

主論文の要旨

Exercise restores muscle stem cell mobilization, regenerative capacity and muscle metabolic alterations via adiponectin/AdipoR1 activation in SAMP10 mice

SAMP10マウスにおける運動によるアディポネクチン/AdipoR1
活性化を介した筋幹細胞動員・再生能力および筋代謝変化の回復

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 地域在宅医療学・老年科学分野

(指導：葛谷 雅文 教授)

井上 愛子

【緒言】

様々な哺乳動物において、加齢に伴う筋力低下や筋萎縮（サルコペニア）は、脂肪組織の蓄積や筋線維数と筋線維サイズの減少、筋収縮スピードの遅延化や筋線維タイプの構成変化および様々な代謝パラメーターの変化により発生する。定期的な運動トレーニング（ET）は、筋萎縮や末梢動脈疾患などの加齢に伴う疾患を予防し、身体各臓器や組織の機能改善、あるいは細胞の代謝や再生を活性化させる為に有効であることが報告されている。しかし、ETが、加齢に伴う筋肉の損失や機能不全を改善する分子メカニズムは、ほとんど明らかにされていない。近年、障害後の骨格筋再生には骨髄由来骨格筋前駆細胞（MuSCs）の関与が明らかにされた。しかし、加齢に伴うサルコペニア、さらには運動負荷後の筋肉量増加に対する MuSCs の役割は不明である。

【方法】

マウス

本研究では、24 週齢（雄）の老化促進モデルマウス（SAMP10 : Senescence-Accelerated Mouse Prone 10）を用いた。すべての動物実験は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱い規定に則って実施した。

運動と骨格筋機能評価

SAMP10 マウスを、24 週齢にて ET 群と非運動群に分け、ET 群にはトレッドミルによる 45 分間の ET を週 3 回、40 週齢までの 4 ヶ月間行った。40 週までの間にそれぞれのタイムコースに合わせ、体重、代謝測定、持久力、握力測定などを実施した。40 週齢にて両側の下腿ヒラメ筋・腓腹筋を摘出し、生化学的・組織学的解析を実施した。

アディポネクチン中和抗体実験

サルコペニア予防に関する分子メカニズムを明らかにするため、SAMP10 マウスを用い、24 週齢より 32 週齢までの 2 か月間、アディポネクチン中和抗体を皮下注射し、同様に ET による骨格筋機能評価と生化学的・組織学的解析を実施した。

ELISA および生化学分析

40 週齢(もしくは 32 週齢)の末梢血（血漿）を用い、血中脂質、炎症性サイトカインならびにアディポネクチンを測定した。

遺伝子ならびにタンパク質発現の評価

40 週齢にて両側のヒラメ筋と腓腹筋を採取し、mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いターゲット遺伝子発現を定量した。内在性コントロールとして GAPDH を用いて補正を行った。さらに、ヒラメ筋と腓腹筋のタンパク質を抽出し、ウェスタン

ブロテイングを実施した。

免疫組織化学分析

40 週齢マウス骨格筋の新鮮凍結組織より 4 μ m 薄切切片を作成し実施した。

- 骨格筋細胞断面積測定：ヘマトキシリンエオシン（H&E）染色
- 増殖能の評価：増殖細胞核抗原（PCNA）染色
- 骨格筋筋線維 type 評価：Slow Myosin Heavy Chain（MHC）染色
- アポトーシス細胞評価：TUNEL 染色
- 骨格筋細胞の再生の評価：Desmin /Laminin5 二重蛍光免疫染色
- MuSCs の定量：CD34/Integrin α 7 二重蛍光免疫染色

骨格筋ミトコンドリアの電子顕微鏡解析

試料はグルタルアルデヒドにて前固定後オスミウム酸で後固定を行いエポキシ樹脂に包埋した。切片を60~70nmの厚さに切断し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、100kV で動作する透過電子顕微鏡（JEM-1400、東京）で観察した。

MuSCs 動員分析

ET 開始後 8 週および 16 週に、骨髄（BM）および末梢血（PB）試料を採取し、赤血球を塩化アンモニウムで溶解し、ペレットに分離した。得られた細胞を CD34 および Integrin α 7 抗体を用いてフローサイトメトリーにより MuSCs の分析を行った。

統計解析

データは平均 \pm SEM として表した。2 群間の比較は t 検定を用い、3 群及びそれ以上の比較には、One-way ANOVA（Tukey post hoc tests）法で、SPSS ソフトウェアバージョン 17.0（SPSS社、Chicago、IL）を用いて統計解析を行った。P 値<0.05 を有意差ありと判断した。

【結果】

1. ET 群では非運動群に比較し、加齢に伴い低下する体重あたりの筋肉重量、持久力、握力、MHC 陽性筋線維（Type1 筋線維）の比率および筋断面積が有意に増加した(Fig.1)。
2. 電子顕微鏡による解析で、非運動群では、ミトコンドリアの微細構造の著しい変性がヒラメ筋と腓腹筋の両方で認められ、ET 群ではその変性が回復し、損傷したミトコンドリアの数および割合と脂肪滴の数が有意に減少していた(Fig.2)。
3. 定量 PCR の結果からも、ミトコンドリア生合成に関わる PGC-1 α とミトコンドリア呼吸鎖の鍵となる酵素 COX4 の mRNA 発現量の有意な増加が ET 群で認められた(Table 1)。

4. ET 群の血漿アディポネクチンが、非運動群と比較して 6.3 倍増加し、ヒラメ筋と腓腹筋中の AdipoR1 mRNA も増加していた(Table 1)。
5. ET 群では、骨格筋におけるタンパク質の合成に関わる Akt-mTOR のリン酸化が増強された(Fig.3A-C)。
6. 酸化ストレス産生酵素のサブユニットである gp91phox タンパク質発現は ET 群で有意に低下した(Fig.3B,D)。
7. 二重蛍光免疫染色による Desmin ならびに Laminin5 タンパク質の発現シグナルが ET 群で増強しており、骨格筋細胞の再生の改善が認められた(Fig.4A,B)。MuSCs の動員・ホーミングに関する検討では、ET 群の CD34⁺/Integrin α 7⁺ MuSCs 数が下肢筋肉と骨髄、末梢血において有意に増加していた(Fig.4C-E,5A,B)。
8. アディポネクチン中和抗体群 (pAb-Adip 群) では、ET 単独群に比べ、①持久力低下とドロップアウト回数の増加、および下肢筋肉における筋肉重量や筋断面積の減少、②p-AMPK α 、p-Akt、p-mTOR 発現量の低下、③Bcl-XL 発現減少ならびにアポトーシス細胞数の増加(Fig.6)、④COX4 および PGC-1 α 遺伝子発現レベルの低下に伴うミトコンドリアの損傷と脂肪滴蓄積の増加が示された(Fig.7)。また pAb-Adip 群の CD34⁺/Integrin α 7⁺ MuSCs の数が、骨格筋、骨髄および末梢血で減少することが明らかになった(Fig.8)。

【考察】

ET は、アディポネクチン分泌および骨格筋の AdipoR1 mRNA 発現増加だけでなく、PGC-1 α 発現増加によるミトコンドリア生合成を改善し、Akt/mTOR シグナル活性化によりタンパク質合成と骨格筋細胞増殖を活性化した。同時に、ET は酸化ストレス産生を遅らせ、抗アポトーシス分子 (Bcl-XL) 発現を回復した。また、ET は、SAMP10 マウスのアディポネクチン/AdipoR1 経路を介して AMPK を活性化し、BM 由来 CD34⁺/Integrin α 7⁺ MuSCs の動員、増殖、ホーミングを刺激し、加齢に伴う骨格筋萎縮および再生能を改善し得ることが示唆された。アディポネクチン中和抗体は、ET による上記の有益な骨格筋保護作用と骨格筋機能改善を抑制することが確認された。

【結論】

本研究により加齢に伴い発症するサルコペニアやフレイルなどの骨格筋疾患に対する予防や治療として、エクササイズが有効であることが科学的に証明された。さらに、加齢に伴うサルコペニアに対し、アディポネクチンの分泌促進や骨髄 MuSCs 移植治療ならびに遺伝子治療法の開発の有効性が示唆された。