

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008□ 2010

課題番号：20500575

研究課題名（和文）

習慣的な自発性走運動は、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）を抑制するか？

研究課題名（英文）Does habitual voluntary exercise attenuate sarcopenic symptom?

研究代表者

佐久間 邦弘（SAKUMA KUNIHIRO）

豊橋技術科学大学・総合教育院・准教授

研究者番号：60291176

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SRF関連物質の変化を調べた。加齢した骨格筋では、SRFおよびMRTF-A蛋白の有意な減少がみられ、SRF蛋白は細胞質、MRTF-Aは核でその変化が顕著であった。SRF経路の上流にあるSTARSの発現量も、加齢にともない有意に減少した。自発的な走運動はサルコペニア(加齢性筋肉減弱症)を軽減したが、SRF関連物質に顕著な変化は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Using senescent mice (24-month-old), I investigated the adaptive changes in SRF-linked molecule in skeletal muscle. In aged mice, we observed the marked reductions in the amount of SRF (in cytosol fraction) and MRTF-A (nuclear fraction) proteins in quadriceps muscle. The expression levels of STARS, a possible SRF-upstream mediator, were also decreased in the muscle. Although voluntary exercise attenuated the sarcopenic symptom, there is no significant change in SRF-linked molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 スポーツ生化学

キーワード：加齢、骨格筋、運動、筋肥大、サルコペニア、SRF

1. 研究開始当初の背景

人生 80 年代にふさわしい、ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するために、高齢化に対する研究が様々な学問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をすることが、肩こりや肥満あるいは精神的なストレスを軽

減してくれる。加齢にともない筋力が著しく低下することをサルコペニア(加齢性筋肉減弱症)というが、超高齢化社会を迎える我が国において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。サルコペニアを軽減するための定期的な運動の重要性について経験的に知られているが、実際の

ところこの現象に対する科学的証明はあまりなされていない。

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対象物でも、徐々に上がらなくなるという経験も高齢の方なら誰でも経験することだと思ふ。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 (SRF, 筋分化因子) が減少することが挙げられる。この SRF は筋分化制御遺伝子として有名な MyoD の mRNA 発現を促し、宇宙飛行モデルである後肢懸垂や短縮固定といった不活動状態の筋において、発現量が著しく減少する (Gordon et al. 2003)。また成熟した実験動物(ラット)の骨格筋肥大モデルにおいても、筋肥大に重要な衛星細胞 (satellite cell) に SRF 活性が認められることも我々は以前証明した (Sakuma et al. Histochem Cell Biol 119: 149-160, 2003)。この SRF は骨格筋の形態維持に関係する様々な蛋白質(アクチン, デスミン, ミオシン軽鎖)を作り出すために働いているが、その際には myocardin-related transcription factor (MRTF) と協力していることが最近の研究で明らかになってきた。

加齢期の萎縮筋(24ヶ月齢)と若齢の成熟筋(3ヶ月齢)においてこの SRF、MRTF の発現量を比較したところ、大腿四頭筋と上腕三頭筋の両方で加齢にともなう SRF 蛋白質の有意な減少が認められた。また蛍光免疫組織染色における検討でも、核内に発現する SRF 蛋白質が加齢筋において減少する傾向にあった。RT-PCR 法による解析においても、加齢にともなう MRTF の有意な減少が観察された (佐久間: 第 50-51 回日本体力医学会大会発表, Biochimica et Biophysica Acta 再投稿中)。

一方、最も有名な筋肥大促進経路である Akt-mTOR (mammalian target of rapamycin) は、蛋白合成を促すだけでなく、筋萎縮を促進する FOXO (Forkhead box 0) の働きを妨害する。このことにより Akt-mTOR 経路は、積極的な蛋白分解を阻止することでも筋肥大に大きく貢献している。実際にヒトを対象にした我々の不活動実験においても、筋筋萎縮にともない活性化型 Akt 蛋白質の有意な減少が確認されている (Med Sci Sports Exerc 投稿中)。しかしながらこの Akt-mTOR 経路の構成物質 (Akt, mTOR, p70S6K など) は、加齢筋での量的な変化がほとんど検討されていない

加齢期の運動の効果を検討するその大部分が、トレッドミルを用いた強制的な運動を用いていて、期間も長くて3ヶ月程度である。この運動方法の場合、実験動物が走らない時には電気刺激によるショックを与えることになるが、これがかなりのストレスとなる。そこでストレスのより少ない自発回転ケージを、本研究では採用する予定である。これによりマウスは好きな時に自由に走行する(トレーニングする)ことができる。また習慣的な運動が骨格筋に及ぼす効果を見るためにも、約6ヶ月間の長期に渡り走運動を行なわせた。

