

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350815

研究課題名(和文) 加齢性筋減弱症における小胞体ストレスとオートファジーの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the functional role of endoplasmic reticulum stress and autophagy for 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢マウス(24ヶ月齢)を用い、骨格筋における小胞体ストレス関連物質の変化を調べた。加齢した骨格筋では、IRE-1aおよびPKCthetaの有意な増加が認められたが、オートファジー関連物質の発現部位とは一致しなかった。長期間の低タンパク質食摂取により、サルコペニアは軽減しなかった。小胞体ストレスを抑えるレスベラトロールの摂取は、除神経後の筋萎縮を有意に軽減した。

研究成果の概要(英文)：Using senescent mice (24-month-old), I investigated the adaptive changes in endoplasmic reticulum stress-linked molecules in skeletal muscle. Although we observed the marked increase in the amount of IRE-1a and PKCtheta protein in cytosol of aged muscle fibers, these expressing position are not equal at those position of autophagy-linked molecules. Long-term low-protein-diet did not attenuate sarcopenic symptom. Supplementation with resveratrol, which decrease endoplasmic reticulum stress, attenuated muscle atrophy after denervation in mice.

研究分野：総合領域

キーワード：加齢 骨格筋 小胞体ストレス サルコペニア オートファジー

1. 研究開始当初の背景

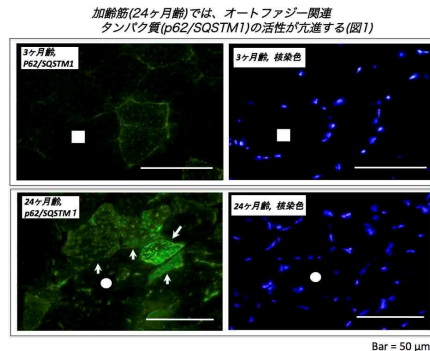
ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するために、高齢化に関する研究が様々な分野で押し進められている。ゲートボールやジョギング、ストレッチといった適度な運動は、肩こりや肥満あるいは精神的ストレスを軽減してくれる。加齢にともなう筋力の著しい低下をサルコペニア(加齢性筋減弱症)という。超高齢化が進む我が国では、このサルコペニアをいかに食い止めるかが大変重要な課題である。

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。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 (Sakuma K et al., Pflugers Archiv 467: 213-229, 2015)。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、オートファジー(自食)という機構である(図1参照)。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。また前回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)。

不活動、無重力状態でのタンパク分解において、小胞体ストレス (Endoplasmic



Reticulum Stress)が重要な働きをすることが知られている。非常に興味深いことに、この小胞体ストレス系が PKC (プロテインキナーゼ)を介して、マクロオートファジーを活性化する重要な機構が存在する。加齢性筋減弱症へ小胞体ストレスが関与するのではないかという仮説も、最近登場してきている (DeLdicque L, Front Physiol 4: Article 236, 2013)。しかしながら加齢筋において、小胞体ストレス機構の変化を体系的に調べた論文は見当たらない。またオートファジーと小胞体ストレス系をつなぐ PKC についても、加齢筋での変化を扱った論文は存在しない。

加齢性筋減弱症を軽減するために、運動やアミノ酸摂取、薬理的な検証がなされている。現在のところ、アミノ酸摂取と筋力トレーニングの組合せが効果的であるが、その萎縮軽減の程度は比較的小さい。DMD 型筋ジストロフィー症モデルである mdx マウスの骨格筋では、オートファジー不全が認められる。このマウスに低タンパク質食を長期間摂取させると、オートファジーが活性化され、筋萎縮が軽減し、異常肥大筋線維も認められなくなるようである。そこで同様なオートファジー不全 (p62 は活性化しているのに LC3 に活性化は認められない)が認められる加齢筋でも、低タンパク質食による症状改善が認め

られるかどうかについて検証する。

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) 骨格筋内における小胞体ストレス系の物質 [CHOP, Bnip3, IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), etc] と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、オートファジー系と小胞体ストレス系を繋ぐ PKC の分布状況を生化学的および形態学的に調べる。
- 3) 低タンパク質食によるオートファジー活性化が、加齢筋における筋萎縮を軽減するかどうかについて検証する。

3. 研究の方法

平成 26 年度

加齢筋における小胞体ストレス系 (CHOP, Bnip) 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、小胞体ストレス関連物質【(CHOP, Bnip3, IRE1)】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、CHOP (Cell Signaling, ウサギ)、Bnip3 (MBL, ウサギ)、IRE1 (Santa Cruz, ヤギ) 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) により観察し、小胞体ストレス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 27-28 年度

1. 小胞体ストレス系は PKC を介することで、オートファジーを誘導するようである。加齢筋における PKC 発現量と、その細胞内発現様相を調べる。

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と細胞分画キットにより筋肉を細胞質、核といった4つの画分に分離する。小胞体ストレス系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、PKC の量的な変化を解析する。またこのPKC の筋細胞内発現様相を、小胞体ストレス関連物質 (CHOP, Bnip3, IRE1) とオートファジー関連物質 (p62, Beclin-1) と比較検討する。

2. 低タンパク質食によるオートファジー活性化が、加齢筋における筋萎縮を軽減するかどうかについて調べる。

DMD 型筋ジストロフィー症モデルである mdx マウスに、低タンパク質食を長期間摂取させると、オートファジーが活性化され、筋萎縮が軽減する (Palma et al., Cell Death and Disease 3: e418, 2012)。同様なオートファジー不全が認められる加齢筋でも、低タンパク質食による症状改善が認められるかについて検証する。生後 21 ヶ月齢のマウスを実験に用い、通常食あるいは低タンパク質食を 3 ヶ月間与える。Palma らの研究を参考に、低タンパク質 (Protein 22.5% 5%) にした分は、脂肪 (Fat 5.5 10%) と炭水化物 (Carbohydrates 66.5% 76%) の量を増加する。食餌摂取 3 ヶ月後にマウスの腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋について、抗ジストロフィン抗体 (Sigma) による蛍光免疫組織を行い、平均筋線維横断面積を算出する。

またオートファジー関連物質のmRNAおよびタンパク発現量を比較する。

4. 研究成果

(1) 大腿四頭筋の横断切片を用いた免疫組織染色により、加齢筋において、小胞体ストレス関連物質 (IRE1 および PKC) の免疫活性が亢進していることを確認した。この活性亢進場所は筋細胞内に認められたが、オートファジー関連物質 (p62/SQSTM1 および LC3) の発現場所とは異なっていた。マウスに48時間の飢餓を与えた場合の骨格筋においても、小胞体ストレスの活性化を確認できた。以上のことから加齢にともなう筋萎縮に小

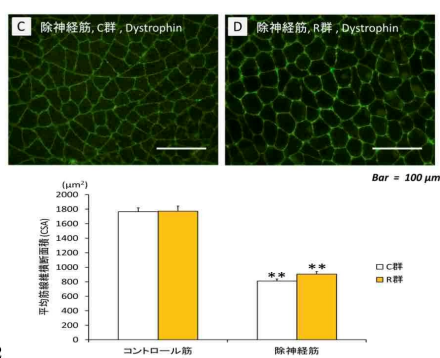


図2

胞体ストレスが関与する可能性があるが、オートファジー経路とは別の機構で働く可能性が高いと考えられる。

(2) 標準食を施したマウスと比べて、低タンパク質食による体重、筋重量、平均筋線維横断面積の有意な差は認められなかった。またp62/SQSTM1 陽性細胞の割合も、両群間に有意な差はみられなかった。以上のことから今回用いた低タンパク質食は、マウスにおけるサルコペニアを軽減しないことが確認された。

(3) レスベラトロールは小胞体ストレスを調節し、骨格筋に影響を与えるようである

(Skrobuk et al., Diabetologica 55: 3051-3060), 2012)。サルコペニアの簡便なモデルである除神経を用いて、レスベラトロール投与による筋萎縮軽減効果を調べた。2週間のレスベラトロール投与により小胞体ストレスの量は軽減され、筋線維の萎縮は有意に軽減した (図2)。

またレスベラトロール投与により、オートファジー関連物質 p62/SQSTM1 の発現量が有意に低下した (図3)。以上のことからレスベラトロール投与は、小胞体ストレスおよびオートファジーを調節し、サルコペニアを軽減する可能性が示唆された。加齢マウスを用いてさらなる研究が必要である。

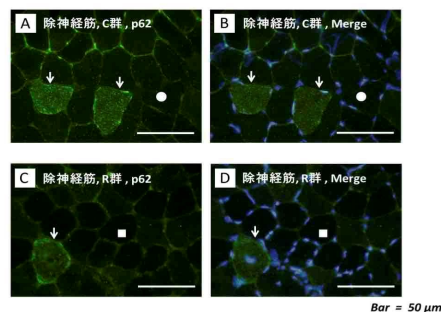


図3

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16件)

1. Sakuma K, Yamaguchi A, Aoi W. Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia; recent research advances. Pflugers Archiv 469: 573-591, 2017. (査読あり)
2. 佐久間邦弘. サルコペニアとオートファジー. 食と医療 1: 78-85, 2017. (査読なし)
3. Sakuma K, Kinoshita M, Ito Y, Aizawa M, Aoi W, Yamaguchi A: p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice. J Cachexia Sarcopenia Muscle 7: 204-212, 2016. (査読あり)
4. 佐久間邦弘. サルコペニアの分子制御機構. BioClinica 31: 18-22, 2016. (査読なし)
5. 佐久間邦弘. フレイルとサルコペニア. Anti-Aging Medicine 12: 38-44, 2016. (査読なし)
6. 佐久間邦弘. 運動による骨格筋の分化・再生に働く制御機構. 体育の科学 66: 653-658, 2016. (査読なし)
7. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A : Current

understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. Pflugers Archiv 467: 213-229, 2015. (査読あり)

8. 佐久間邦弘. サルコペニア発症の分子機序. 最新医学別冊 診断と治療のABC, 112: 25-31, 2016. (査読なし)
9. 佐久間邦弘. サルコペニア発症の分子機構. 腎と透析 80: 612-616, 2016. (査読なし)
10. 佐久間邦弘. サルコペニアの発症機構. 最新医学 70: 51-57, 2015. (査読なし)
11. Wakabayashi H, Sakuma K: Comprehensive approach to sarcopenia treatment. Curr Clin Pharmacol 9: 171-180, 2014 (査読あり)
12. Wakabayashi H, Sakuma K: Rehabilitation nutrition for sarcopenia with disability: a combination of both rehabilitation and nutrition care management. J Cachexia Sarcopenia Muscle 5: 269-277, 2014. (査読あり)
13. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A : The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. Front Aging Neurosci 6: Article ID 230, 17 pages, 2014. (査読あり)
14. Wagatsuma A, Sakuma K. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. Biomed Res Int 2014: Article ID 121254, 13 pages, 2014. (査読あり)
15. 佐久間邦弘. サルコペニアの発症メカニズム. Geriatric Med 52: 337-341, 2014. (査読なし)
16. Aoi W, Sakuma K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNA? Front Physiol 5: Article ID 39, 8 pages, 2015. (査読あり)

[学会発表](計8件)

招待講演

1. Sakuma K, Yamaguchi A. Molecular mechanism of sarcopenia- Adaptive changes in several regulators modulating muscle mass. “Biology updates in the field of sarcopenia and frailty” 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. Nagoya, November 2016.
2. 佐久間邦弘. サルコペニア発症の分子機構. “シンポジウム 筋萎縮研究の最前線” 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 福岡国際会議場, 2016年10月
3. 佐久間邦弘, 山口明彦. サルコペニアの発症機序-筋萎縮誘導因子の変化に着目して-. “シンポジウム 骨格筋研究の展開: 疾患治療・創薬に向けて” 第89回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜, 2016年3月
4. 佐久間邦弘, 山口明彦. サルコペニアの発症・進展に関する分子機序. “シンポジウム 運動を科学する -健康寿命を延ばす運動療法-” 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関, 2015年5月
5. 佐久間邦弘. サルコペニア発症の分子機構. “シンポジウム サルコペニア・フレイルのトピックス: 基礎から臨床まで” 第2回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会, 東京大学, 2015年10月
6. 佐久間邦弘. サルコペニア・悪液質のメカニズムと筋肉の変化. 第2回日本サルコペニア・悪液質・消耗性疾患研究会, 味の素グループ高輪研修センター, 2015年10月
7. 佐久間邦弘. 座位行動の骨格筋適応への分子メカニズム. 九州大学リサーチコアチーム「身体運動の科学を通しての社会貢献」主催第7回公開講演会. 医薬基盤・健康・栄養研究所, 2016年2月
8. 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. “シンポジウム ロコモティブシンドロームの

基礎研究- “ 第 69 回日本体力医学会大会, 長崎大学, 2014 年 9 月

[図書] (計 7 件)

1. 佐久間邦弘. 身体不活動・座位行動の生理・分子生物学のコンセプト : 身体活動・座位行動の科学～疫学・分子生物学から探る健康～ (分担執筆), pp. 146-154, 編集: 熊谷秋三 他 杏林書院 東京, 2016
2. Sakuma K, Aizawa M, Wakabayashi H, Yamaguchi A: The Autophagy-dependent signaling in skeletal muscle. In: Sakuma K, Ed. The Plasticity of Skeletal Muscle- from Molecular Mechanism to Clinical Applications. pp. 93-111, Springer, 2017.
3. Wakabayashi H, Sakuma K. Comprehensive approach to sarcopenia and cachexia treatment. In: Sakuma K, Ed. The Plasticity of Skeletal Muscle- from Molecular Mechanism to Clinical Applications. pp. 155-178, Springer, 2017.
4. Sakuma K, Yamaguchi A: Molecular mechanisms controlling skeletal muscle mass. In: Sakuma K, Ed. Muscle Cell and Tissue, pp. 143-170, INTECH, Rijeka, Croatia, 2015.
5. Sakuma K, Yamaguchi A: Sarcopenia and its intervention. In: Yu BP, Ed. Nutrition, Exercise and Epigenetics: Aging Interventions. pp. 127-151, Springer International Publishing, Switzerland, 2015.
6. Sakuma K, Yamaguchi A: Advances in cellular understanding of muscle wasting in cachexia. In: Watanabe HS, Ed. Horizons in Cancer Research Vol. 58, pp. 205-240, Nova Science Publishers, NY, 2015.
7. 佐久間邦弘. 骨格筋の再生 : ニュー運動生理学 (分担執筆), pp. 208-214, 編集: 宮村実晴 真興交易 (株) 医書出版部, 東京, 2014.

[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

6 . 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()