

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890178

研究課題名(和文)サルコペニアに対するAktシグナルを標的とした新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Novel therapy on sarcopenia by targeting Akt signaling

研究代表者

赤崎 雄一 (Akasaki, Yuichi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00631920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：老化による骨格筋減少症(サルコペニア)に対して、骨格筋特異的にAkt1シグナルを活性化することは、加齢に伴った骨格筋減少症を改善し、内臓脂肪・皮下脂肪を減少させ、脂肪肝を改善した。それにより、糖代謝異常を改善した。以上より、サルコペニアが加齢に伴う代謝異常の重要な因子であり、速筋の量を保持もしくは改善させることは、これらの代謝異常の発症を遅らすための有効な治療法になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Akt1-mediated increase in muscle mass led to reductions in fat mass and hepatic steatosis in older animals, and corrected age-associated impairments in glucose metabolism. These results indicate that the loss of lean muscle mass is a significant contributor to the development of age-related metabolic dysfunction and that interventions that preserve or restore fast/glycolytic muscle may delay the onset of metabolic disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般(含心身医学)

キーワード：骨格筋 老化 シグナル伝達 糖尿病 脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化に伴う筋萎縮が身体に及ぼす影響

老化に伴う骨格筋喪失はサルコペニアと呼ばれる。骨格筋は収縮作用により身体活動におけるパワー産生をするだけでなく、糖代謝などの様々な代謝能において重要な役割を担っている。サルコペニアは年齢を重ねる上で避けられない現象であり、老化による筋力の低下は活動性の低下や転倒などにより高齢者の衰弱をもたらし、また糖や脂質代謝能の低下は合併症を生じさせる。

(2) サルコペニアの定義

サルコペニアは老化に伴う骨格筋容積の喪失で、蛋白合成が低下した状態であり、筋肉の喪失もしくは萎縮は I 型 (主に IIb 型) 筋線維における蛋白分解の亢進と定義される。

(3) 筋肉量の調整 PI3 kinase/Akt シグナルの役割

ホスホチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3K) /Akt シグナル系は細胞生理において様々な役割を担っている。骨格筋においては、同化刺激 (例えば Insulin Growth Factor などの増殖因子、運動、栄養など) が PI3K とその下流因子を活性化することで、生存、蛋白分解、蛋白合成、糖代謝に影響する。

(4) 老化における筋肉増加における PI3/Akt シグナルの減弱

レジスタンストレーニングは PI3K/Akt シグナルを活性化し、IIb 型筋線維の増加を増加させる。一方、レジスタンストレーニングによる筋線維の肥大は老化により減弱することが報告されている (Glough ER et al, J. Appl. Physiol. 2000;88:1265-1270)。

運動刺激に対する PI3K/Akt シグナルおよびその下流の反応は減弱することも知られている (Morris RT et al, J. Appl. Physiol. 2004;96:398-404)。

(5) 代謝、トレーニング

有酸素運動は全身的な代謝能の改善に貢献

することは広く知られている。その機序は、ミトコンドリアによるエネルギー消費を促すことが主であり、筋肥大にはあまり影響せず、I 型筋線維 (遅筋) の増加を誘導する (Zierth JR et al, PLoS Biol. 2004;2:e348)。一方、レジスタンストレーニングはタンパク質合成や II 型筋線維 (速筋) の肥大増殖を誘導する (Nadar GA et al, J. Appl. Physiol. 2001;90(5):1936-1942)。

2. 研究の目的

近年、我々は Akt1 を骨格筋特異的に発現させることで、IIb 型筋線維を肥大増加させるマウスを開発した。このマウスに高脂肪高シヨ糖負荷することで肥満になったマウスを用いた実験において、Akt1 活性化により筋肥大を起こすと、筋力が増大し、また体重減少、脂肪組織の減少、脂肪肝の改善など代謝能の改善を示した (Izumiya Y, et al. Cell Metabolism. 2008;7:159-172)。

これらの研究を背景として、老化により筋力や代謝能が低下した状態において、Akt を筋肉に直接活性化することが、筋力及び代謝能の改善につながるのではないかと考え、今回の研究課題の発想に至った。