2. 研究の目的

本研究では、高齢の実験動物(マウス)に自発的で長期間の運動を行わせ、以下の3つについて検証を行う。

- 1) 骨格筋内における SRF 関連物質 (STARS, SRF, MRTF) の加齢にともなう変化をより詳細に調べる。
- 2) 筋肥大に最も重要だと考えられている Akt-mTOR 経路構成物質 (Akt, mTOR, p70S6K) の蛋白発現量を、加齢した骨格筋において調べる。
- 3) 習慣的な自発的走運動は、筋萎縮を抑制するか? またその運動は、加齢した筋の SRF 関連物質 (STARS, SRF, MRTF) および Akt 関連物質 (Akt, P70S6K, mTOR) の発現量を増加(改善)させるのかどうかについて調べる。

3. 研究の方法

◎平成20年度

加齢筋における SRF (筋分化因子)、MRTF 蛋白質の分布様相を分画後のサンプルを用いた Western blot、蛍光免疫組織染色でより詳細に調べる。

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(現有設備)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。ラットの骨格筋を用いた我々の先行研究で、この方法により2種類の蛋白質(プレセニン1とニカ

ストリン)の細胞内局在を検出することに成功している (Sakuma et al. Biochimica Biophysica Acta General Subjects 1760: 980-987, 2005)。分画後の各Homogenateを蛋白定量した後、SRF関連物質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 etc)を同定し、安静時の衛星細胞核はc-Met (マウス)あるいはm-Cadherin (ヤギ)に対する抗体で識別する。SRF(ヤギ)、MRTF (ウサギ)に対する一次抗体には、それぞれ抗マウス-FITCあるいは抗マウス-Rhodamine、抗ヤギ-FITC、抗ウサギ-Rhodamineの二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡解析システム (オリンパス DP-70, 現有設備)により蛍光観察を行う。これらの方法により、SRF、MRTF蛋白の細胞内局在様相を若齢と加齢した筋で比較検討する予定である。

◎平成21-22年度

筋肥大に最も重要だと考えられているAkt-mTOR 経路構成物質 (Akt, mTOR, p70S6K) の蛋白発現量を、加齢した骨格筋において調べる。



図1 自発回転ケージで運動するマウス
飼育ケージと回転ケージが一体型となっており、マウスは自分の好きな時間に、自分のペースで運動することができる。水と餌は自由摂取。

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(現有設備)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 (Fraction)に分離する。SRF解析の時と同様に、分画後の各Homogenateを蛋白定量した後、活性化型Akt (P-Akt)、活性化型mTOR、活性化型p70S6Kの量的な変化を解析する。

自発的な走運動が骨格筋内のSRF関連物質、Akt関連物質の発現量を亢進させるかどうかについて調べる

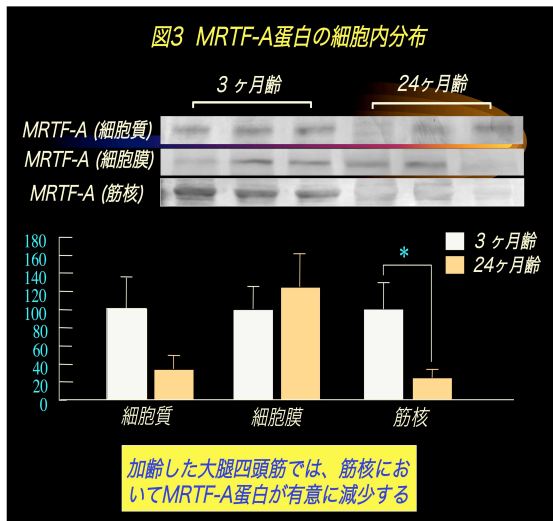
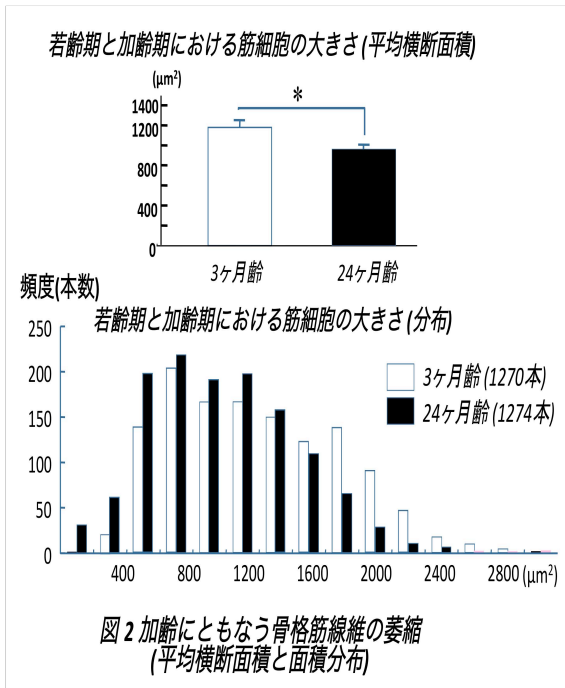
ストレスの少ない自発的で習慣的な走運動が、サルコペニア(加齢性筋肉減弱症)を軽減するかどうか? その場合には、2種類の筋肥大関連物質に量的な変化がみられるのかどうか? について検討するのが目的である。生後18ヶ月齢のマウスを実験に用い、6ヶ月間の自発的な走運動 (自発回転ケージ内で飼育, 現有設備, 図1)を施したマウスと、安静にしていたマウスの腓腹筋(内側頭, 外側頭)、大腿四頭筋、上腕三頭筋について、SRF関連物質 (SRF, MRTF, STARS)のmRNAおよび蛋白発現量を比較する。また蛋白レベルの変化が特に重要な意味を持つAkt関連物質 (Akt, mTOR, p70S6K)については、走運動による蛋白発現量の変化を解析する。分析には、RT-PCR法、分画Homogenateを用いたWestern blot法および蛍光免疫組織染色を用いる予定である。

