

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08857

研究課題名(和文) 骨格筋のAktを中心とした老化制御機能の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Exploration of treatment against skeletal muscle Akt-centered aging by elucidating the underlying regulatory mechanisms

研究代表者

笹子 敬洋 (Sasako, Takayoshi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：20550429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアモデルであるmAktDKOマウスを24時間絶食に置いたところ、血糖が有意に低下し、またカロリー制限は一般には老化を抑制するが、このマウスでは過半数が数週間のうちに死亡した。このことからサルコペニアは低栄養に脆弱で、過度のエネルギー制限は有用でない可能性が考えられた。一方でこのマウスへのFoxO阻害剤の4週間投与により、速筋重量の部分的な増加を認め、治療効果が期待できるものと考えられた。また腫瘍耐性を検討する目的でメラノーマ細胞の接種実験を行なったところ、KOマウスで腫瘍の増殖が促進されるという結果であり、骨格筋が全身の他組織における腫瘍の増殖を制御している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では糖尿病に加えてサルコペニアの増加も重要な課題であり、また両者は密接に関連していることが知られている。

我々は本研究により、サルコペニアの病態にはインスリンシグナルの下流分子のうち、AktとFoxOが重要であり、前者の活性を保ち後者の活性を抑制することが、サルコペニアの治療につながることを明らかにした。次にサルコペニアでは他組織における腫瘍増殖が促進されることも明らかとなり、何らかの骨格筋由来の因子の可能性が想定された。一方でサルコペニアは低栄養に対して脆弱であり、糖尿病に対する食事療法は重要であるものの、サルコペニア合併での過度なエネルギー制限が有益でない可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：In order to examine responses against under-nutrition in sarcopenia, we fasted the mAktDKO mice, a sarcopenia model, for 24 hours, and they showed significantly lower blood glucose. We also performed caloric restriction experiments, which is generally expected to suppress aging, but the lifespan of the KO mice was markedly shortened, contrary to the established theory. These data suggest that sarcopenia could be susceptible to under-nutrition and excessive diet therapy could be rather harmful in clinical practice.

Moreover, fast-twitch muscle mass was partially recovered by administration of a FoxO inhibitor for 4 weeks, in parallel with the data of the FoxO knockout mice, suggesting the potential effect of chemical inhibition of the FoxO pathway against sarcopenia.

We also found that transplanted melanoma cells to the KO mice grew larger, suggesting that skeletal muscle could regulate tumor growth in remote tissues.

研究分野：糖尿病・代謝・内分泌

キーワード：サルコペニア 糖尿病 老化 インスリン抵抗性 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では急速に高齢化が進行しており、多くの高齢者が自立した健康的な生活を送り、天寿を全うできる食事や運動あるいは薬物療法の開発、あるいは社会環境の構築が急務である。これまでの疫学的な研究からは、身体能力(筋力・持久力)が高いほど、健康寿命が長いことが示唆されており、サルコペニア(加齢性筋肉減弱症)の予防・治療はきわめて重要と考えられている。また我が国においては、糖尿病の増加も重要な課題であるが、糖尿病自体がサルコペニアの原因となり、またサルコペニアが糖尿病を増悪させることも知られるなど、両者は密接に関連している。しかしながらサルコペニアの病態形成に、骨格筋においてどのような分子機序が寄与しているかについては、これまで解明されておらず、その治療方法も確立されていなかった。更に糖尿病との関連や、他の組織の老化や病態形成との関係性も不明であった。

我々はこのような状況を踏まえ：

- ・サルコペニアの病態はどのような分子機序により形成されるのか
- ・サルコペニアは他の組織における病態にはどのような影響を及ぼすのか
- ・サルコペニアはどのように治療すればいいのか

の大きく3つの問いに対して、答えを追究していきたいと考えている。

## 2. 研究の目的

我々は骨格筋におけるインスリン/IGF-1 シグナルに着目し、骨格筋特異的 Akt1/2 ダブル欠損マウス(mAktDKO マウス)を樹立し、その表現型を解析してきた。インスリンは栄養素の同化、IGF-1 は細胞増殖を主に促進するホルモンで、両者の構造的相同性は高く、また下流のシグナル伝達分子も共通のものが多い。その下流としてはキナーゼである Akt が重要で、骨格筋には主に Akt1 と Akt2 の2つのアイソフォームが発現する。その更に下流としては、蛋白分解に関わる FoxO 経路や、蛋白合成に関わる mTOR 経路が代表的なものとして知られ、Akt により前者の活性は抑制され、後者は活性化を受ける。

我々が明らかにしてきた mAktDKO マウスの表現型を列挙する：

- ・速筋有意の骨格筋量の減少を示し、筋力に加えて持久力も低下する
- ・骨格筋のインスリン依存性糖取り込みの低下と全身のインスリン抵抗性を示す
- ・骨格筋においてはミトコンドリアの量と機能がいずれも低下し、ミトファジー不全が生じている
- ・骨形成低下とそれに伴う骨粗鬆症を呈する
- ・平均寿命も短縮し、主に衰弱によって死亡する

