

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07180

研究課題名(和文) リボソーム生合成のエピジェネティクスに着目した老化骨格筋の肥大効率低下の機構解明

研究課題名(英文) Study on mechanism of reduced hypertrophic response in aged skeletal muscle focusing on ribosome biosynthesis

研究代表者

中田 智史 (Nakada, Satoshi)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・博士研究員

研究者番号：20778881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の骨格筋では筋肥大の効率が低下していることが知られており、サルコペニアからの回復が困難となる要因である。これまで我々は骨格筋肥大率とリボソーム生合成(RB)の関係の研究を行い、2つの間に強い相関関係があることを明らかにした。本研究ではRBと筋肥大率の間の因果関係を解明するために骨格筋肥大時にRB阻害剤を投与する実験を行った。その結果、RBの抑制に伴い筋肥大率が減少することが明らかになった。さらに老化マウスの骨格筋におけるRBの検証を行ったところ、加齢に伴う骨格筋量の減少に先行して中年期から軽度のRBの低下が起こること、翻訳効率の増加により中年期の軽度のRB低下が代償されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the efficiency of muscle hypertrophy is reduced in the skeletal muscle of the elderly, and this factor makes difficult to recovery from sarcopenia. We have studied the relationship between skeletal muscle hypertrophy and ribosome biosynthesis (RB) and clarified a strong correlation between them. In this study, to clarify the causal relationship between the degree of RB and the muscle hypertrophy rate, RB was inhibited using RB inhibitor during skeletal muscle hypertrophy. As a result, it appeared that muscle hypertrophy rate decreases by RB inhibitor administration. Furthermore, using the skeletal muscle of aged mouse, the relationship between sarcopenia and RB was examined. As a result, it was found that RB declines preceded a decrease of skeletal muscle mass with aging, and the increase of translational efficiency compensated the RB declines in middle-aged.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 筋肥大 リボソーム生合成 老化 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う筋力、筋量の減少はサルコペニアと呼ばれ、高齢化社会における高齢者の自立を阻む要因となっている。そのため、レジスタンストレーニングなどにより、筋量の維持・回復が推奨されるが、高齢者の骨格筋では筋肥大の効率が低下していることが知られており、サルコペニアからの回復が困難となる大きな要因になっている。高齢者の骨格筋で筋肥大の効率が減弱する原因については様々な要因が挙げられているものの、未だ完全には解明されていない。

これまで我々は、独自で改良した代償性肥大モデルを若齢ラットに施し、筋に過負荷をかけた際のリボソーム生合成について研究を行ったところ、過負荷を施した後の早期のリボソーム生合成の大きさとその後の筋肥大率の間に強い相関があることを見いだした。リボソーム生合成はタンパク合成の最下流であるタンパク翻訳の最大容量を決定することから、筋肥大の際のリボソーム生合成の大きさは骨格筋の筋肥大率を決定づける重要なファクターであると考えられる。同様に高齢者の骨格筋の筋肥大においても筋肥大率を高めるにはリボソーム生合成を高めることが重要になる可能性が考えられる。

加齢に伴うリボソーム生合成の低下が筋肥大効率低下の原因であるとする、運動処方や投薬と言った介入によってリボソーム生合成の低下を改善することができれば、高齢者においても筋肥大の効率を維持することができる可能性がある。

2. 研究の目的

そこで我々は高齢動物における骨格筋中のリボソーム生合成と骨格筋量、筋肥大効率の間の関係を明らかにすることを目的として、以下の課題に関して研究を行った。

課題①：リボソーム生合成と骨格筋量の間の因果関係の解明

課題②：高齢動物を用いた検討

3. 研究の方法

課題①：リボソーム生合成と骨格筋量の間の因果関係の解明

(実験動物) Wistar 系の雄ラットを用いた。ラットは2群にわけ、それぞれ CON 群(n=9)、AcD 群(n=10)とした。ラットは個別のケージに分け、室温 22°C、湿度 60%、12 時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料、飲水は自由摂取とした。

(リボソーム生合成阻害剤の投与) リボソーム生合成阻害剤として低用量のアクチノマイシン D (AcD) 投与を行った。AcD は mRNA、rRNA の合成を阻害する作用をもつが、低用量の投与では rRNA の合成を特異的に阻害することが知られている。AcD 群は AcD 214.3 μg/kg body weight を腹腔投与した。この投与量はラットにおいて mRNA 合成が阻害されないとされる投与量 500 μg/kg body weight 以下で、単回投与で 95% のラットが 3 週間生存したとする投与量 214.3 μg/kg body weight (Jhee

et al. 1965) を元にした。

(協働筋切除手術) 腹腔投与から 3 時間後、イソフルラン吸入麻酔下でラットの右の下腿に対して協働筋切除手術を施した。以降、手術を行った下腿の足底筋を OL、行わなかった下腿の足底筋を NL として表記する。