4. 研究成果

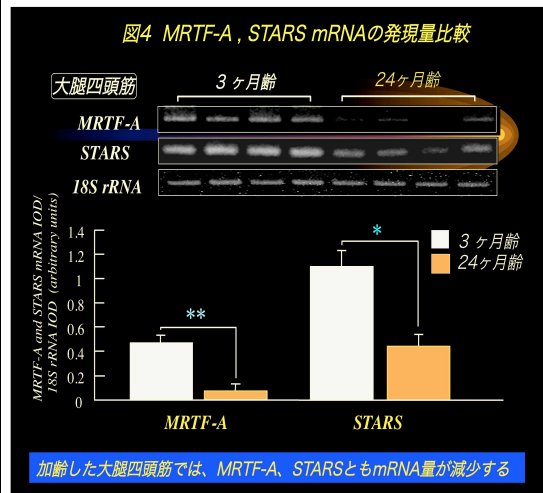
(1)加齢にともない大腿四頭筋、上腕三頭筋、腓腹筋のいずれにおいても有意な筋萎縮が認められた。また大腿四頭筋において、筋線維の平均横断面積が加齢マウス(24ヶ月齢)で有意に低値を示した(図2, 30%程度)。また筋変性と関連が示唆される中心核は、若齢筋では検出されなかったものの、加齢筋では20%の筋線維で中心核が認められた。

加齢した骨格筋では、細胞質と細胞膜の両方の分画 (Fraction)において、RhoA、RhoGDI蛋白の増加が認められた (図3)。RhoGDI蛋白に関しては、核のFractionにおいても加齢筋で高値を示した。細胞膜、細胞質のFractionでは、MRTF-Aの加齢にともなう有意な変化はみられなかったが、核のFraction

では MRTF-A 蛋白量が加齢により減少した (図 3)。



また STARS の mRNA 発現量も加齢にともない有意に減少した (図 4)。今から 4 年程前に発見された STARS は、筋収縮に非常に重要な蛋白であるアクチンに結合している。加齢にともなう筋収縮量の減少が STARS を低下させ、その下流で影響を受ける SRF および MRTF-A の転写が、加齢した筋では通常どおり行われないのかもしれない。筋細胞の骨格を形成するアクチン、ミオシン軽鎖、デスミンといった物質は、SRF および MRTF の働きで転写促進される可能性が高い。加齢にともなう SRF-MRTF の顕著な減少は、筋構造蛋白の低下をもたらす、結果的に筋細胞の萎縮を誘導す



る可能性がある。

(2) 加齢マウスに対する 6 ヶ月間の自発的な走運動は、有意な筋肥大をもたらした。Western blot を用いたデータから、走運動による MRTF-A および RhoA 蛋白の有意な量的変化は認められなかった。また SRF 経路の上流にあると思われる β 1-Integrin、STARS、MuRF-2 (Muscle Ring Finger-2) にも走運動による有意な変化はみられなかった。蛍光免疫組織化学を用いて SRF の細胞内局在様相を調べたところ、自発運動群で SRF 陽性の筋線維が増加する傾向にあった。しかしながら筋全体 (Crude Homogenate) および細胞分画サンプルを用いた SRF の生化学的蛋白解析では、運動による有意な変化は認められなかった。一方、筋肥大で主要な役割をする Akt-mTOR 経路関連物質 (Akt, S6, FOXO) にも、走運動による顕著な変化はみられなかった。