3. 研究の方法

(1) 老化に伴う筋萎縮に伴う活動性・代謝能低下に対する筋肉特異的 Akt1 活性化が及ぼす影響を生理学的に検討した。

実験動物: 2 系統のトランスジェニックマウス (TG) Tetracyclin responsive element myristoylated Akt1 (TRE-myrAkt1) 及び the reverse transactivator from the 1256[3Emut] muscle creatine kinase promoter (1236[3Emut]MCK-rtTA) を使用する。TRE-myrAkt1 TG マウスは TRE 非存在下で Akt1 を強発現する。1236[3Emut]MCK-rtTA は骨格筋特異的に rtTA を TRE に結合させる。これらのマウスを交配することで 4 種類のマ

ウスが生まれる (ワイルドタイプ (WT)、TRE-myrAkt1-TG、236[3Emut]MCK-rtTA-TG、ダブルトランスジェニック (DTG))。この内 DTG にドキシサイクリン (DOX) を飲水に入れると、DOX が rtTA に作用することで rtTA は TRE に結合し、骨格筋特異的に Akt1 を強発現させた。

マウスは 12 週齢若年マウス (Y) と 12 ヶ月齢高齢マウス (O) の DTG を使用し、DOX 非投与群をコントロール (C) 群、DOX 投与群を DTG (D) 群とする。したがって、YC、YD、OC、OD で比較検討した。

(2)以下の生理学的試験は DOX 投与 4 週間後に施行した。

筋力測定: コンピューター制御下筋力測定装置を用いて行う (Acakpo-Satchivi LJ et al. J. Cell Biol. 1997;139:1219-1229)。測定方法はマウスに前腕でバーを握らせた後、マウスを後ろに引くことで、マウスが装置を牽引する。この牽引力をマウスの握力とした。マウスは 3 日前より練習させ器具に慣れさせる。これを 5 回測定し、真ん中の値 3 回分を平均して、握力とした。

糖代謝能評価: 糖負荷試験は 12 時間空腹後に、D-グルコース (1g/体重 kg) を腹腔内投与し、直前、20・40・60・80・100・120 分後の血糖を測定した。インスリン抵抗性試験は、12 時間空腹後にインスリン (1.5 IU/体重 kg) を腹腔内投与し、15・30・45・60・75・90 分後の血糖値を測定した。

(3)形態学的解析: 高齢マウスにおける遺伝子工学的 Akt1 活性化が、若年マウスで活性化させた場合と同等に筋肉量を増加させ、type b 線維を増加させることができるか形態学的に検討した。

組織重量の比較: 骨格筋 (ヒラメ筋: type 型線維、腓腹筋: type b 型線維)、肝臓、脂肪 (皮下脂肪、内臓脂肪、褐色脂肪) の重量を測定し、比較検討する。腓腹筋は 2-メチルブタン/液体窒素法で凍結固定し、凍結切

片を作成した。type , type a, type b の筋線維型を同定するために、type (BA-F8)、type a (SC-71)、type b (BF-F3) のモノクローナル抗体で蛍光染色を行った。蛍光染色後は蛍光顕微鏡下で写真を撮影し、Metamorph Image Analysis software で、骨格筋線維の断面積を測定した。

肝臓は OCT コンパウンドに包埋後、液体窒素で固定し、オイルレッド O 染色を行ない、脂肪滴の沈着を検出した。

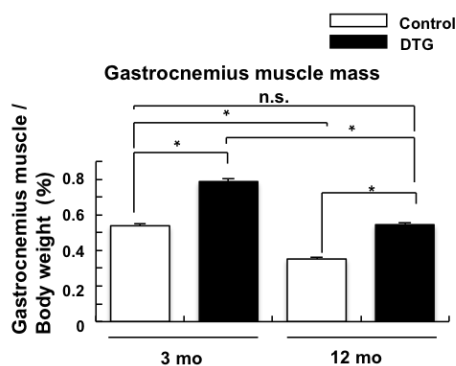
(3)生化学的解析: 高齢マウスにおける Akt1 の活性化が、筋肉の成長に関する Akt の上流下流のシグナルを若年マウスと同レベルに活性化することができるかを解析した。

