

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11359

研究課題名(和文)サルコペニアでのオートファジー機能不全の解明：Rubiconとアペリンに着目して

研究課題名(英文)Molecular mechanism of autophagy-dependent functional defect in sarcopenia :
Focusing Rubicon and apelin

研究代表者

佐久間 邦弘 (Sakuma, Kunihiro)

東京工業大学・リベラルアーツ研究教育院・教授

研究者番号：60291176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニア(加齢性筋減弱症)において、オートファジーの機能不全が起こる。その機能不全のメカニズムについて調べるために、若齢筋と加齢筋のオートファジー機能不全マーカーを比較検討した。また別の筋萎縮モデルである除神経筋においても調べた。本研究の結果により、若齢筋と比較して加齢筋、除神経筋ではRubiconタンパク質発現が亢進していた。興味深いことに、TRB3については加齢筋でのみ発現増強が確認され、他の筋萎縮モデル(除神経)では有意な発現変化が認められなかった。以上のことから、サルコペニアにおけるオートファジー機能不全に、RubiconおよびTRB3が関係している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近筋萎縮の分野で注目を浴びているのは、ノーベル医学生理学賞を受賞したオートファジー(自食)という機構である。加齢マウスの大腿四頭筋の筋線維において、オートファジー関連物質(p62)の免疫活性が異常に亢進していることを以前我々は証明した。本研究の結果から、加齢筋(サルコペニア)に特徴的なオートファジー機能不全は、RubiconおよびTRB3の蓄積が原因である可能性があることがわかった。Rubiconはオートファジー第3行程で重要な働きをするBeclin-1の働きを、TRB3はオートファジー第1行程で重要な働きをするp62/SQSTM1の働きを、それぞれ阻害する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Autophagy dysfunction occurs in sarcopenia (age-related muscle weakness). To investigate the mechanism of this dysfunction, we compared autophagy dysfunction markers in young and aged muscles. We also examined it in another model of muscle atrophy, the denervated muscle. The results of this study showed that Rubicon protein expression was upregulated in the aged and denervated muscles compared to the young muscle. Interestingly, TRB3 expression was enhanced only in the aged muscle, while no significant change in expression was observed in the other muscle atrophy model (denervation). In conclusion, Rubicon and TRB3 may be involved in autophagy dysfunction in sarcopenia.

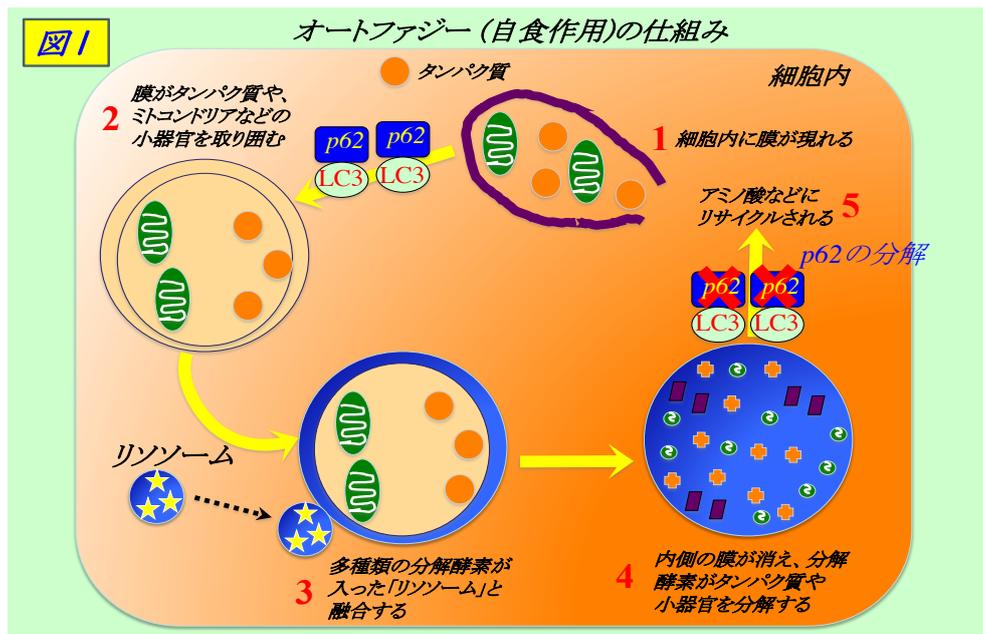
研究分野：運動生化学、運動生理学、細胞生物学

キーワード：オートファジー サルコペニア 骨格筋 機能不全 加齢 Rubicon

1. 研究開始当初の背景

ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するために、高齢化に関する研究が様々な分野で推し進められている。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は、肩こりや肥満あるいは精神的ストレスを軽減してくれる。加齢にともなう筋力の著しい低下をサルコペニア(加齢性筋減弱症)という。超高齢化が進む我が国では、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。

