

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500658

研究課題名（和文）サルコペニアの発症と GSK3 - β シグナル伝達経路の関連性の解明研究課題名（英文）Understanding of the mechanisms underlying the association between sarcopenia and GSK3 - β signaling.

研究代表者

我妻 玲 (WAGATSUMA AKIRA)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・学術支援専門職員

研究者番号：00347121

研究成果の概要（和文）：本研究ではサルコペニア発症機構を解明するため、骨格筋の負の制御因子である GSK-3 β の活性化とサテライト細胞の分化能力について検討した。GSK-3 β の活性は老齢マウス由来のサテライト細胞で増加していたが、分化能力は維持されていた。GSK-3 β の阻害剤により成獣および老齢マウス由来のサテライト細胞の分化が促進され、その効果は両者間で同程度であった。したがって、本研究の結果から、GSK-3 β の活性を阻害剤で制御することによってサルコペニアの症状を軽減させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the possible role of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in sarcopenia, we investigated the relationship between its phosphorylation levels and the differentiation potential of satellite cells *in vitro*. The level of phosphorylation of GSK-3 β was slightly decreased in satellite cells derived from old mice compared with adult mice. No significant difference in differentiation potential was observed between old and adult satellite cells, suggesting that satellite cells retain sufficient capacity to myogenic differentiation, irrespective of ageing. Additionally, we investigated whether inhibition of GSK-3 β activity by lithium promote cell differentiation. This treatment almost equally accelerated myotube formation in both old and adult satellite cells. Taken together, inhibition of GSK-3 β may contribute to attenuate age-related decline in skeletal muscle mass.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：スポーツ科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学
キーワード：サルコペニア、サテライト細胞、老化

1. 研究開始当初の背景

1989年 Rosenberg (1989) は、高齢者の筋萎縮を説明するサルコペニア（加齢性筋肉減少症）という概念を提唱した。サルコペニアとは、語源はギリシア語の sarx (fresh: 肉) と penia (deficiency: 欠乏) を結びつけて作られた造語で、直訳すれば「肉体の欠乏」を表す。具体的には、筋量を規定する筋線維数の減少（速筋線維の減少）と筋線維の萎縮、筋組織から結合組織へ置換により実質的な骨格筋量が減少し、筋力低下を生じさせると考えられる。

欧米の調査 (Baumgartner *et al.*, 1998) によると、70歳以下の高齢者の20%、80歳以上の高齢者の40%以上がサルコペニアを発症しているとされている。基本的に男女における差はない。サルコペニアの発症時期は30-40歳代とされ、その進行スピードは、40歳以降で筋量が10年毎に5%失われ (Tzankoff *et al.*, 1977; Fleg *et al.*, 1988)、65歳以降ではさらに加速化する (Forbes *et al.*, 1970; Tzankoff *et al.*, 1977)。結果的に、高齢者の筋力は若年者の50%にまで低下する (Balagopal *et al.*, 1997) ため、高齢者のQOLへの深刻な影響が懸念される。

筋量の減少は運動機能の低下をもたらす。さらに、運動機能の低下と認知症の間には、明確な因果関係が認められる。サルコペニアの発症機序の解明は、高齢者の運動障害の軽減や介護負担の軽減、医療費の削減など、社会的に極めて重要な課題であるといえる。

2. 研究の目的

サルコペニアは、老化に伴う骨格筋の萎縮や損傷に対する自己修復能力の低下（筋サテライト細胞の増殖、self-renewal、分化能力の低下）によって顕在化すると考えられる。筋サテライト細胞の機能低下を誘発するものとして、酸化ストレスの増大、ホルモン分泌量低下・ホルモンバランスの乱れ、炎症性サイトカイン分泌量増加、成長因子の分泌量低下、運動不足、栄養摂取不足等が挙げられているが、その機序については不明な点が多い。

本研究の目的は、骨格筋の負の制御因子であるグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) に着目して、サルコペニア発症メカニズムの一端を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験動物

C57/BL6 (4-6ヶ月齢および22ヶ月齢以上) マウスを用いた。

筋力測定

全身筋力測定装置によってマウスの筋力測定を行った。

組織化学的分析

マウス下腿より腓腹筋を採取し、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。組織像を顕微鏡に取り付けられてある CCD カメラにより撮影し、デジタルデータを取得した。取得された画像は画像解析ソフトを用いて筋線維横断面積の定量化を行った。

mRNA の分析

骨格筋サンプルを液体窒素中で粉砕、TRI reagent で溶解し、全 RNA を抽出した。cDNA を合成した後、リアルタイム PCR により解析した。

タンパク質の分析

骨格筋サンプルを液体窒素中で粉砕、尿素を含むバッファーで溶解し、全タンパク質を抽出した。SDS-PAGE でタンパク質を分離したのち、セミドライプロット装置で PVDF メンブレンに転写した。目的のタンパク質は抗体を用いて特異的に検出した。

サテライト細胞の採取

マウスの腓腹筋から単核細胞を単離し、細胞の接着性を利用した方法でサテライト細胞を分離した。

筋分化能力の解析

サテライト細胞を20%ウシ胎児血清と1%ニワトリ胚抽出物を含むダルベッコ改変イーグル培地で培養した後、10%ウマ血清とインスリン/トランスフェリン/亜セレン酸ナトリウムを含む分化培地に交換し、分化誘導を行った。7-10日後、分化の指標として fusion index (筋管細胞に含まれる核/総核数) を算出した。GSK-3 β の阻害剤であるリチウムを分化誘導と同時に添加し、筋分化の進行度を検討した。