これらの表現型は若週齢では見られず、加齢と共に顕在化し、進行するのが特徴であり、ヒトのサルコペニアの病態をよく再現しているものと考えている。このモデルでは加えて：

- ・高脂肪食負荷を行なうと、引き続き筋力・持久力低下を示し、平均寿命も短縮するが、主な死因は対照マウスと同様に腫瘍である
- ・Akt の欠損によって下流の FoxO は活性化しているが、Akt に加えて FoxO1/4 を欠損させると、mAktDKO マウスの表現型は多くが消失する

・Akt の欠損によって下流の mTOR は活性が低下しているが、mTOR の抑制因子である TSC2 を Akt に加えて欠損させると、筋力・持久力など一部の表現型のみが改善を示すことも明らかとなっている。このようにヒトの病態に則したサルコペニアモデルマウスはこれまで知られておらず、したがってその病態解明や治療法の開発が、十分には進んでこなかった。このモデルを更に発展させることで、独自性の高い研究が可能となり、また有用な成果が挙げられるものと期待する。

## 3. 研究の方法

### (1) mAktDKO マウスの骨格筋におけるトランスクリプトーム解析

mAktDKO マウスではミトコンドリアの量や機能を制御する遺伝子の発現が低下している他、解糖系、筋線維のタイプ、老化関連の遺伝子の発現も低下しているが、これらの変化を俯瞰的に明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行なう。

### (2) 低栄養が mAktDKO マウスの表現型に及ぼす影響の解析

サルコペニアの病態形成には、低栄養の寄与もあるものと考えられており、実際に FoxO や AMPK の欠損マウスでは、絶食時に表現型が顕在化することが報告されている。これまで mAktDKO マウスの表現型は随時摂食の状態でも解析してきたが、これと絶食状態との間で比較を行なう。加えて摂食量を制限した際に、表現型が増悪するのか、或いはサルコペニアモデルにおいてもカロリー制限が有用なのかを検討する。mAktDKO マウスの富栄養状態(高脂肪食負荷)での解析は先行しており、これと低栄養下(絶食、カロリー制限)での解析を対比することは重要と考える。

### (3) mAktDKO マウスにおける認知機能や癌耐性の解析

mAktDKO マウスは自発運動が少なく、平均寿命も短縮していることから、認知機能も低下していることが想定される。そこで mAktDKO マウスを用いて、新奇物体認識試験などによる認知機

能の評価を行なう。この結果も踏まえつつ、アルツハイマーモデルマウスとの交配を行ない、サルコペニアの合併によって認知機能低下が更に進行するのかを明らかにする。また高脂肪食負荷 mAktDKO マウスでは、主に腫瘍死の増加に伴い平均寿命が短縮したことから、癌耐性が低下している可能性が考えられる。これを明らかにするために、メラノーマ細胞の移植実験を行ない、悪性腫瘍の増殖を検証する。

#### (4) mAktDKO マウスの FoxO 阻害剤による治療効果の解析

mAktDKO マウスの表現型が FoxO1/4 の欠損で改善したことから、サルコペニアにおける FoxO 経路の不活化による治療効果の検証を試みる。具体的にはマウスに対する FoxO 阻害剤の全身投与を行ない、一定期間の投与の後に、骨格筋量や運動能力などに改善が見られるかを検証する。

## 4. 研究成果

まず(1)について、40 週齢の mAktDKO マウスにおけるトランスクリプトーム解析を行ない、パスウェイ解析を加えたところ、mAktDKO マウスで発現が低下したパスウェイの多くは、ミトコンドリアや ATP 合成関連のものであった。一方で一般に筋量の制御に重要と考えられているユビキチン・プロテアソーム系のパスウェイについては有意な変化が見られなかった。これらの結果はいずれも、RT-PCR の結果と一致することが確認された。その他の週齢でも同様の解析を行なったが、特に分泌因子については有意な変化を示すものは少なかった。また一連の発現変化が代謝産物に与える影響については、今後の検討課題と考えられた。

次に(2)について、mAktDKO マウスを 24 時間絶食に置いたところ、骨格筋から供給されるアラニンの血中濃度と血糖が有意に低下しており、アラニンを基質とした肝臓での糖新生が低下しているものと考えられた。一方で血中ケトン体は代償的に高値であった。このマウスに 40%カロリー制限を行なったところ、筋力は対照マウスと同程度であったが、体重は対照マウスよりも減少幅が大きかった。血中ケトン体は上昇しており、一般にはこれは持久力の改善につながることを期待されるが、実際に mAktDKO マウスにおける持久力の低下は寧ろ進行していた。更に一般にカロリー制限は寿命を延長することが期待されるが、このマウスではカロリー制限により、過半数の個体が数週間のうちに死亡することが観察された。このことからサルコペニアにおいては低栄養に対する耐性が低下していることが示唆され、日常臨床においてもサルコペニア患者に対する過度のエネルギー制限は有用でなく、個々の症例に合わせた食事療法の個別化の重要であるものと考えられた。