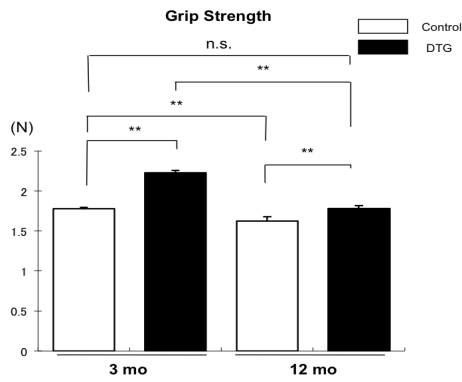
蛋白活性は蛋白を筋肉 (腓腹筋) から抽出した後、ウェスタンブロットを行う。全てのリン酸化の程度は、デンシトメトリー法で数値化し、比較検討した。

Akt シグナル系 (Akt および Akt の Ser473 と Thr308 におけるリン酸化 Akt の上流シグナル Akt の下流シグナル) の総蛋白またはリン酸化蛋白を測定し、解析を行った。

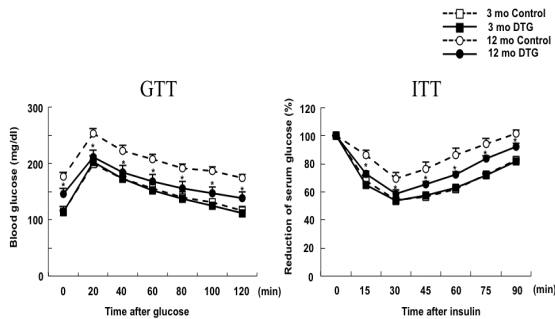
4. 研究成果

高齢マウス (12 ヶ月齢) に対して 4 週間、骨格筋特異的に Akt1 遺伝子を強発現させた。Akt1 強発現により、高齢マウスにおいても骨格筋が増加し、筋力は高齢コントロール群に比較し改善していた。

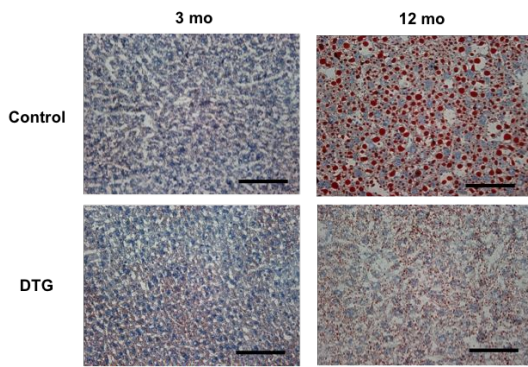




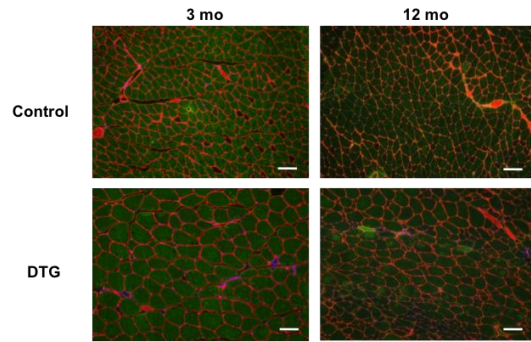
高齢マウスでは、若年マウス（3ヶ月齢）に比較すると、グルコース負荷試験(GTT)、インスリン抵抗性試験(ITT)において代謝能が低下していたが、筋肥大により糖代謝能は改善した。



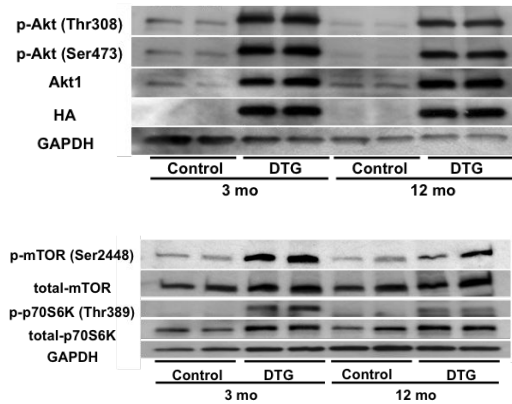
高齢マウスでは、脂肪肝を呈していたが、4週間の骨格筋肥大により、脂肪肝の改善が見られた。



