

＜研究課題＞ 運動が加齢性筋萎縮を予防する新規分子基盤の解明

代表研究者 名古屋市立大学大学院理学研究科 准教授 奥津 光晴

【まとめ】

本研究では、運動による p62 の変動と加齢性筋萎縮に対する p62 の役割を検討した。その結果、定期的な運動は骨格筋の p62 のリン酸化を促進し、抗酸化物質の増加に関与するが、p62 を欠損あるいは恒常的にリン酸化しても加齢性筋萎縮には直接的には関与しない可能性を立証した。現段階では異なる種類の筋重量の解析、遺伝子発現やタンパク発現の評価は完結しておらず、本研究で採取した検体を使用したさらなる検討が必要である。

1. 研究の目的

加齢は骨格筋の量と機能の減少（筋萎縮）を誘導する。骨格筋は、動作や姿勢維持の他、血糖や体温などを調節することで生体の恒常性を維持することから、筋萎縮を誘導する分子メカニズムを解明し予防や軽減に応用することは、健康寿命の延伸や医療費削減の観点から社会的意義のある研究課題である。

筋萎縮を予防や軽減する方法は適切な栄養摂取など様々な方法があるが、定期的な運動は筋萎縮を防ぐ効果的な方法の一つである。運動は、筋萎縮を誘導する酸化ストレスや炎症性サイトカインを抑制したり、タンパクの合成と分解を適正化することで筋萎縮を抑制することが報告されている。しかしながら、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

そこで本研究では p62/sqstm1 に着目した。p62 はオートファジーやユビキチンなどのタンパク分解機構の調節に関わる因子として広く知られている<sup>1-2)</sup>。また近年では、抗酸化物質の産生を調節する Nrf2 や炎症性サイトカインの産生に関わる NF- $\kappa$ B などの修飾にも関与することが報告されている<sup>1-2)</sup>。したがって、p62 を調節することで酸化ストレスや炎症性サイトカインを軽減し筋萎縮を抑制できる可能性が期待できる。しかしながら、運動は p62 を制御するか、また p62 は加齢性筋萎縮を軽減するかは未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、定期的運動による p62 の変動と加齢性筋萎縮に対する p62 の役割を立証することを目的とし、加齢性筋萎縮を効果的に予防や軽減する新たな方法の構築への

貢献を目的とした。

2. 研究方法・経過

自発的な運動トレーニングを実施させたマウスの骨格筋を採取し、p62、リン酸化 p62 と抗酸化酵素の変動の検討を第一の研究課題として実施した。実験は雄性 C57BL/6 マウスに自発走行トレーニングを 4 週間実施させ、運動期間終了後に骨格筋を採取した。採取は運動期間最終日の一過性の運動の影響を排除するため、運動期間終了 24 時間後に実施した。骨格筋採取後、タンパクを抽出し、p62、リン酸化 p62 と抗酸化酵素である Copper/Zinc superoxide dismutase (CuZnSOD)、manganese SOD (MnSOD)、extracellularSOD (EcSOD) の発現をウェスタンブロットにて評価した。

筋特異的に p62 を欠損あるいは発現増強したマウスを長期飼育し、加齢性筋萎縮に対する p62 の役割の立証を第二の研究課題として実施した。筋特異的 p62 欠損マウスは mlcl1f-cre マウスと p62 flox マウスを交配して作成した。また筋特異的 p62 発現増強マウスは、muscle creatine kinase で p62 の発現を調節するプラスミドを設計して作成した。作成したマウスは 24 ヶ月齢になるまで通常飼育した。飼育期間終了後、最大筋力と筋持久力を測定した。測定後、マウスから骨格筋を採取し筋重量を測定した。

全ての動物実験は、動物実験を実施する名古屋市立大学動物実験審査委員会より承認を得た後に実施した。遺伝子組換えに該当する実験は、名古屋市立大学遺伝子組換え実験審査委員会に申請し実施した。

3. 研究の成果

3-1 定期的運動による p62 および p62 のリン酸化の変動

4 週間の自発走行運動をマウスに実施させ、遅筋優位なヒラメ筋と速筋優位な白色広筋の p62 およびリン酸化 p62 の発現を評価した。その結果、定期的な自発走行運動はヒラメ筋の p62 の発現を増加したが、白色広筋の p62 は増加しなかった (図 1A, B)。また、定期的な運動は、ヒラメ筋の p62 の 351 番目のセリ