(筋のサンプリングとタンパク質合成の定量) CON 群、AcD 群の一部に対して (CON; n = 5, AcD; n = 4)、ピューロマイシンを用いた合成タンパク標識 (SUnSET 法) によるタンパク合成速度の測定を行った。ピューロマイシンはアミノアシル tRNA の 3' 末端に類似した構造を持ち、タンパク翻訳の際に誤って伸長中のポリペプチド鎖に取り込まれる。ピューロマイシン化されたタンパクを認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うことで、タンパク合成速度を算出することができる。手術から 5 日後、解剖の 12 時間前に飼料を除いた。12 時間の絶食の後、ラットはイソフルランによる吸入麻酔下で腹部を開き、後大静脈を露出した。その後、ピューロマイシン 0.04 mmol/kg body weight を後大静脈から静脈投与した。投与 15 分後、クレンメによって腹大動脈を阻血し足底筋への血流を止めた後、心臓に切れ目を入れ放血屠殺を行った。その後、足底筋の摘出を行った。

(RNA の抽出) 液体窒素下で粉末化した足底筋を 50mg 分取し、Isogen 750μl を加え、ポリトロンホモジナイザーによって均一化した。その後、遠心分離を行い、上清を回収し、室温にて 5 min インキュベートした。その後、クロロホルムを 150μl 加え、ボルテックス後、室温にて 3 min インキュベートを行った。これを遠心分離し、水層を全て採取した。回収した水層にイソプロパノール 375 μl 加え、ボルテックス後、室温で 10 min インキュベートを行った。その後、遠心分離し、上清を捨て 70% エタノール 1000μl を加えた。ボルテックス後、遠心分離し、ペレットを採取した。得られた RNA ペレットは風乾後、200μl の DNase、RNase フリーの TE バッファ (pH 8.0) に溶解した。

(rRNA の定量) 筋 125μg 分に相当する RNA 抽出液を蛍光色素と混濁後、1% アガロースゲルによって 60mA の定電流で 30 min 電気泳動を行った。泳動を終えたゲルは UV 励起によりバンドの可視化後、撮影を行った。得られた画像から 18S と 28S の rRNA に相当するバンドを ImageJ によって定量を行った。定量した値は CON_NL の平均値を 1 として表した。電気泳動の際に 6 つの実験条件 (NL and OL × 3 群) は直接比較ができるように同じゲル上で泳動を行った。また、全てのゲルに同一のサンプル 1 つを流すことでゲル間の補正を行った。

(ウェスタンブロッティング) 液体窒素下でパウダー化した筋サンプルを 50mg 分取し、プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含む氷冷した RIPA バッファを加え、ポリトロンホモジナイザーによって均一化した。ホモジナイズ後、遠心分離し、上清を回収し、

タンパク抽出サンプルとした。タンパク抽出サンプルのタンパク濃度はタンパク濃度測定キットにより測定した。測定した値を元にタンパク抽出サンプルは全てのサンプルのタンパク濃度が一定になる様に希釈し、サンプルバッファーと混合し、95°Cで5min加熱し、ウェスタンブロッティング用サンプルとした。

等量のタンパク質(50 μ g)を含むウェスタンブロッティング用サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離後、PVDF膜にタンパク質を転写した。TBSTで洗浄後、5% スキムミルク in TBSTでブロッキングを行った(室温1時間)。次に抗 Puromycin 抗体を用いて1次抗体反応を行った(4°C, 0/N)。1次抗体反応後、TBSTで洗浄後、2次抗体反応を行った(室温, 1時間)。二次抗体反応終了後、TBSTによってメンブレンを洗浄し、発光試薬を用いてバンドを化学発光させ、冷却 CCD カメラで撮影後、ImageJ を用いて発光強度を定量した。定量した値はタンパク合成速度として用いた。

課題②：高齢動物を用いた検討

(実験動物) C57BL/6 系の雄、雌マウスを用いた。マウスは週齢によって3群にわけ、それぞれ YG 群(12~15週齢)、MA 群(40~60週齢)、OD 群(100週齢以上)とした。マウスは、室温 25°C、湿度 60%、12 時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料、飲水は自由摂取とした。雌雄はそれぞれ別に集計し、解析を行った。

(骨格筋のサンプリング) マウスは頸椎脱臼による安楽死を行った後に、骨格筋のサンプリングを行った。腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出し、重量を測った後に、-80°Cで凍結し、以降の解析まで保存した。

(脛骨長の測定) 齧歯類など実験動物では体格による骨格筋量の補正は体重がもっとも多く使われるが、加齢により脂肪量が増加する場合、体重による補正は骨格筋量の過小評価につながる可能性がある。そこで脛骨長を測定し、体格による骨格筋量の補正に用いる。

