

博士論文

骨格筋細胞の構造・機能特性におけるアディポネクチン
受容体活性化とミオスタチン遺伝子多型の関与

A physiological role of adiponectin receptor-associated intracellular
signal and single-nucleotide polymorphism in myostatin gene in both
structural and functional properties in mammalian skeletal muscle

西暦 2019 年 3 月

伊藤 理香

山口大学大学院創成科学研究科

目次

1章	序論	
I.	社会的な背景	1
II.	骨格筋の機能とその可塑性	1
III.	骨格筋量の調節	2
III-1.	筋タンパクの合成と分解	2
III-2.	筋タンパクの合成と分解のバランスと AMPK	2
III-3.	骨格筋特異的組織幹細胞「筋衛星細胞 (サテライトセル)」	3
III-4.	アディポネクチンと骨格筋量	3
III-5.	ミオスタチンと骨格筋量	4
IV.	本研究の目的	4
2章	アディポネクチン受容体の活性化は、C2C12 筋管および速筋型マウス骨格筋の 筋肉量に悪影響を及ぼす	
I.	緒言	6
II.	研究方法	
A.	倫理規定の遵守	7
B.	対象と検討方法	7
1.	C2C12 筋管に対する AdipoRon の影響	7
2.	AdipoRon 投与がマウス骨格筋量に与える影響	8
3.	若齢および老齢マウス骨格筋における Adipo および AdipoR 発現量	9
C.	分析方法	9
D.	統計処理	11
E.	利益相反情報	12
III.	結果	
1.	C2C12 筋管に対する AdipoRon の影響	12
2.	AdipoRon 投与がマウス骨格筋量に及ぼす影響	13
3.	若齢および老齢マウスの骨格筋におけるアディポネクチンおよびその受容体の 発現量	13
IV.	考察	14
V.	結論	15
	付図	17
3章	ミオスタチンSNPがオスのサラブレッドが骨格筋特性に及ぼす影響	
I.	緒言	29
II.	研究方法	
1.	動物およびトレーニングプロトコル	30

2. 筋肉のサンプリング	30
3. 免疫組織化学分析	31
4. RNA 抽出および real-time RT-PCR	31
5. 統計処理	31
III. 結果	
1. 体重	32
2. 筋線維の組織化学的性質	32
3. mRNA 発現	32
IV. 考察	33
付図	36
4章 まとめ	41
謝辞	43
引用文献	44
要旨	53
論文目録	54

1 章 序論

I. 社会的な背景

日本ではこれまでにその国も経験したことの無い少子高齢化が進行し、2040年には65歳以上の高齢者の割合が人口の30%を超えると推定されている（総務省 2018）。こうしたことから、高齢者の医療費などの社会保障関連支出は増加の一途をたどり、国の財政を圧迫している。そこで、政府としても、健康な高齢者を増やすべく、健康寿命の延伸を目指して様々な施策を講じている。

高齢者はもちろん現代の日本人の身体活動量は減少傾向にあり、それに伴い運動器機能も低下している（Kadono Y et al 2010）。運動器（骨、筋肉、関節、靭帯、腱、神経など）の障害に起因した移動機能の低下であるロコモティブシンドローム（運動器症候群）（Nakamura K 2008）や加齢に伴う骨格筋量の減少と筋力や身体的機能の低下であるサルコペニア（加齢性筋肉減弱症）（Rosenberg IH 1997）、そして高齢者が脆弱性を増加した状態（移動能力、筋力、バランス、認知機能、栄養状態、日常生活の活動性、疲労感なども含む）を意味するフレイル（Fried LP et al 2001）など、運動機能の低下は健康寿命の延伸に対して負に作用することから、運動器機能、特にその中心的な役割を担う骨格筋量の維持や増加は重要な対策の1つとなっている。

II. 骨格筋の機能とその可塑性

骨格筋は様々な生理活性物質や成長因子を分泌する内分泌器官であり（Iizuka K et al 2014）、熱産生などの機能を持つ（Stromme SB et al 1967; Chin A et al 1973）。骨格筋機能の発現には骨格筋量が重要であり、筋力は基本的に筋横断面積に比例する（Fukunaga T et al 1992）。

骨格筋は機能的かつ形態的に可塑性に富む器官である。筋力トレーニングなどの抵抗運動やストレッチなどの機械的刺激あるいは温熱刺激などにより、骨格筋は形態的に肥大し、筋力は増大する（Goldspink G 1999; Tsika RW et al 1987）。逆に、各種疾患や怪我などによる長期臥床（ベットレス）やギブス固定などの不活動、宇宙環境への曝露による荷重除去、神経切断、がんや糖尿病などによる疾患、栄養失調などによって骨格筋は萎縮し、筋力や筋持久力が低下する（Greenlund et al 2003）。例えば、3週間のベットレストにより、下肢の骨格筋量は2~10%低下する（Akima H et al 1997）。この様な不活動による廃用性筋萎縮では、速筋と遅筋共に萎縮するが、速筋に比べて抗重力筋である遅筋の萎縮が顕著である（Musacchia XJ et al 1992）。また、廃用性に萎縮した遅筋では、筋線維タイプの移行すなわち遅筋の速筋化が認められる（Thmason DB et al 1990）。一方、サルコペニアでは速筋優位な萎縮が認められ、廃用性萎縮とは逆に速筋の遅筋化を認める（Doherty TJ 2003）。また、萎縮に伴う筋線維数の減少はサルコペニアにおいてのみ認められ、廃用性筋萎縮では認められない（Poggi P et al 1987）。