4. 研究成果

成獣マウスの筋力と比較して、老齢マウスの筋力は40%減少していた。

平均筋線維横断面積に有意差は認められなかった。しかしながら、老齢マウスでは筋線維の萎縮や肥大が観察され、筋線維径の大小不同が顕著であった。また、筋線維間や血管周囲に結合組織の増加が観察された。中心核をもった再生筋線維の増加も観察された。

一方、成獣マウスではこのような変化はほとんど観察できなかつた。

老化に伴い特徴的な遺伝子の変化が観察された。酸化ストレスに関連する遺伝子(GADD45 α , p21 など)、筋委縮に関連する遺伝子(Atrogin-1, Muscle-specific RING finger protein 1 など)、筋分化に関連する遺伝子(MyoD, myogenin など)に変化が認められた。

老齢マウスではミオシン重鎖タンパク質の減少が見られたが、アクチンタンパク質の変化はほとんど認められなかつた。

GSK-3 β はAkt/PKBによりリン酸化されその活性が抑制される。Aktの活性化にはSer473のリン酸化が必要である。老化した骨格筋ではAkt^{Ser473}のリン酸化レベルが増加していた。しかしながら、GSK-3 β のリン酸化レベルが低下していた。したがって、GSK-3 β の制御機構に何らかの調節障害が起きていると考えられた。

GSK-3 β のリン酸化レベルとサテライト細胞の*in vitro*での分化能力について検討した。老齢マウス由来のサテライト細胞は成獣マウスのサテライト細胞よりも増殖能力が低かつた。そこで、両マウス由来の細胞数が分化誘導をかける前にほぼ同じになるように播種して、増殖培地で培養した後、分化誘導したところ、GSK-3 β のリン酸化レベルは老齢マウス由来のサテライト細胞でわずかに低下していたものの、両者に明確な分化能力の差は認められなかつた。

さらに同じ条件で、GSK-3 β の阻害剤であるリチウムを分化培地に添加して分化能力を調べた。GSK-3 β の阻害剤により成獣および老齢マウス由来のサテライト細胞の分化はさらに促進され、その分化促進効果は両者間で同程度であった。これらの結果から、加齢に伴うGSK-3 β の活性化とサテライト細胞の分化能力の関係についてはさらなる検討が必要であるが、GSK-3 β の活性を阻害剤で制御することによってサルコペニアの症状を軽減させ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 10 件)

1. Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *Scientific World Journal*. 2013;2013:593267.

doi:10.1155/2013/593267. 査読無

2. Wagatsuma A, Sakuma K. Molecular mechanisms for age-associated mitochondrial deficiency in skeletal muscle. *J Aging Res*. 2012;2012:768304. doi:10.1155/2012/768304. 査読有

3. Wagatsuma A. Molecular mechanisms underlying hypoxia-induced inhibition of cell differentiation in myogenic cells. *Current Topics in Biochemical Research* 14(1), 105 - 115, 2012. <http://http://www.researchtrends.net/> 査読無

4. Wagatsuma A, Sakuma K. Myogenic and angiogenic pathways are sequentially activated during postnatal muscle regeneration. *Current Topics in Peptide & Protein Research* 13, 49 - 59, 2012. <http://http://www.researchtrends.net/> 査読無

5. Wagatsuma A, Shiozuka M, Kotake N, Takayuki K, Yusuke H, Mabuchi K, Matsuda R, Yamada S. Pharmacological inhibition of HSP90 activity negatively modulates myogenic differentiation and cell survival in C2C12 cells. *Mol Cell Biochem*. 2011 Dec;358(1-2):265-80. doi:10.1007/s11010-011-0977-0. 査読有

6. Wagatsuma A, Kotake N, Mabuchi K, Yamada S. Expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial biogenesis and dynamics in experimentally denervated muscle. *J Physiol Biochem*. 2011 Sep;67(3):359-70. doi:10.1007/s13105-011-0083-5. 査読有

7. Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R. Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol Cell Biochem*. 2011 Apr;350(1-2):1-11. doi:10.1007/s11010-010-0677-1. 査読有

8. Wagatsuma A, Kotake N, Yamada S. Muscle regeneration occurs to coincide with mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2011 Mar;349(1-2):139-47. doi:10.1007/s11010-010-0668-2. 査読有

9. Wagatsuma A, Kotake N, Yamada S. Spatial and temporal expression of hypoxia-inducible factor-1 α during myogenesis in vivo and in vitro. *Mol Cell*

Biochem. 2011 Jan;347(1-2):145-55. doi:
10.1007/s11010-010-0622-3. 査読有

10. Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T,
Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura
Y, Matsuda R. Transdermal delivery of a
readthrough-inducing drug: a new approach
of gentamicin administration for the
treatment of nonsense mutation-mediated
disorders. J Biochem. 2010
Apr;147(4):463-70.
doi:10.1093/jb/mvp185. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 内田翔太、星野隆行、我妻玲、深山理、
満洲邦彦. 歩行時の予備緊張の検出と認知
した視空間の推定に関する研究. 電気学会
医用・生体工学研究会、2013/3/22、東京大
学先端科学技術研究センター、東京.

2. Shiozuka, M, Wagatsuma A, Yoshida M,
Nonomura Y, Matsuda R.: "Pharmacological
Nonsense Suppression Leads to the
Restoration of Dystrophin in Mdx Mice."
The American Society for Cell Biology
50th Annual Meeting. (20101214).
Philadelphia, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 玲 (WAGATSUMA AKIRA)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・学
術支援専門職員

研究者番号：00347121

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：