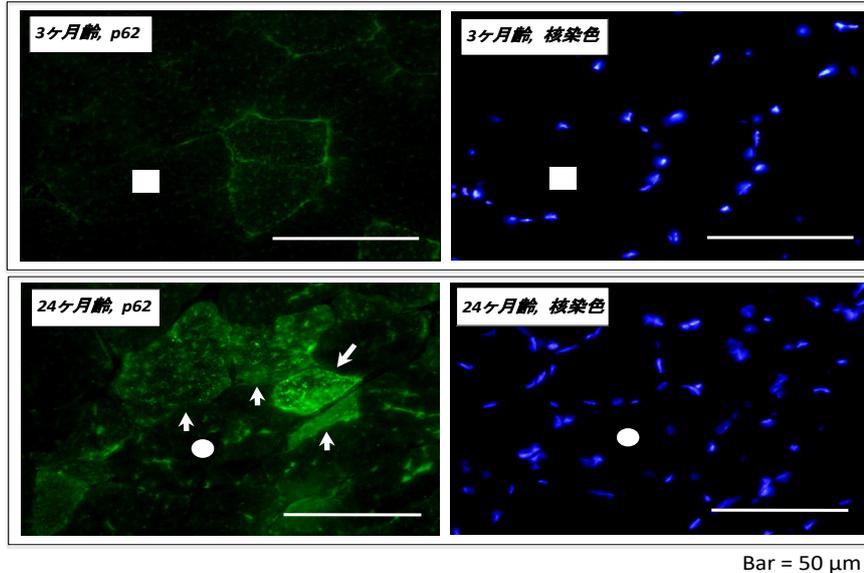
年を取ると個々の筋細胞が萎縮、脱落するために、筋力が著しく衰える。今まで普通に持ち上げることができたものでも、年齢を重ねるごとに上がらなくなってくる。この老化にともなう筋萎縮の理由の一つとして、骨格筋内で Serum response factor (筋分化因子)が減少することが挙げられる (Sakuma K et al., BBA Mol Basis Dis 1782: 453-461, 2008)。一方、様々な萎縮筋(除神経、後肢懸垂、筋固定)において亢進し、タンパク分解を促進する Atrogin-1 や FOXO (Forkhead box O) は、加齢筋において知見が安定していない (Sakuma K et al., Pflügers Arch 469: 573-591, 2017)。ゆっくり萎縮が進行するサルコペニアの場合は、別の機構が調節している可能性が高い。



最近筋萎縮の分野で注目を浴びているのは、ノーベル医学・生理学賞を受賞したオートファジー(自食)という機構である(図1参照)。これには、代表的なタンパク分解系であるプロテアソーム-ユビキチン系ではなく、リソソームが関与している。複数の筋変性疾患(筋ジストロフィー症など)や除神経、筋固定、飢餓状態で筋萎縮が起こる場合に、オートファジーが重要な役割をすることが近年解明されてきた。また以前採択された科研費で、高齢マウスの大腿四頭筋の筋線維において、オートファジー関連物質(p62/SQSTM1)の免疫活性が非常に亢進していることを我々は証明した(図2参照, Sakuma K et al., J Cachexia, Sarcopenia and Muscle 7: 204-212, 2016)。このp62の細胞内沈着は、オートファジー機能不全のためである可能性が高い。しかしながらサルコペニア筋においてなぜオートファジーが動かず、変性したタンパク質が沈着し、リサイクルされていないのかについては不明のままである。

図2

加齢筋(24ヶ月齢)では、オートファジー関連タンパク質(p62)の活性が亢進する



Bar = 50 μ m

2. 研究の目的

- 1) 骨格筋内における Rubicon およびその関連因子 (Beclin-1, UVRAG etc) の加齢にともなう変化を詳細に調べる。
- 2) 通常加齢筋において、アペリンおよびアペリン受容体の変化を生化学的および形態学的に調べる。

3. 研究の方法

実験動物には若齢(3ヶ月齢)と高齢(24ヶ月齢)のマウスを用い、加齢にともなうオートファジー調節物質 (Rubicon とアペリン) の変化を、リアルタイム PCR (mRNA の定量的解析)、細胞分画サンプルによる Western blot (タンパク質局在の生化学的解析)、蛍光免疫組織化学 (タンパク質局在の形態学的解析) により検証する。

1. 加齢筋における Rubicon および Rubicon 関連物質 (Beclin-1、UVRAG) の分布様相をリアルタイム PCR、分画後のサンプルを用いた Western blot、蛍光免疫組織染色で詳細に調べる。

○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、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と細胞分画キット (Calbiochem) により筋肉を細胞質 (cytosol)、核 (nucleus)、細胞膜の3つの画分に分離する。分画後の各 Homogenate を蛋白定量した後、Rubicon と Rubicon 関連物質 (Beclin-1、UVRAG) の蛋白量を解析する。

○生後3ヶ月齢と24ヶ月齢のマウス骨格筋から、凍結組織切片 (7 μ m) を作成し蛍光免疫組織染色を行う。DAPI により細胞内の核 (筋核、衛星細胞核) を同定し、Rubicon (Novus Biologicals, ウサギ)、Beclin-1 (Santa Cruz, マウス)、UVRAG (Santa Cruz, マウス) に対する一次抗体には、それぞれ抗マウス-FITC あるいは抗ウサギ-Rhodamine の二次抗体を反

応させる。そのプレパラートを、蛍光顕微鏡解析システム（オリンパス DP70）により観察し、Rubicon と Rubicon 関連物質の細胞内局在様相を若齢と加齢した筋で比較検討する。

1. 筋収縮の程度に依存してオートファジーを調節するアペリンおよびアペリン受容体を、加齢筋において詳細に調べる。

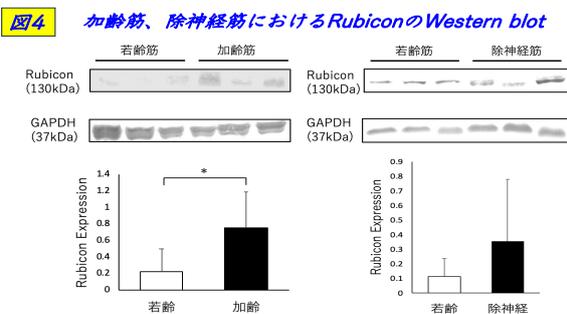
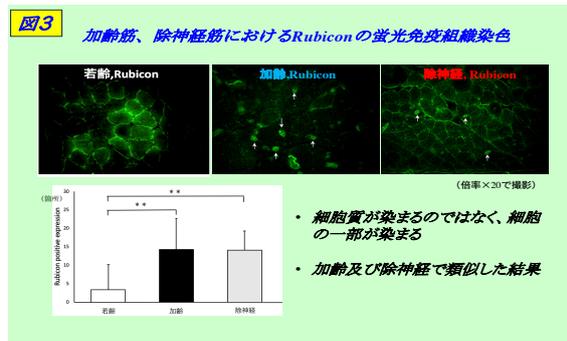
○最近の研究によると、アペリンがオートファジーを活性化して筋細胞萎縮を軽減する役割を持つようである。そこでアペリンおよびアペリン受容体の加齢筋における変化について詳細に検証する。生後3ヶ月齢 (adult)、12ヶ月齢 (middle)、24ヶ月齢 (old)のC57Black/6J系雄マウスを実験に用い、リアルタイムPCR法、分画サンプルを用いたWestern blot法、蛍光免疫組織化学を行う。

またオートファゴソームとリソソームが結合する際（図1の第3段階）に、Beclin-1とUVRAGは重合体を形成し、Rubiconはその重合体の形成を阻害するようである。加齢筋におけるこれらの重合体の様子を、磁性ビーズを用いた免疫沈降法 (immunoprecipitation) により検証予定である。

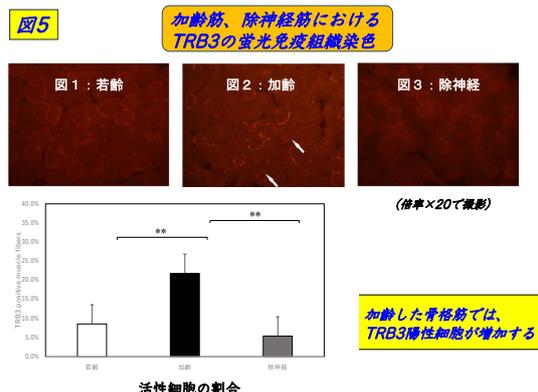
4. 研究成果

(1) 大腿四頭筋の凍結切片を用いた蛍光免疫染色から、加齢筋におけるRubicon免疫活性の亢進が認められたものの（図3）、オートファジー関連物質であるBeclin-1の発現箇所とはあまり一致していなかった。また、同様なオートファジー機能不全をもたらす除神経後の筋萎縮モデルにおいても、筋細胞の細胞質にRubiconの免疫活性が確認された（図3）。またWestern blotによる解析からも、Rubiconタンパク質量は加齢筋において有意に増加し、除神経筋においても増加する傾向が認められた（図4）。

(2) 本研究では、オートファジー機能不全の原因となると思われるTRB3の発現様相を、若齢筋、加齢筋、除神経筋で調べた。蛍光免疫染色から、TRB3については、若齢筋の細胞膜に弱い免疫活性が認められたものの、加齢筋の細胞質には顕著な発現の増加が認められた（図5）。また若齢筋、加齢筋、除神経筋のTRB3タンパク質量をWestern blotで比較検討したところ、加齢筋でのみ若齢筋より有意な発現増加が認められた。一方、除神経筋では若齢筋よりもTRB3の有意な発現減少が認められた。以上のことから、加齢筋（サルコペニア）におけるオートファジー機能不全の原因として、RubiconとTRB3が関係



大腿四頭筋では、加齢によりRubiconが増加する

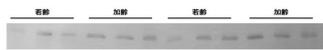


加齢した骨格筋では、TRB3陽性細胞が増加する

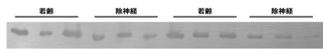
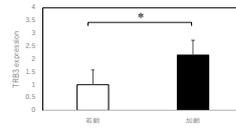
している可能性が示唆された。

図6

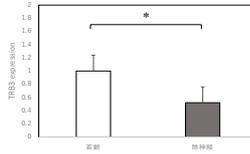
加齢筋、除神経筋における
TRB3のWestern blot



若齢筋と加齢筋においての比較
※加齢筋において有意に増加



若齢筋と除神経筋においての比較
※除神経筋において有意に減少



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐久間邦弘	4. 巻 90
2. 論文標題 筋肉の異化と同化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 229-233
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 Morishita Y, Sakuma K, Chia-Ter Chao	4. 巻 7
2. 論文標題 Editorial: Frailty and Sarcopenia in Various Cachectic Kidney Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 627485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2020.627485	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 佐久間邦弘	4. 巻 70
2. 論文標題 細胞機能の恒常性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 107-111
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 佐久間邦弘	4. 巻 274
2. 論文標題 カヘキシアにおけるサルコペニアの分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 563-566
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 佐久間邦弘	4. 巻 37
2. 論文標題 サルコペニアの病態生理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 689-693
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 基礎研究者として評価を高めるために
3. 学会等名 第28回日本運動生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 「骨格筋-QualityとQuantity・インスリン抵抗性からサルコペニアまで」骨格筋の質的可塑性を調節する分子メカニズム
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 サルコペニアの発症原因としてのオートファジー機能不全
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 『抗加齢医学の新たな提唱2021: メタボ健診からフレイル健診へ ~ PPK (ピンピンキラリ) を目指して ~』オートファジー機能とサルコペニア予防-栄養の観点から-
3. 学会等名 第21回抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 Meet the Expert3「How to~サルコペニア・オートファジー」
3. 学会等名 第7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 2020年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 骨格筋のオートファジー機能とサルコペニア・フレイル
3. 学会等名 第7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 2020年

1. 発表者名 佐久間邦弘
2. 発表標題 サルコペニアにおけるオートファジー機能不全のメカニズム-Rubiconに着目して-
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Kunihiko Sakuma	4. 発行年 2021年
2. 出版社 InTech Open	5. 総ページ数 130
3. 書名 Muscle Cell and Tissue - Novel Molecular Targets and Current Advances	

1. 著者名 Kunihiko Sakuma	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 329
3. 書名 Sarcopenia : Molecular Mechanism and Treatment Strategies	

1. 著者名 Shimizu M, Sakuma K	4. 発行年 2020年
2. 出版社 InTech Open	5. 総ページ数 176
3. 書名 Background and Management of Muscular Atrophy	

1. 著者名 Sakuma K, Yamaguchi A	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 245
3. 書名 Recent Advances of Sarcopenia and Frailty in CKD	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------