また(3)について、このマウスの腫瘍耐性を検討する目的でメラノーマ細胞の接種実験を行なった。その結果、mAktDKO マウスにおいては腫瘍の長径が増大し、重量も増加傾向であった。この実験系は、腫瘍の発生でなく増殖を評価する系であるが、今回の結果より骨格筋は、全身の他組織における腫瘍の増殖を制御している可能性が考えられた。認知機能についても評価を行なったが条件の調整に難渋し、今後の検討課題と考えられた。

最後に(4)について、サルコペニアモデルである mAktDKO マウスにおいて、Akt の下流の転写因子 FoxO は活性化していたため、その不活化はサルコペニアに対して治療効果を示すことが期待される。そこでこのマウスにおいて、FoxO 阻害薬である AS1842856 による治療効果を検討した。その結果、既にサルコペニアを呈している 90 週齢の mAktDKO マウスに対して 4 週間投与を行なったところ、体重や遅筋重量には差がなかったものの、速筋重量の増加を認めた。一方で対照マウスにおいては、同薬の投与を行なっても、筋重量の変化は見られなかった。同様に、サルコペニア発症前の 8 週齢の mAktDKO マウスに対して、同薬の 4 週間投与を行なったところ、やはり速筋重量が増加していた。このことから FoxO 阻害薬の投与が、特に骨格筋におけるインスリン抵抗性を背景としたサルコペニアに対して、治療効果のみならず、予防効果を示す可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasako T, Umehara T, Soeda K, Kaneko K, Suzuki M, Kobayashi N, Okazaki Y, Tamura-Nakano M, Chiba T, Accilli D, Kahn CR, Noda T, Asahara H, Yamauchi T, Kadowaki T, Ueki K	4. 巻 13
2. 論文標題 Deletion of skeletal muscle Akt1/2 causes osteosarcopenia and reduces lifespan in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33008-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tian Jingwen, Chung Hyo Kyun, Moon Ji Sun, Nga Ha Thi, Lee Ho Yeop, Kim Jung Tae, Chang Joon Young, Kang Seul Gi, Ryu Dongryeol, Che Xiangguo, Choi Je Yong, Tsukasaki Masayuki, Sasako Takayoshi, Lee Sang Hee, Shong Minho, Yi Hyon Seung	4. 巻 13
2. 論文標題 Skeletal muscle mitoribosomal defects are linked to low bone mass caused by bone marrow inflammation in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 1785-1799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.12975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 笹子 敬洋、植木 浩二郎	4. 巻 4
2. 論文標題 日本人と欧米人のサルコペニア肥満の相違	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本サルコペニア・フレイル学会誌	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 笹子 敬洋、小林 直樹、植木 浩二郎	4. 巻 24
2. 論文標題 糖尿病、肥満動物に関わる実験手法についてNo.17 筋肉における糖代謝の評価法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本糖尿病・肥満動物学会NEWS LETTER	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi T, Yakabe M, Sasakawa H, Sasako T, Ueki K, Kato S, Tokuoka SM, Oda Y, Abe M, Matsumoto T, Akishita M, Ogawa S	4. 巻 120
2. 論文標題 Sarcopenia phenotype and impaired muscle function in male mice with fast-twitch musclespecific knockout of the androgen receptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2218032120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.221803212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 笹子 敬洋	4. 巻 1
2. 論文標題 内科医が診る骨粗鬆症 病態の理解から集学的治療へ 3. 2型糖尿病と骨粗鬆症の接点	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌プラクティスWeb	6. 最初と最後の頁 a0019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.57554/a0019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用による筋量と代謝の制御機構
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayoshi Sasako, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki, Kohjiro Ueki
2. 発表標題 Role of Akt in skeletal muscle in protection against sarcopenia and aging
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用による筋量と代謝の制御機構
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用による筋量と機能の制御機構
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会・第27回日本糖尿病眼学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 インスリン/IGF-1シグナルからみたサルコペニアの治療と展望
3. 学会等名 第8回日本サルコペニア・フレイル学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用による筋量と代謝の制御機構
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用とサルコペニア肥満の病態形成
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 窪田 直人, 門脇 孝, 植木 浩二郎, 山内 敏正
2. 発表標題 インスリン作用と糖尿病の併存症の病態形成
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹子 敬洋, 山内 敏正, 門脇 孝, 植木 浩二郎
2. 発表標題 骨格筋のインスリン作用による筋量と機能の制御機構
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 笹子 敬洋, 植木 浩二郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 19
3. 書名 糖尿病と食「糖尿病における骨格筋での代謝の変化」	

1. 著者名 笹子 敬洋、植木 浩二郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 13
3. 書名 生物の寿命延長 老化・長寿命の基盤研究最前線「個体老化プログラムとその制御」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://researchmap.jp/sasakotaka/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
韓国	Chungnam National University		
米国	Columbia University	Harvard Medical School	