

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18680048

研究課題名(和文) 骨格筋の萎縮、再生、肥大に関する分子メカニズムの解明と老化制御

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of muscle atrophy, regeneration, hypertrophy and aging regulation.

研究代表者

町田 修一 (MACHIDA SHUICHI)

東海大学・体育学部・准教授

研究者番号：40421226

研究成果の概要：

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症機序の詳細については十分に解明されていない。骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし加齢に伴いその再生能力は失われていくことが知られている。我々は、サルコペニア発症の分子メカニズムを解明するために、加齢に伴って骨格筋の再生能力がどのように変化するのか、また、変化の原因が何であるのかを分子、細胞レベルで検討し、いくつかの新しい知見を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,800,000円	2,940,000円	12,740,000円
2007年度	8,100,000円	2,430,000円	10,530,000円
2008年度	4,400,000円	1,320,000円	5,720,000円
年度			
年度			
総計	22,300,000円	6,690,000円	28,990,000円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 スポーツ科学

キーワード：筋萎縮、筋再生、老化、幹細胞、筋サテライト細胞、サルコペニア、脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症機序の詳細については十分に解明されていない。サルコペニアはADL(日常生活動作)やQOL(生活の質)の低下に加えて、基礎代謝の低下から生活習慣病に罹りやすくなるおそれがある。2014年には4人に1人が65歳以上の本格的な高齢社会を迎える本邦において、ゆとりと豊かに満ちた社会を実現するためには、

ひとりひとりが高齢になっても自由で自立した生活を営めることが鍵となる。したがって、加齢に伴うサルコペニア発症のメカニズムを解明し、その改善および予防のための対策を講じることは今後益々重要となると思われる。

骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし加齢に伴いその再生能力は失われていくことが知られている。骨格筋は、多核の筋線維から構成されているが、筋線維の筋形質膜と基底膜の間には筋衛星(サテライト)細胞と

呼ばれる単核の細胞が存在する。骨格筋が損傷や過負荷(トレーニング)等を受けると、筋サテライト細胞は増殖因子やサイトカイン等の刺激で活性化されて増殖を開始し、筋前駆細胞(筋芽細胞)となる。増殖した筋サテライト細胞は、互いに、あるいは既存の筋線維と細胞融合することによって筋組織を再構築し肥大を促す。そのため、筋の再生能力の大半は筋サテライト細胞によって担われていると考えられている。しかし、筋サテライト細胞は加齢に伴い数(量的)および増殖機能(質的)が低下することが知られている。しかし、現時点では、筋サテライト細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構は多くが未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、サルコペニア発症のメカニズムを解明するために、先端技術(DNA チップ等)を応用して (1) 筋サテライト細胞の増殖機能を制御する内因性因子(転写因子や細胞内情報伝達系など)の同定、(2) 筋再生時に筋サテライト細胞の増殖を促進もしくは抑制する外因性因子(増殖因子やサイトカイン)の同定、(3) 筋サテライト細胞を脂肪細胞へ分化転換させる因子の同定を試みた。加齢に伴って骨格筋の再生能力がどのように変化するのか、また、変化の原因が何であるのかを解明し、高齢者における運動機能の低下予防に役立てようとするのが本研究の主たる目的であった。

## 3. 研究の方法

(1) 高齢期骨格筋の再生能低下と脂肪蓄積を制御する外因性因子の同定。

実験動物: 若年期(3月齢、Y群、n=18)および高齢期(30月齢、O群、n=18)の雄性ラットを実験動物として用いた。本研究で用いたラットは米国NI A(National Institute on Aging)で作成されているハイブリッドラット(F344 × Brown Norway)であり、雄ラットの平均寿命は36ヶ月齢である。

