of the proliferating and differentiating markers in regenerating rat plantaris muscle. *J Physiol Sci* 63: 71-77, 2013.
16. Wagatsuma A, Sakuma K: Molecular mechanisms for age-associated

mitochondrial deficiency in skeletal muscle. *J Aging Res* 2012: Article ID 768304, 14 pages, 2012. (査読あり)

17. Sakuma K, Yamaguchi A: Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia, Sarcopenia, Muscle* 3: 77-94, 2012. (査読あり)
18. Sakuma K, Yamaguchi A: Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia. *J Aging Res* 2012: Article 251217, 11 pages, 2012. (査読あり)
19. Wagatsuma A, Sakuma K: Myogenic and angiogenic pathways are sequentially activated during postnatal muscle regeneration. *Curr Topics Peptide Protein Res* 13: 49-59, 2012. (査読あり)
20. Sakuma K, Yamaguchi A: Inhibitors of myostatin- and proteasome-dependent signaling for attenuating muscle wasting. *Recent Pat Regenerat Med* 1: 284-298, 2011. (査読あり)
21. Aoi W, Sakuma K: Oxidative stress and skeletal muscle dysfunction with aging. *Curr Aging Sci* 4: 101-109, 2011. (査読あり)
22. Sakuma K, Yamaguchi A: Current application of cyclosporine A to investigate skeletal muscle adaptation. *Curr Enzyme Inhibit* 7: 154-162, 2011. (査読あり)
23. Sakuma K, Yamaguchi A: The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. *J Biomed Biotechnol* 2011: Article ID 201696, 12 pages, 2011. (査読あり)
24. Sakuma K, Yamaguchi A: Cyclosporin A inhibits the growth of neonatal MHC-expressing myotubes independent of NFATc1 and NFATc3 in the mechanically overloaded soleus muscle of mice. *Am J Mol Biol* 1: 7-16, 2011. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

招待口演

1. 佐久間邦弘, 山口明彦. サルコペニアにともなう筋萎縮誘導因子の変化. 第 69 回日本体力医学会大会, 長崎, 2014 年 9 月 (予定)
2. 佐久間邦弘, 山口明彦. サルコペニア (加齢性筋減弱症) の分子メカニズム. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 2013 年 9 月
3. Sakuma K, Current understanding of

cellular mechanism on sarcopenia. Plenary Lecture (60 min), 3rd International Conference on Medical Physiology (PHYSIO' 12), Kos Greece, July, 2012

4. 佐久間邦弘, 青井 渉, 山口明彦. サルコペニア (加齢性筋減弱症) におけるオートファジー経路の変化. 平成 24 年度筋ジストロフィーに対するトランスレーショナルリサーチ研究班会議, JA 共済ビル (東京), 2012 年 12 月
5. 佐久間邦弘, 山口明彦. 筋肉の抗加齢. “シンポジウム No.6 少年老い易く学成り難し〜テストステロン医学の最先端 2012” 第 12 回抗加齢医学会総会, 横浜, 2012 年 6 月
6. 佐久間邦弘. サルコペニアを制御する物質の探索〜Serum response factor (SRF) とオートファジー経路の変化〜. 第 4 回分子骨格筋代謝研究会, 京都, 2012 年 6 月

一般発表

1. 佐久間邦弘, 山口明彦, 青井 渉. 加齢筋におけるオートファジー関連物質 (p62) と TRAF6 の発現比較, 第 67 回日本体力医学会大会, 岐阜, 2012 年 9 月
2. 佐久間邦弘, 山口明彦, 青井 渉, 狩野豊. 加齢筋におけるオートファジー経路の変化. 第 66 回日本体力医学会, 下関, 2011 年 9 月.
3. 青井 渉, 高波嘉一, 川合ゆかり, 谷村祐子, 佐久間邦弘, 市川 寛, 内藤裕二, 吉川敏一. 新規マイオカイン候補 SPARC の同定. 第 66 回日本体力医学会, 下関, 2011 年 9 月.

[図書] (計 11 件)

1. Sakuma K, Yamaguchi A: Current understanding of molecular mediators regulating sarcopenia. In: *Striated Skeletal Muscle* (in press), Academy Publish, Wyoming, 2014.
2. Sakuma K, Yamaguchi A: Current concepts and therapeutic strategy in sarcopenic obesity. Ed: iConcept Press, In: *Obesity Epidemic*, pp.137-154, iConcept Press, Hong Kong, 2013.
3. Sakuma K, Yamaguchi A: An overview of the therapeutic strategies for preventing sarcopenia. Ed: Sakuma K, In: *Basic Biology and Current Understanding of Skeletal Muscle*, pp 87-122, Nova Science Publishers, NY, 2013.
4. Yamaguchi A, Sakuma K: Biological actions of insulin-like growth

factor-I (IGF-I) isoforms and IGF binding proteins in skeletal muscle. Ed: Sakuma K, In: Basic Biology and Current Understanding of Skeletal Muscle, pp 53-86, Nova Science Publishers, NY, 2013.

5. Sakuma K, Yamaguchi A: Cellular and molecular mechanism regulating hypertrophy and atrophy of skeletal muscle. Ed: Willems M, In: Skeletal Muscle: Physiology, Classification and Disease, pp 141-193, Nova Science Publishers, NY, 2012.
6. Sakuma K, Yamaguchi A: Basic biology and current concepts of muscle regeneration. Ed: Pezzo B, In: Muscle Cells: Development, Disorders and Regeneration, pp 1-50, Nova Science Publishers, NY, 2012.
7. Sakuma K, Yamaguchi A: Molecular and cellular mechanism of muscle regeneration. Ed: Cseri J, In: Skeletal Muscle, pp 3-30, InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
8. Yamaguchi A, Sakuma K, Morita I: Local and circulating insulin-like growth factor-I on skeletal muscle growth. Ed: Sakuma K, In: Current Research Trends in Skeletal Muscle, pp 75-96, Research Signpost, Kerala, India, 2011.
9. Sakuma K, Yamaguchi A: Calcineurin-dependent signaling: potent regulators for fiber-type transformation, regeneration and hypertrophy of skeletal muscle. Ed: Sakuma K, In: Current Research Trends in Skeletal Muscle, pp 75-96, Research Signpost, Kerala, India, 2011.
10. Sakuma K, Yamaguchi A: Sarcopenia: Molecular mechanisms and current therapeutic strategy. Eds: Perloft JW and Wong AH, In: Cell Aging, pp. 63-152, Nova Science Publishers, NY, 2011.
11. Sakuma K, Yamaguchi A: Serum response factor (SRF)-dependent pathway: potential mediators of growth, regeneration, and hypertrophy of skeletal muscle. Ed: Pandalai SG, In: Recent Research Developments in Life Sciences (Vol 5), pp 13-38, Research Signpost, Kerala, India, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.health.tut.ac.jp/sakuma/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 邦弘 (Kunihiro Sakuma)
豊橋技術科学大学・総合教育院・准教授
研究者番号 : 60291176

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :