

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350818

研究課題名(和文) 運動刺激に対する骨格筋機能の適応における長寿遺伝子サーチュインの役割解明

研究課題名(英文) Some aspects of surtuin in exercise-associated adaptation of skeletal muscle

研究代表者

吉岡 利忠 (Yoshioka, Toshitada)

弘前学院大学・社会福祉学部・学長

研究者番号：50056933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：「運動は寿命を延ばすのか？」という疑問に対して、未だ明確な回答は得られていない。運動刺激の種類や強度は多種多様であり、こうした刺激に応じて生体は効果の発現あるいは障害の発生など適応を示す。つまり、運動刺激を受容し、その種類や強度を認識し、最適な適応を発現するシステムの存在が示唆されるが、その実体は不明である。本研究では、長寿遺伝子サーチュイン(SIRT)に、運動刺激に対する骨格筋応答におけるSIRTの役割を追究することを目的とした。実験動物ならびに培養骨格筋細胞を対象として検討した結果、運動刺激に対する骨格筋の適応現象にSIRTそのものの関与は低いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is still unclear that physical exercise is associated with a longer life span. Physical-exercise-associated intracellular and extracellular stimuli are diverse. Since physiological and anatomical systems of human body have a potential to adapt to these various stimuli, a sensory system in individual cells remains unknown. The purpose of this study was to investigate whether a longevity gene, so-called surtuin (SIRT), plays a role in skeletal muscle plasticity in response to exercise-associated stimuli using experimental animals and cell culture systems. Evidences of this study suggest that SIRT itself may not have a direct role in the adaptation of skeletal muscle in response to exercise stimuli.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 長寿遺伝子 萎縮 再成長

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームに代表される生活習慣病の発症は大きな社会問題となっている。生活習慣病の原因の1つに運動不足が挙げられていることから、運動不足は寿命に対して悪影響をもたらすことには異論はなく、広く運動が奨励されている。しかし、「どんな運動が寿命延伸に効果的なのか?」ということに対して明確な解答は得られていない。

(2) 運動刺激の種類や強度は多種多様であり、こうした刺激に応じて生体は効果の発現あるいは障害の発生など適応を示す。つまり、運動刺激を受容し、その種類や強度を認識し、最適な適応を発現するシステムの存在が示唆されるが、その実体は不明である。

カロリー制限は数多くの生物種で老化を遅延させ寿命を延長することが報告されている。これは栄養レベルの低下を細胞のエネルギーセンサーである AMP 依存性タンパクキナーゼ (AMPK) が感知し、NAD⁺/NADH 比を増加させて、長寿遺伝子サーチュイン SIRT を活性化してエネルギー消費を制御するシグナルを構成することによると考えられている。

(3) 運動はエネルギーを多量に消費するために、AMPK の活性化を介して SIRT 活性は上昇することが考えられる。しかし、運動は活性酸素など種々の代謝産物を発生する刺激でもあるため、エネルギーバランスのみで議論するのは危険である。特に、抵抗性運動により骨格筋は肥大するが、AMPK 活性は必ずしも上昇しない。むしろ、AMPK 活性化はタンパク合成促進因子である mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルを抑制し、タンパク分解系であるユビキチンリガーゼ発現を増加させる。したがって、AMPK の活性化は、骨格筋萎縮を招来することが示唆される。このように、運動刺激に対する SIRT 遺伝子の応答、特に骨格筋細胞内 SIRT 活性に及ぼす運動刺激の影響に関する知見はほとんどない。

(4) 最近、SIRT の活性化は、成長ホルモンによるインスリン様成長因子 1 (IGF1) の発現の抑制を介して、個体成長を抑制させる。運動刺激に対する生体応答において IGF1 の作用は重要であることは周知の事実であり、SIRT 活性化の生理学的意義について再考が必要となっている。

(5) SIRT は、様々な細胞ストレスに対する防御機構賦活化し、老化に伴う疾患を予防することで寿命延長に働くと考えられている。しかし、運動というエネルギーを多量に消費するだけでなく、活性酸素など種々の代謝産物を発生する刺激による SIRT の応答は不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、運動に対する骨格筋可塑性応答における SIRT の役割を追究することを目

的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究の目的を達成するために、動物 (*in vivo*) 実験と培養骨格筋細胞 (*in vitro*) 実験の 2 系統の実験から構成された。

(2) 生後 10 週齢の雄性マウス (C57BL/6J) および AMPK 活性が抑制されたマウスを用いて、2 週間の後肢懸垂を負荷し、抗重力筋であるヒラメ筋に廃用性萎縮を引き起こした。また、2 週間の後肢懸垂終了後、一部のマウスを通常飼育にて 2 週間の飼育を継続し、ヒラメ筋に対しての荷重を再開することで、萎縮筋を再成長 (回復) させた。後肢懸垂前、2 週間の後肢懸垂後ならびに懸垂終了後 2 週間の通常飼育後に、マウス後肢よりヒラメ筋を摘出した。摘出したヒラメ筋における AMPK 活性化レベルならびに SIRT 発現量を評価した。

(3) 哺乳類骨格筋細胞におけるストレス応答の転写因子である熱ショック転写因子 1 (HSF1) を欠損したマウス (HSF1 欠損マウス) を用いて、ヒラメ筋における SIRT 発現量を評価した。また、ヒラメ筋に対して cardiotoxin を筋注して、壊死 - 再生サイクルを惹起した。損傷からの再生過程におけるヒラメ筋を経時的に摘出した。摘出したヒラメ筋における AMPK 活性化レベルならびに SIRT 発現量を評価した。

(4) 培養細胞実験には、マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用いた。C2C12 細胞を播種後、増殖培地にて一定期間培養した後に、分化培地に交換して筋管細胞の分化を誘導した。筋管細胞に対してカフェインを投与し、筋タンパク量、筋管サイズ、AMPK 活性化レベルおよび SIRT 発現量を評価した。

(5) AMPK 活性化レベルならびに SIRT 発現量の評価は、Western blotting 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 生後 10 週齢のマウスを用いて、骨格筋量変化に伴う SIRT1 および AMP 依存性タンパクキナーゼ (AMPK) の変容の解析を行った。骨格筋量の変化は萎縮とその後の再成長とし、マウスに対して 2 週間の後肢懸垂を施し、萎縮を惹起した。一部のマウスを通常飼育に戻して、2 週間継続飼育して、萎縮骨格筋に再成長を促した。その結果、骨格筋の萎縮に伴い SIRT1 ならびに AMPK 発現量に変化は認めなかった。萎縮筋の再成長により SIRT1 および AMPK 発現量は共に有意に増大した。一方、AMPK 活性の抑制は、荷重除去による廃用性筋萎縮を軽減した。しかし、SIRT タンパク発現量に AMPK 活性抑制の影響は認められなかった。したがって、骨格筋に対する運動刺激の増加に応じて SIRT ならびに AMPK は活性化することが示唆された。

(2) HSF1 の欠損は、骨格筋における SIRT 発現量を増加させた。また、損傷骨格筋の再

生に伴い SIRT 発現量は同様に増加した。

(3) C2C12 細胞に対してカフェインを添加して AMPK を活性化させることで、筋タンパク量ならびに筋管サイズは減少した。しかし、SIRT タンパク発現量に変化は認めなかった。したがって、骨格筋細胞における SIRT 発現に AMPK の関与はしないことが示唆された。

(4) 以上の結果より、骨格筋の可塑性発現応答に SIRT 活性そのものの自身の関与は低いことが示唆された。

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 7 件)

Egawa, T., Ohno, Y., Goto, A., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Hayashi, T., Goto, K., Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice, *Br. J. Nutr.*, 査読有, Vol. 117, No. 1, 2017, pp. 21-29
DOI: 10.1017/S0007114516004591

Yokoyama, S., Ohno, Y., Egawa, T., Yasuhara, K., Nakai, A., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Okita, M., Origuchi, T., Goto, K., Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Physiol.*, 査読有, Vol. 217, No. 4, 2016, pp. 325-337
DOI: 10.1111/apha.12692

Ohno, Y., Matsuba, Y., Hashimoto, N., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Goto, K., Suppression of myostatin stimulates regenerative potential of injured antigravitational soleus muscle in mice under unloading condition. *Int. J. Med. Sci.*, 査読有, Vol. 13, No. 9, 2016, pp. 680-685
DOI:10.7150/ijms.16267

Egawa, T., Goto, A., Ohno, Y., Yokoyama, S., Ikuta, A., Suzuki, M., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Hayashi, T., Goto, K., Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 査読有, Vol. 309, No. 7, 2015, pp. E651-E662
DOI: 10.1152/ajpendo.00165.2015

Ohno, Y., Egawa, T., Yokoyama, S.,

Nakai, A., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Goto, K., Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of mice, *Acta Physiol.*, 査読有, Vol. 215, No. 4, 2015, pp. 191-203
DOI: 10.1111/apha.12600

Fujiya, H., Ogura, Y., Ohno, Y., Goto, A., Nakamura, A., Ohashi, K., Uematsu, D., Aoki, H., Musha, H., Goto, K., Microcurrent electrical stimulation facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice. *J. Sports Sci. Med.*, 査読有, Vol. 14, No. 2, 2015, pp. 297-303
<http://www.jssm.org/gecc.php?id=jssm-14-297.xml>

Ohno, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Goto, K., Loading-associated expression of TRIM72 and caveolin-3 in antigravitational soleus muscle in mice, *Physiol. Rep.*, 査読有, Vol. 2, No. 12, 2014, pp. e12259
DOI: 10.14814/phy2.12259

[学会発表](計 11 件)

Yokoyama, S., Ohira, Y., Yoshioka, T., Goto, K., Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses unloading-associated slow-to-fast transition of myosin heavy chain isoforms in mouse soleus muscle, 第 94 回日本生理学会大会, シンポジウム「宇宙生理学の新展開 - 臨床医学との融合 - 」, 2017 年 3 月 28 日~30 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

Nakamura, A., Ito, R., Ikegaya, N., Higa, M., Yokoyama, S., Ohno, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Baehr, L.M., Bodine, S.C., Goto, K., Nuclear and cytoplasmic muscleblind-like 1 in mouse skeletal muscle in response to aging and unloading with or without reloading, APS (American Physiological Society) Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise, 2016 年 11 月 2 日~4 日, Phenix (USA)

江川達郎, 林達也, 後藤勝正, 代謝センサーAMPK の骨格筋萎縮・肥大調節機構, 第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物科学学会第 30 回大会, ワークショップ「筋萎縮」, 2016 年 10 月 13 日~15 日, 愛知医科大学 (愛知県・長久手

市)

Goto, K., Yokoyama, S., Yasuhara, K., Nakai, A., Sugiura, T., Yoshioka, T., A role of heat shock transcription factor 1 in the regulation of slow type myosin heavy chain expression in mouse soleus muscle, FASEB Science Research Conferences “Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration”, 2016年7月24日~29日、Keystone (米国)

Goto, K., Ito, R., Yokoyama, S., Sugiura, T., Miyata, H., Ohira, Y., Yoshioka, T., A physiological role of skeletal muscle-derived adiponectin in C2C12 differentiation, Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease, 2016年6月6日~11日、Pacific Grove (USA)

Goto, K., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Expression level of importin and exportin of mouse skeletal muscle in response to unloading with or without reloading, 8th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress, 2015年11月22日~25日、Bangkok (Thailand).

Goto, K., Yokoyama, S., Suzuki, S., Ikuta, A., Ito, R., Ikegaya, N., Onimura, T., Higa, M., Nakamura, A., Egawa, T., Ohno, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., Typical responses of nuclear shape and distribution in skeletal muscle fibers in senescence-accelerated mice, International Conference on Biochemistry of Exercise (IBEC 2015), 2015年9月7日~9日、Sao Paul (Brazil)

Yoshioka, T., Yokoyama, S., Nishizawa, S., Koya, T., Ohno, Y., Nakai, A., Sugiura, T., Ohira, Y., Goto, K., A possible role of stress response in the transition of myosin heavy chain phenotypes of antigravitational soleus muscle in response to gravitational unloading, International Academy of Astronautics 2015 (IAA 2015), Human in Space Symposium, 2015年6月29日~7月3日、Prague (Czech Republic)

Goto, K., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., A role of stress response

in the regrowth and regeneration of skeletal muscle cells, Symposium IV “Adaptations to Microgravity” The 11th World Congress of of International Society for Adaptive Medicine (ISAM 2015), 2015年5月27日~30日、米子コンベンションセンター(鳥取県・米子市)

Goto, K., Ohno, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., A possibility of heat stress as a countermeasure for age-associated decreased of muscle mass, International Conference on Frailty & Sarcopenia Research (ICFSR) 2015, 2015年4月23日~25日、Boston (USA)

Yoshioka, T., Oda, H., Ota, N., Watanabe, A., Kitazawa, H., Igaki, M., Suzuki, A., Shimotoyodome, A., Hase, T., Sugiura, T., Goto, K., Skeletal muscle function and serum thiobarbituric acid reactive substances level are improved by the combination treatment of catechin-ingestion with heat stress in healthy elderly women, 43rd European Muscle Conference 2014 (EMC 2014), 2014年9月10日~14日、Salzburg (Austria)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 利忠 (YOSHIOKA, Toshitada)
弘前学院大学・社会福祉学部・教授
研究者番号：50056933

(2) 研究分担者

後藤 勝正 (GOTO, Katsumasa)
豊橋創造大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70239961