以上のことから SRF 機能不全がサルコペニアに関係する可能性があるものの、定期的な走運動によるサルコペニア (筋萎縮) 軽減効果には SRF 経路が関与していないと思われる。

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 10 件)

1. Aoi W, Sakuma K: Oxidative stress and skeletal muscle dysfunction with aging. Curr Aging Sci (in press) 2011 (査読有)

2. Sakuma K, Yamaguchi A: The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. J Biomed Biotechnol 2010: Article ID 721219, 8 pages, 2010. (査読有)

3. **Sakuma K**, Yamaguchi A: Molecular mechanisms in aging and current strategies to counteract sarcopenia. *Curr Aging Sci* 3: 90-101, 2010. (査読有)
4. Hokari F, Kawasaki E, Sakai A, Koshinaka K, **Sakuma K**, Kawanaka K: Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 109: 332-340, 2010. (査読有)
5. Akiho M, Nakashima H, Sakata M, Yamasa Y, Yamaguchi A, **Sakuma K**: Expression profile of Notch-1 in mechanically overloaded plantaris muscle of mice. *Life Sci* 86: 59-65, 2010. (査読有)
6. **Sakuma K**, Watanabe K, Hotta N, Koike T, Ishida K, Katayama K, Akima H: The adaptive responses in several mediators linked with hypertrophy and atrophy of skeletal muscle after lower limb unloading in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 197: 151-159, 2009. (査読有)
7. Tokugawa S, **Sakuma K**, Fujiwara H, Hirata M, Oda R, Morisaki S, Yasuhara M, Kubo T: The expression pattern of PKC θ in satellite cells of normal and regenerating muscle in the rat. *Neuropathology* 29: 211-218, 2009. (査読有)
8. **Sakuma K**, Akiho M, Nakashima H, Akima H, Yasuhara M: Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1782: 453-461, 2008. (査読有)
9. **Sakuma K**, Akiho M, Nakashima H, Nakao R, Hirata M, Inashima S, Yamaguchi A, Yasuhara M: Cyclosporin A modulates cellular localization of MEF2C protein and blocks fiber hypertrophy in the overloaded soleus muscle of mice. *Acta Neuropath (Berl)* 115: 663-674, 2008. (査読有)
10. Tanaka Y, Yamaguchi A, Fujikawa T, **Sakuma K**, Morita I, Ishii K: Expression of mRNA for specific fibroblast growth factors associates with that of the myogenic markers MyoD and PCNA in regenerating and overloaded rat plantaris

muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 194: 149-159, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. **佐久間邦弘**, 山口明彦, 須藤みず紀, 青井渉, 狩野豊. 加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)に対する自発性走運動の効果—神経栄養因子の変化に着目して—. 第 65 回日本体力医学会, 千葉, 2010 年 9 月.
2. 山口明彦, **佐久間邦弘**, 森田勲. 発育期のラットの骨格筋成長に対する FGF-7 の発現抑制の影響. 第 65 回日本体力医学会, 千葉, 2010 年 9 月.
3. **佐久間邦弘**, 山口明彦. ヒラメ筋肥大時における新生児型(Neonatal)ミオシン陽性細胞の形態的特徴—カルシニューリン経路に着目して—. 第 64 回日本体力医学会, 新潟, 2009 年 9 月.
4. **佐久間邦弘**. ヒラメ筋の代償性肥大における胎児型(Embryonic)ミオシンの発現様相—カルシニューリン経路に着目して—. 第 63 回日本体力医学会, 大分, 2008 年 9 月.
5. **佐久間邦弘**. 筋肥大時の Notch-1 および FOXO1 の発現様相. 第 16 回日本運動生理学会, 奈良, 2008 年 8 月.

[図書] (計 3 件)

1. **Sakuma K**, Yamaguchi A: Sarcopenia: molecular mechanisms and current therapeutic strategies. (in press) *Cell Aging*, Nova Science Publishers, NY, 2011.
2. **Sakuma K**, Yamaguchi A: Serum response factor-dependent pathway: potential mediators of growth, regeneration, and hypertrophy of skeletal muscle. (in press) *Recent Research Developments in Life Sciences*, Research Signpost, India, 2011.
3. **佐久間邦弘**: 筋萎縮. 運動生理学のニューエビデンス, 編集 宮村実晴, 真興交易医書出版部, pp 108-113, 2010.

[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
<http://www.health.tut.ac.jp/sakuma/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
佐久間 邦弘 (Kunihiro Sakuma)
豊橋技術科学大学・総合教育院・准教授
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：