筋再生モデル: Marshら(1997)の方法に基づき、両年齢群ラットの両脚前脛骨筋に0.5%塩酸ピバカインをそれぞれ0.5mL投与し、筋損傷を誘発し、その後安静飼育を行った。筋損傷後0(損傷無し)、1、3、7、14、21日目において、Y群およびO群それぞれの各実験群ラットより右脚前脛骨筋を摘出し、連続凍結切片を作成し、免疫組織染色法により筋サテライト細胞(Pax7)とC/EBPalpha陽性細胞、さらにマクロファージ(ED1)等を比較検討した。その他に一般的な病理所見、筋線維数および総核数を把握するためにヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を、さらに脂肪蓄積を評価するためにOil O Red染色を実施した。

網羅的遺伝子発現解析: 加齢に伴い筋再生筋で特異的に発現変動する遺伝子群を網羅的に検討するため、両群の左脚再生筋(筋損傷後0、3、7日目)より total RNA を抽出し、DNA チップ

解析を実施した。抽出した total RNA よりマイクロプローブ(cRNA)を合成し、DNA チップ(Affymetrix 社製 Rat Genome 230 2.0 Array)とハイブリダイゼーションさせた。そして、ラットの約31,000個の遺伝子の中から、再生筋で加齢特異的発現を示す候補遺伝子を同定した。さらに、同定された候補遺伝子群の発現を RT-PCR 法においても確認し、筋サテライト細胞の増殖や筋分化、そして脂肪細胞の分化に関連する増殖因子やホルモン、もしくはサイトカインなどを選択した。

(2) 筋サテライト細胞の増殖機能を制御する内因性因子の同定。

実験動物: 若年期(3月齢、Y群、n=5)および高齢期(30月齢、O群、n=5)の雄性ラットを実験動物として用いた。

培養方法: Y群およびO群のラットより両脚下肢骨格筋(ヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、前脛骨筋、腓腹筋)を摘出し、Machidaら(2003)の方法に基づき、筋サテライト細胞を単離し初代培養を行った。培養時の筋サテライト細胞の増殖能はMachidaら(2004)の方法に基づき検討した。筋サテライト細胞の増殖機能を制御する内因性因子として、各細胞内情報伝達系[MAPK(ERK1/2, p38, JNK), PI3K/Akt, GSK3beta, p70, FOXO1, JAK/STAT(STAT3), Ca<sup>2+</sup>/ Calcineurin]について、ウエスタンブロット法を用いて検討を行った。なお、今回実験に用いられた初代培養細胞群は、免疫染色法によって Pax7 および Desmin 陽性細胞が90%以上であることが確認された。

(3) 筋サテライト細胞を脂肪細胞へ分化転換させる因子の同定。

実験動物: 成熟期(6-7月齢、A群、n=6)および高齢期(31-32月齢、O群、n=6)の雄性ハイブリッドラット(F344 × Brown Norway)を実験動物として用いた。各ラットの両脚の主要下肢骨格筋(腓腹筋、足底筋、前脛骨筋、大腿四頭筋)より筋サテライト細胞(Pax7 および Desmin 陽性細胞が90%以上である細胞群)を単離し、コラーゲンコートされた培養皿で80-90%コンフルエントになるまで増殖培地にて培養した。その後、脂肪細胞分化誘導培地(Cambrex Bioscience 社製)、もしくは筋細胞分化誘導培地に交換し、多分化能について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 高齢期骨格筋の再生能低下と脂肪蓄積を制御する外因性因子の同定をするために実験を行った。その結果、高齢期再生筋3日目では、若年期と比較して HGF、IGF-1、TGF-beta1 等の多数の増殖因子、さらに炎症性サイトカインやケモカイン(IL-10、CCR2、CCL2 等)の遺伝子発現の上昇が抑制された。また7日目においても、3日目同様に高齢期再生筋の内因性因子の遺伝子発現の増加が抑制された。さらに、筋損

傷時に内因性因子の産生に関与すると思われるマクロファージの動態について免疫組織化学的に検討したところ、高齢期再生筋ではマクロファージ(ED1陽性細胞)数が若年期と比較して低値を示した。以上の結果より、加齢に伴う骨格筋での再生能低下および脂肪蓄積のメカニズムとして、マクロファージ関連の増殖因子やサイトカインの欠如(減少)が関与することが示唆された。