加齢も骨格筋に大きなインパクトを与える要因として知られている。成長期において、

筋断面積は年齢と共に増加する (Kanehisa H et al 1994; Kanehisa H et al 1995) が、20 歳以降は骨格筋萎縮が認められるようになり、骨格筋量は 50 歳までに約 10%、50 歳から 80 歳までに 30% から 50% 減少する (Janssen I et al 2000)。歩行速度においては、60 歳以降から年間で 1.2% から 1.6% 低下することが報告されている (Himann JE et al 1998)。運動器である骨格筋機能の維持は高齢者の生活の質の向上ならびに医療費削減のためにも、骨格筋量を維持と増進させることは重要である。

Ⅲ. 骨格筋量の調節

骨格筋量は、タンパクの合成と分解のバランスによって制御されている。筋力トレーニングに代表される骨格筋を肥大させる刺激は、タンパクの合成と分解のバランスを合成側に傾けることで、筋タンパク量が増え、その結果として骨格筋量が増加すなわち筋肥大に至る。逆に、不活動や加齢など骨格筋を萎縮させるような条件下では、タンパク分解が合成に比べて増加することで、筋タンパク量が減少し、骨格筋は萎縮する。このように、骨格筋の肥大と萎縮については、それらの現象は明らかであるものの、筋肥大ならびに筋萎縮の分子機構の全貌は未解明である。このことが、不活動や加齢に伴う骨格筋萎縮の有効な予防策の確立に至っていない最大の要因である。

Ⅲ-1. 筋タンパクの合成と分解

筋タンパクの合成は、遺伝子の転写と翻訳レベルで調節されていると考えられている。これまで、インスリン様成長因子 1 (IGF1) と Akt-mTOR-p70 S6 kinase などの下流シグナルの関与について多くの研究が報告されている (Glass DJ 2005)。しかし、こうした細胞内シグナルの変動は、筋タンパクレベルを間接的に評価しているに過ぎない。近年、放射線アイソトープを用いなくとも簡単に生細胞のタンパク合成速度を直接評価する surface sensing of translation (SUnSET) 法が確立した (Schmidt EK et al 2009)。この SUnSET 法では、puromycin と呼ばれる抗生物質を用いるが、この puromycin が翻訳中のペプチドに取り込まれ、すべてのタンパクにおけるこの puromycin を含むタンパクの割合からタンパク合成速度を評価できる。

タンパク分解経系は、ubiquitin-proteasome 系、calpain 系、lysosome (Autophagy) 系がある。骨格筋の萎縮には ubiquitin-proteasome 系が主な分解系であると考えられている (Lecker SH et al 2004)。Calpain 系は、Ca²⁺依存性のプロテアーゼで、機能タンパク質や構造タンパク質を選択的に分解する (Suzuki K et al 1987)。Lysosome (Autophagy) 系は、細胞内タンパク質を非選択的に分解する、バルク分解系である (Masiero E et al 2009)。また、AMP 依存性タンパクキナーゼ (AMPK) もタンパク分解に関与している (Egawa T et al 2015)。

Ⅲ-2. 筋タンパクの合成と分解のバランスと AMPK

骨格筋量すなわちタンパク合成と分解のバランスは、細胞内エネルギーバランスが関

与していると考えられている。AMPK は、細胞内のエネルギーセンサーとして機能し、ATP 低下すなわち AMP の増加により活性化される。AMPK の活性化は糖脂質代謝を介してエネルギー産生を活性化する。さらに、エネルギー消費系であるタンパク合成を抑制し、細胞内 ATP レベルを回復することで、細胞内エネルギー環境の恒常性維持に寄与していると考えられている。AMPK を活性化することで、ubiquitin-proteasome 系などタンパク分解系も刺激される (Krawiec BJ et al 2007; Nakashima K et al 2007)。したがって、AMPK は骨格筋量を負に制御する (Egawa T et al 2015)。

III-3. 骨格筋特異的組織幹細胞「筋衛星細胞 (サテライトセル)」

骨格筋には、骨格筋特異的組織幹細胞が存在している。この細胞は、筋衛星細胞 (サテライトセル) と呼ばれ、単核細胞であり、筋細胞形質膜の外側かつ基底膜の内側に、1 個の筋細胞当たり数個の筋衛星細胞が存在している。筋細胞が損傷した際に、増殖して、損傷部位に融合することで、損傷した筋細胞の修復する細胞である (Ishido M et al 2009; He L et al 2008; Ishido M et al 2006)。筋衛星細胞には paired box transcription factor-7 (Pax7) が特異的に発現しているが、この Pax7 ノックアウトマウスでは、損傷した骨格筋の再生は著しく抑制される (Kuang S et al 2006)。