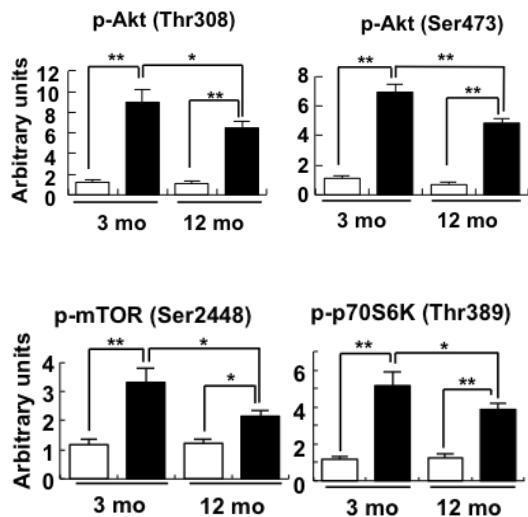
高齢マウスにおける遺伝子工学的 Akt1 活性化が、若年マウスで活性化させた場合と同等に筋肉量を増加させた。組織学的に検討したところ type 線維に変化を認めなかったが、type b 線維を増加させていた。



腓腹筋における Akt1 下流シグナルを検討したところ、mTOR、p70S6K のリン酸化が活性化しており、これらの筋肉増殖に関する Akt の下流のシグナルが活性化されることで、骨格筋肥大がおこることが示唆された。



一方で、若年マウスにおいて Akt 強発現をしたマウスと比較すると、骨格筋重量、骨格筋線維、及び、Akt 下流シグナルの活性化は低下していた。



以上より Akt による下流シグナル活性化が、老化により減弱していることがサルコペニアに関連していると示唆された。

老化による骨格筋減少症（サルコペニア）に対して、骨格筋特異的に Akt1 シグナルを活性化することは、加齢に伴った骨格筋減少症を改善し、内臓脂肪・皮下脂肪を減少させ、脂肪肝を改善した。それにより、糖代謝異常を改善した。以上より、サルコペニアが加齢に伴う代謝異常の重要な因子であり、速筋の量を保持もしくは改善させることが、これらの代謝異常の発症を遅らすための有効な治療法になることが示唆された。

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 4 件)

1. Akasaki Y, Ouchi N, Izumiya Y, Bernardo BL, Lebrasseur NK, Walsh K. Glycolytic fast-twitch muscle fiber restoration counters adverse age-related changes in body composition and metabolism. *Aging Cell*. 2014 Feb;13(1):80-91. doi: 10.1111/accel.12153. Epub 2013 Sep 17. (査読あり)
2. Furusho Y, Miyata M, Matsuyama T, Nagai T, Li H, Akasaki Y, Hamada N, Miyauchi T, Ikeda Y, Shirasawa T, Ide K, Tei C. Novel therapy for atherosclerosis using recombinant immunotoxin against folate receptor β -expressing macrophages. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e003079 doi: 10.1161/JAHA.112.003079. (査読あり)
3. Miyauchi T, Miyata M, Ikeda Y, Akasaki Y, Hamada N, Shirasawa T, Furusho Y, Tei C. Waon therapy upregulates Hsp90 and leads to angiogenesis through the Akt-endothelial nitric oxide synthase

pathway in mouse hindlimb ischemia. *Circ J*. 2012;76(7):1712-21. (査読あり)

4. Araki S, Izumiya Y, Hanatani S, Rokutanda T, Usuku H, Akasaki Y, Takeo T, Nakagata N, Walsh K, Ogawa H. Akt1-Mediated skeletal muscle growth attenuates cardiac dysfunction and remodeling after experimental myocardial Infarction. *Circ Heart Fail*. 2012; 5: 116-125. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

宮内孝浩, 赤崎雄一, 大石 充. 長期食事管理された後期高齢者の脈波伝播速度. 日本老年病学会九州地方会(第24回), 2014年3月8日. 産業医科大学. 北九州市.

〔図書〕(計 1 件)

赤崎雄一, 大石 充. カレントセラピー 白衣高血圧(低リスクと高リスク)の治療. ライフメディコム., 東京, Vol.32, No.3., pp.52-56. 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤崎 雄一 (YUICHI AKASAKI)

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科

心臓血管・高血圧内科学 助教

研究者番号：00631920