(2) 筋サテライト細胞の増殖機能を制御する内因性因子を同定するために実験を行った。今回単離した高齢期筋サテライト細胞の増殖能は、若年期と比較して有意に低値を示した。増殖能が低下した高齢期筋サテライト細胞では、ERK1、p38、JNK、Akt、FOXO1 のリン酸化が相対的に抑制されていることが認められた。その一方で、加齢に伴い GSK3beta と STAT3 のリン酸化が認められた。さらに高齢期では、核内での GSK3beta と STAT3 の蓄積が認められた。以上の結果より、加齢に伴う筋サテライト細胞の増殖機能低下に GSK3beta や STAT3 の細胞内情報伝達系が関与することが示唆された。現時点では、筋サテライト細胞における GSK3beta と STAT3 の役割については不明であるが、サルコペニア発症の分子メカニズムを解明するうえで興味深い知見である。

(3) 筋サテライト細胞を脂肪細胞へ分化転換させる因子を同定するため、高齢期筋サテライト細胞の多分化能について検討を行った。まず、高齢期骨格筋より単離した筋サテライト細胞を増殖培地にて培養し、その後、筋分化誘導培地で筋(管)細胞に分化することを確認した。次に、同様に単離・培養された高齢期筋サテライト細胞を脂肪細胞への分化誘導培地で培養した結果、形態的に脂肪細胞の特徴を有し、Oil Red O で染色される多くの細胞が認められた。また、それらの細胞群では脂肪細胞の転写制御因子である C/EBPalpha の発現が核に特異的に認められた。さらに、高齢期筋サテライト細胞の脂肪細胞へと分化転換する割合は、成熟期筋サテライト細胞と比較して、同様もしくは増加する傾向が認められた。以上の結果より、ラット高齢期筋サテライト細胞では、筋細胞だけでなく、脂肪細胞に分化転換する能力を有しており、多分化能が維持されていることが確認された。そして、転写因子 C/EBPalpha が筋サテライト細胞を脂肪細胞へ分化転換させる重要な因子である可能性が示唆された。

## 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 9 件)

Ogata T., Machida S., Oishi Y., Higuchi M. and Muraoka I. Differential cell death

regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* 130: 328-336, 2009. 査読有

Suzuki T., Maruyama A., Sugiura T., Machida S. and Miyata H. Age-related changes in two- and three-dimensional morphology of type-identified endplates in the rat diaphragm. *The Journal of Physiological Sciences*, 59: 57-62, 2009. 査読無

町田修一, 岡本武志, 分子レベルからみた力学的ストレスに対する筋・骨格系の細胞応答, *体育の科学*, 57: 357-364, 2007. 査読無

町田修一, 加齢性筋萎縮と骨格筋幹細胞, *基礎老化研究*, 31: 23-25, 2007. 査読無

町田修一, 加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)発症の分子機構の解明とその治療・予防法の開発, *The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine* 44: 144-149, 2007. 査読無

Machida S. and Narusawa M. The roles of satellite cells and hematopoietic stem cells in impaired regeneration of skeletal muscle in old rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067: 349-353, 2006. 査読有

町田修一, IGF-1 シグナルと骨格筋老化, *基礎老化学研究*, 30: 23-30, 2006. 査読有

町田修一, サルコペニアの分子機構, *ファルマシア*, 42: 994-998, 2006. 査読有

町田修一, 筋肥大とIGF-1, *ホルモンと臨床*, 54: 899-905, 2006. 査読無

(学会発表)(計 17 件)

[招待講演、シンポジウム講演]

町田修一, 老化に伴う骨格筋萎縮の分子機構の解明とその抑制策としての運動の有用性, 「産学官連携プロジェクト・健康医科学研究」2009年公開シンポジウム, 東京, 2009年3月.

町田修一, 石井直方, 今後の骨格筋研究の方向性を探る, 第62回日本体力医学会, 秋田, 2007年9月.