ン残基のリン酸化を促進したが、白色広筋ではリン酸化を促進しなかった (図 1A、B)。

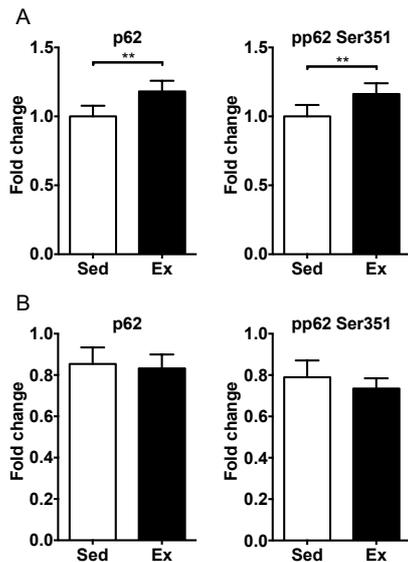


図1. 運動によるヒラメ筋と白色広筋のp62とリン酸化p62の変化。A) ヒラメ筋、B) 白色広筋、Sed: 安静群、Ex: 運動群、\*\*: $p < 0.01$

### 3-2 定期的運動による抗酸化物質の変動

4 週間の自発走行運動をマウスに実施させ、速筋と遅筋が混在する足底筋の抗酸化物質の変動を評価した。その結果、抗酸化酵素である MnSOD、CuZnSOD および EcSOD は安静群に比べて有意に増加した (図 2)。

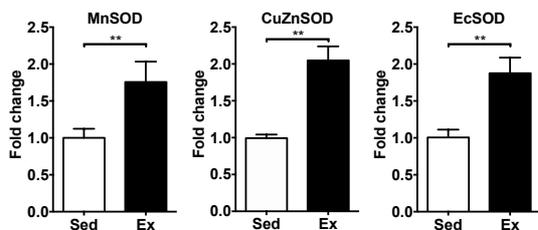


図2. 運動による抗酸化物質の変化。Sed: 安静群、Ex: 運動群、\*\*: $p < 0.01$

### 3-3 筋特異的 p62 の欠損による、生存率、筋力と筋重量の変動

加齢性筋萎縮に対する p62 の役割を立証するため、p62 を筋特異的に欠損したマウスとその野生型同腹子を 24 ヶ月齢まで飼育し老齢マウスを作成した。飼育期間中はマウスの生存を毎日確認した。飼育期間終了後、筋力と筋重量を測定し 10 週齢の各若齢マウスと比較した。その結果、生存率は、p62 欠損マウスと野生型マウスの間に有意差は見られなかった (図 3A)。最大筋力と持久力は加齢により低下するが、この低下は野生型マウスと p62 欠損マウスの間に有意な違いは観察され

なかった (図 3B、C)。また、速筋と遅筋が混在した腓腹筋の重量は加齢により低下するが、この低下は野生型マウスと p62 欠損マウスの間に有意な違いは観察されなかった (図 3D)。

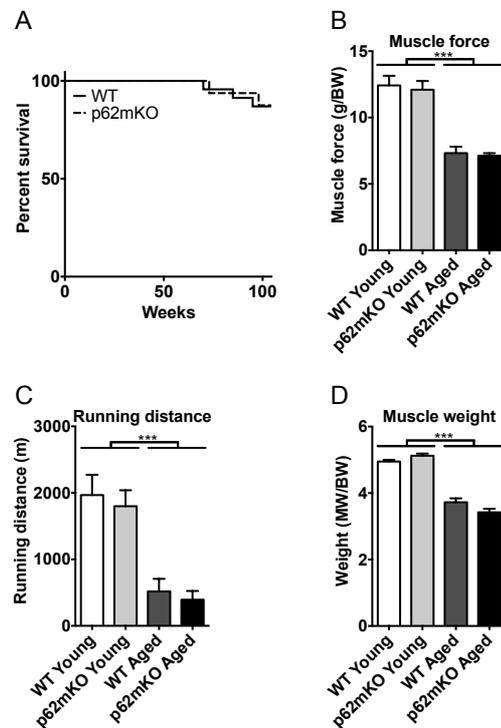


図3. 加齢による筋特異的p62欠損マウスと野生型マウスの筋力および筋重量の比較。A) 生存率、B) 最大筋力、C) 筋持久力、D) 腓腹筋重量、WT Young: 野生型若齢マウス、p62mKO Young: 筋特異的p62欠損若齢マウス、WT Aged: 野生型老齢マウス、p62mKO Aged: 筋特異的p62欠損老齢マウス、\*\*\*: $p < 0.001$

### 3-4 筋特異的 p62 の発現増強による生存率、筋力と筋重量の変動

加齢性筋萎縮に対する p62 の役割をさらに詳細に検討するため、p62 を筋特異的に発現増強したマウスとその野生型同腹子を 24 ヶ月齢まで飼育し老齢マウスを作成した。飼育期間中はマウスの生存を毎日確認した。飼育期間終了後、筋力と筋重量を測定し 10 週齢の各若齢マウスと比較した。その結果、その結果、生存率は、p62 発現増強マウスと野生型マウスの間に有意差は見られなかった (図 4A)。最大筋力と持久力は加齢により低下するが、この低下は野生型マウスと p62 発現増強マウスの間に有意な違いは観察されなかった (図 4B、C)。また、腓腹筋の重量は加齢により低下するが、この低下は野生型マウスと p62 発現増強マウスの間に有意な違いは観察されなかった (図 4D)。

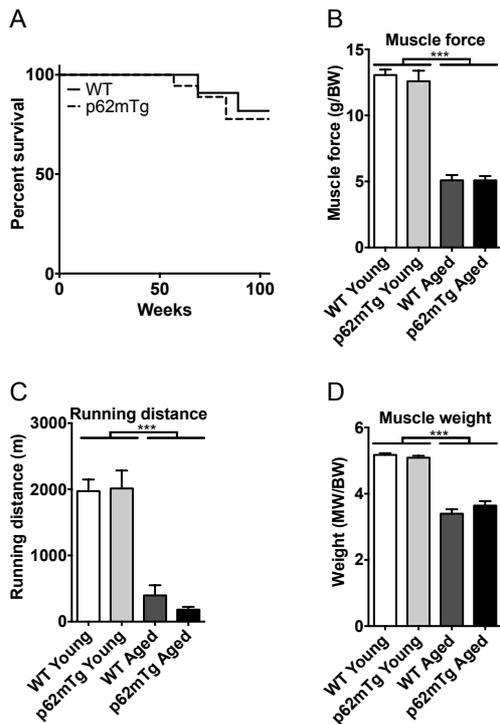


図4. 加齢による筋特異的p62発現増強マウスと野生型マウスの筋力および筋重量の比較。A) 生存率、B) 最大筋力、C) 筋持久力、D) 腓腹筋重量、WT Young: 野生型若齢マウス、p62mKO Young: 筋特異的p62発現増強若齢マウス、WT Aged: 野生型老齢マウス、p62mKO Aged: 筋特異的p62発現増強老齢マウス、\*\*\*:  $p < 0.001$

#### 今後の課題

本研究では、筋特異的に p62 を欠損あるいは発現増強したマウスを長期飼育し、加齢性筋萎縮に対する p62 の役割を検討した。その結果、定期的な運動は骨格筋の p62 のリン酸化を促進し、抗酸化物質の増加に関与するが、p62 を欠損あるいは恒常的にリン酸化しても加齢性筋萎縮には直接的には関与しない可能性が示唆された。しかしながら、本研究では、老齢マウスとして 24 ヶ月間の飼育を実施したため、採取した検体の詳細な解析が现阶段では実施できていない。骨格筋は速筋と遅筋で大別できるが、廃用性症候群やギプス固定などの不活動では遅筋、加齢や疾患では速筋が選択的に萎縮することが知られている。本報告では速筋と遅筋が混在する腓腹筋のみの報告となっており、今後若齢マウスの遅筋線維優位なヒラメ筋や速筋線維優位な長趾伸筋の解析を進め、老齢マウスと比較することで、加齢性筋萎縮に対する p62 の役割をより正確に立証する必要がある。

我々は、運動が加齢性筋萎縮を防ぐ分子メカニズムを解明し、効果的な筋萎縮予防方法

の開発への応用を目指している。今後、本研究をさらに詳細に解析した結果を基盤とし、新たな運動プログラムの開発や創薬への応用を目指した研究の推進が必要である。

#### 5. 研究成果の公表方法

本報告書に記載した実験結果のうち、長期飼育に関する研究は、p62 の欠損マウスと発現増強マウスの骨格筋をさらに詳細に解析し、両マウスの解析結果を統合して発表する。現在は研究実施中のためまだ公表していないが、2022 および 2023 年度に日本分子生物学会や日本体力医学会での発表と分子生物学や加齢の研究に関する質の高い国際雑誌への投稿を計画している。

#### 参考文献

- 1) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y. S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213-223.
- 2) Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y. S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M. S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., and Komatsu, M. (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell* 51, 618-631.