骨格筋のサンプリングの後に膝関節を切断することで脛骨を含む下腿を得た。下腿は 2ml チューブへ超純水と共に入れ、85°Cで一晩加熱した。加熱が終わった下腿は流水中で徒手により解すことで腱や骨格筋を除去し、脛骨を得た。脛骨はデジタルノギスを用いて長さを測定した。

(RNA 抽出と rRNA の定量) 腓腹筋を用いて rRNA の定量を行った。RNA の抽出と rRNA の定量は課題①と同様の方法により行った。定量した値は YG 群の平均値を 1 として表した。

(ウェスタンブロッティング) 腓腹筋を用いて p70S6K リン酸化(Thr389)量の定量を行った。定量は課題①と同様の方法により行った。

4. 研究成果

課題①：リボソーム生合成と骨格筋量の間
の因果関係の解明

(筋肥大について) 筋重量/体重の増加は

AcD 投与によって抑制された(図 1(a))。また rRNA 増加率と筋重量/体重増加率の関係から、rRNA 増加率が低下するにつれて筋重量/体重の増加率が低下する様子が観察された。

(リボソーム生合成について) CON では過負荷によって rRNA 量が約 2 倍に増加することが確認された(図 1(b))。一方、AcD 群は CON 群の増加量から約 25%減少していた。そのため、今回投与した AcD は rRNA の増加を抑制することでリボソーム生合成を抑制できたと考えられる。

しかし一方で、rRNA 量の増加は完全に抑えることはできなかった。この原因は AcD の投与量と投与方法にあると考えられる。今回の実験ではラットの生存と体調を最優先に行ったため AcD は単回投与とし、その投与量も少ない量を用いている。そのため、rRNA 合成の抑制は部分的な抑制に留まったと考えられる。

リボソーム生合成増加率と筋重量/体重増加率には相関関係が見られた。

(タンパク合成速度について) ピューロマイシンによるタンパク合成速度測定より、CON 群 OL では筋への過負荷によってタンパク合成速度が NL に比較し約 3.5 倍になることが確認された。また、AcD 群の結果から、AcD 投与によってタンパク合成速度は低下する傾向にあるものの、有意な差が見られなかった。これはタンパク合成速度の測定に用いた個体数(n=5)が少なかったことによると考えられる。

(リボソーム生合成増加率と筋重量/体重増加率の関係) リボソーム生合成増加率と筋重量/体重増加率には有意な相関関係が見られた(図 2)。このことからリボソーム生合成が阻害されることで骨格筋重量の増加も抑制されることが明らかとなった。

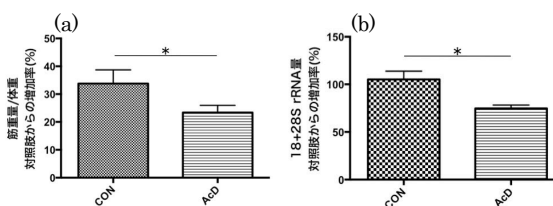


図 1. (a)筋重量/体重の増加量 (b)rRNA の増加量

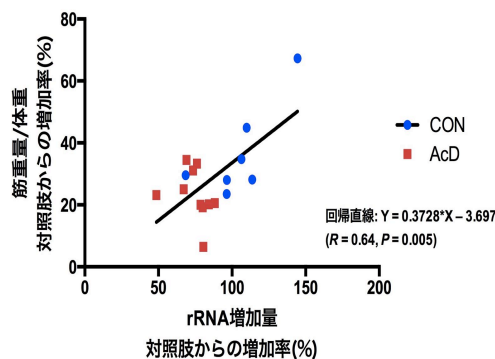


図 2. rRNA 増加率と筋重量/体重の増加率の関係

(まとめ) これらのことから協働筋切除によって引き起こされる筋肥大の際には rRNA の増加、つまりリボソーム生合成の増加が大

きな影響を持っていると推察される。課題①の成果は第 71 回日本体力医学大会において発表を行った。現在、論文投稿準備中である。

課題②：高齢動物を用いた検討
(骨格筋量の加齢変化について)

脛骨長で補正した筋重量を図 3 に示す。脛骨長補正筋重量は腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋全ての OD 群で有意に低下しており、腓腹筋で 39%、足底筋で 28%、ヒラメ筋で 25%の低下が見られた。このことから 50 週齢程度ではサルコペニアは起きていないが、100 週齢ではサルコペニアが起きていることが確認できた。

(リボソーム RNA 量の加齢変化について)
腓腹筋中の 18+28S の rRNA 量の加齢変化を図 4 に示す。YG 群に比べて MA 群の rRNA 量は 14% 減少、OD 群では 26%の減少が見られた。このことから 50 週齢程度でも加齢に伴う rRNA の減少がすでに起きており、100 週齢になるとその減少がさらに大きくなることが確認できた。

(p70S6K リン酸化について) 腓腹筋中の p70S6K(Thr389)のリン酸化量は Y0 群、OD 群に比べて MA 群では増加する傾向が見られた。

(まとめ) これらのことから骨格筋では加齢に伴い rRNA 量が減少するが、その減少は骨格筋量の減少に先行して起こる可能性があることが明らかとなった。中年期での rRNA 量の減少は p70S6K の活性化により代償されることで骨格筋の減少が起きていない可能性が考えられる

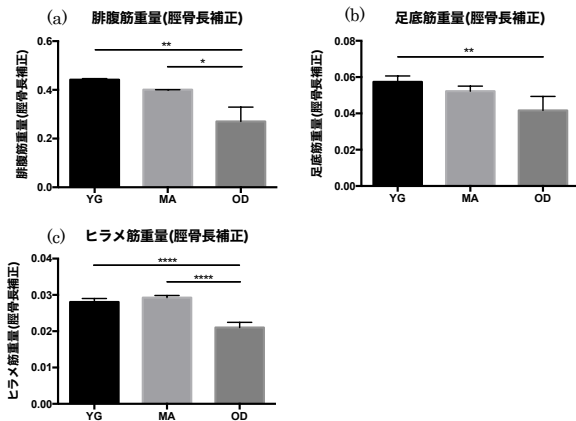


図 3. 脛骨長補正骨格筋量の加齢変化

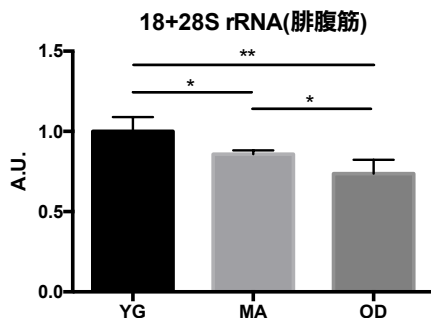


図 4. 腓腹筋リボソーム RNA 量の加齢変化

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) Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Nara T, Furuya N, Miida T, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E, Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle. *Sci Rep.* 2018 May 17;8(1):7766. 発行年:2018 年 5 月 査読の有無:有り doi: 10.1038/s41598-018-25635-x.

(2) Maekawa T, Ogasawara R, Tsutaki A, Lee K, Nakada S, Nakazato K, Ishii N, Electrically evoked local muscle contractions cause an increase in hippocampal BDNF. *Applied Physiology, Nutrition Metabolism*, 2018 Mar 20:1-6. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2018 May;43(5):491-496. 発行年:2018 年 3 月 査読の有無:有り doi: 10.1139/apnm-2017-0536.

(3) Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Urao M, Yamataka A, The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatr Surg Int.* 2018 Feb;34(2):143-147 発行年:2018 年 2 月 査読の有無:有り doi: 10.1007/s00383-017-4181-5.

(4) Madarame H, Nakada S, Ohta T, Ishii N, Postexercise blood flow restriction does not enhance muscle hypertrophy induced by multiple-set high-load resistance exercise. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2018 May;38(3):360-365. 発行年:2017 年 4 月 査読の有無:有り doi: 10.1111/cpf.12421.

[学会発表] (計 7 件)

(1) Arikawa-Hirasawa E, Nakada S, Yamashita Y, Hattori N. The Role of Perlecan in nNOS Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle. 第 23 回世界神経学会、京都、ポスター発表(査読有り)

(2) Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Hattori N.
Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan regulates metabolic dynamics.
第 23 回世界神経学会、京都、口頭発表(査読有り)

(3) 中田智史、町田修一、鈴木友子、平澤恵理
「nNOS 局在変化を介した骨格筋萎縮における基底膜分子パールカンの役割」
第 3 回日本筋学会、東京、口頭発表

(4) 中田智史、町田修一、平澤恵理
「力学的負荷減弱時の骨格筋メカノトランスダクションにおける基底膜分子 Perlecan の役割」
第 49 回日本結合組織学会、三重、ポスター発表

(5) 須藤壘、厚澤雄二、服部俊治、水野一乗、中田智史、平澤恵理
「脱細胞化マウス筋-関節系の作成」
第 49 回日本結合組織学会、三重、ポスター発表

(6) 小谷鷹哉、中田智史、竹垣淳也、高木領、東宮繁人、葛木新、中里浩一、石井直方
「レジスタンストレーニング回数の違いがリボソーム生合成におよぼす影響」
第 71 回日本体力医学大会、岩手、ポスター発表

(7) 中田智史、小谷鷹哉、石井直方
「リボソーム生合成の薬理的阻害が筋肥大に及ぼす影響」
第 71 回日本体力医学大会、岩手、ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 智史 (Nakada, Satoshi)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・研究員

研究者番号：20778881