Machida S., Regeneration of aging skeletal muscle is associated with impaired inflammation and increased adipogenesis. 12th Annual Congress of the European College of Sport Science(ECSS), JSPFSM Exchange Symposium, Jyväskylä(Finland), July 2007.

町田修一, 寝たきりを防ぐための基礎研究: サルコペニアのメカニズムとその予防・改善のための提言, 第139回日本体力医学会関東地方会, 東京, 2007年3月.

町田修一, 高齢期骨格筋での筋再生能低

下のメカニズム, 第 61 回日本体力医学会, 神戸, 2006 年 9 月.

町田修一, 加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)発症の分子機構の解明とその治療・予防法の開発. 第 43 回日本リハビリテーション医学会, 東京, 2006 年 6 月.

Machida S., Skeletal muscle stem cells and age-related muscle atrophy, Sarcopenia. The 6th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon (Korea), June 2006.

【一般発表(海外)】

Machida S. and Okamoto T., The impaired inflammatory response to muscle damage contributes to the impaired muscle regenerative capacity and to increased muscle adiposity with aging. The Integrative Biology of Exercise V, South Carolina (USA) September 2008.

Machida S., Tabata I. and Narusawa M. „Activation of adipogenic program in impaired regeneration of aged skeletal muscle. Experimental Biology 2006, San Francisco (USA), April 2006.

【一般発表(国内)】

町田修一, 岡本武志, 高齢期骨格筋の脂肪蓄積に関するメカニズム 加齢に伴う筋サテライト細胞の多分化能について, 第 63 回日本体力医学会, 大分, 2008 年 9 月.

岡本武志, 町田修一, 不活動性筋萎縮時に発現する筋特異的ユビキチンリガーゼ遺伝子は筋線維特異性を持つのか?, 第 63 回日本体力医学会, 大分, 2008 年 9 月.

春日規克, 石道峰典, 竹倉宏明, 町田修一, 骨格筋回復期の単一筋線維内における筋衛星細胞の動態, 第 63 回日本体力医学会, 大分, 2008 年 9 月.

宮田浩文, 杉浦崇夫, 町田修一, 筋線維タイプを同定した endplate の三次元構造特性の加齢変化, 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.

春日規克, 石道峰典, 町田修一, 竹倉宏明, 筋損傷後の筋形成制御因子の発現様式と筋衛星細胞の動態, 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.

小川貴志子, 真田樹義, 町田修一, 奥津光晴, 寺田修, 鈴木克彦, 後期高齢者の筋力トレーニングによる筋肥大と血中炎症指標の関係, 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.

町田修一, 高齢期骨格筋幹細胞 (筋サテライト細胞)の細胞内情報伝達系の特徴, 第 30 回日本基礎老化学会, 札幌, 2007 年 6 月.

町田修一, 鈴木友子, 高齢期骨格筋の再

生能低下を制御する因子の探索 : 網羅的遺伝子発現解析を用いた研究, 第 61 回日本体力医学会, 神戸, 2006 年 9 月.

【図書】(計 2 件)

【著書】

町田修一(分担執筆), 老化制御・運動, 新老年学第 3 版(大内尉義・秋山弘子編集代表), 東京大学出版会, 2009 年 11 月予定.  
町田修一(分担執筆), サルコペニアモデル動物の評価, 老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック(日本基礎老化学会編), アドスリー, 202-210 頁, 2008.

【その他】

【学会賞】

町田修一, 第 30 回日本基礎老化学会奨励賞 (札幌), 2007 年 6 月.

【研究室ホームページ】

<http://pubweb.cc.u-tokai.ac.jp/machida-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 修一 (Machida Shuichi)

東海大学・体育学部・准教授

研究者番号: 40421226

(2)研究分担者

該当者無

(3)連携研究者

該当者無

(4)研究協力者

鈴木 友子 (SUZUKI YUKO)

国立精神・神経センター・神経研究所・室長

研究者番号: 00342931

岡本 武志 (OKAMOTO TAKESHI)

東海大学・体育学部・非常勤講師

研究者番号: 無