最近、この筋衛星細胞は、損傷骨格筋の再生だけでなく、骨格筋の生後の成長や肥大にも寄与することが報告された (Lepper C et al 2011; Sambasivan R et al 2011)。骨格筋肥大は、骨格筋組織を構成する個々の筋細胞の肥大によるが、この個々に肥大した筋細胞では、筋核が増加している (Kadi F et al 1999; Anderson JE 2006; Zammit PS et al 2006)。肥大する前と肥大した筋細胞における筋核当たりの筋細胞の容積 (筋核ドメインサイズ) は、一定である (Kadi F et al 1999; Petrella JK 2006; Kadi F et al 2004)。一方で、筋細胞の核 (筋細胞の形質膜の内側にある核を筋核と呼ぶ) では細胞周期は停止しており、骨格筋に肥大を引き起すような刺激を負荷しても核分裂を示す証拠は認められない (Kadi F et al 2004)。このことは、肥大した筋細胞における増加した筋核は、筋細胞の外側から融合したものであることが示唆される。実際、骨格筋に肥大を引き起すような刺激を負荷すると、筋衛星細胞は増殖する (Mauro A 1961; Snow MH 1977)。したがって、筋肥大を引き起こす刺激に応じて筋衛星細胞が増殖し、融合した結果、筋細胞の容積が増加することによるものと考えられている (Kadi F et al 1999; Anderson JE 2006; Zammit PS et al 2006)。つまり、骨格筋量を増加させるためには、筋衛星細胞を活性化させる刺激を負荷すればよいと考えられる。

III-4. アディポネクチン (Adipo) と骨格筋量

Adipo は、脂肪細胞に特異的に発現すると考えられてきたアディポカインの 1 つである (Yamauchi T et al 2007; Yamauchi T et al 2003)。一般に、循環血液を介して全身の標的細胞に達して、標的細胞の細胞膜上に存在するアディポネクチン受容体 (AdipoR) に結合して作用を発現する (Yamauchi T et al 2003)。AdipoR は AdipoR1 と AdipoR2 の

2種類存在し、主として骨格筋細胞と肝細胞に発現している (Kadowaki T et al 2005)。骨格筋細胞には主として AdipoR1 の発現が、肝細胞には AdipoR2 の発現がそれぞれ認められる (Kadowaki T et al 2005)。これまで、Adipo の作用としては抗動脈硬化、抗炎症作用ならびにインスリン感受性が知られ、肥満を基盤とした代謝異常の正常化や血管保護にも作用することが示されている (Yamauchi T et al 2003)。こうした Adipo の作用は、健康寿命延伸効果そのものであることから、Adipo を「善玉アディポカイン」あるいは「長寿ホルモン」と呼ぶこともあり、血液中の濃度 (血中濃度) が高い程、健康に寄与すると一般に考えられている (Atzmon G et al 2008)。

最近の疫学研究により、高齢者の血液中 Adipo 濃度は、筋力や筋量の低下すなわちサルコペニアの危険因子であることが示唆されている (Huang C et al 2015)。前述したように、全身糖脂質代謝を亢進し、体脂肪減少やインスリン感受性作用を持つなど Adipo は善玉アディポカインの 1 つとして一般的に考えられていることから、この高濃度 Adipo の悪玉アディポカインとしての作用については「アディポネクチン・パラドックス」として注目されている (Menzaghi C et al 2018; Woodward L et al 2017)。しかし、高濃度 Adipo が骨格筋萎縮をもたらす分子機序に関する研究報告はなく、その真偽は不明である。

III-5. ミオスタチンと骨格筋量

ミオスタチンは、骨格筋の量を制御する重要な分子として知られている (Jespersen J et al 2006)。骨格筋を構成する筋細胞は多核細胞であるが、筋細胞におけるこうした多核の由来は、筋細胞の分化で説明できる。筋細胞は、単核の筋芽細胞が一定方向に配列しながら融合を繰り返すことで形成される (分化する)。ミオスタチンは、この筋芽細胞の増殖および筋細胞への分化を抑制する作用を持つことによって、骨格筋の成長を阻害するトランスフォーミング成長因子 b ファミリー (TGF-b) のメンバーである。したがって、ミオスタチンの発現抑制は、骨格筋の成長を誘導する (Steelman CA et al 2006; Murphy KT et al 2010)。また、サラブレッドのミオスタチン遺伝子一塩基多型 (SNP) は、その馬の至適走行距離と関連していることが報告されている (Hill EW et al 2010; Tozaki T et al 2011)。しかし、ミオスタチン SNP が筋衛星細胞の活性化や増殖に与える影響は明らかでない。さらに、運動刺激は筋衛星細胞を活性化させるが、ミオスタチン SNP の影響は不明である。

IV. 本研究の目的

本研究では、アディポネクチンとミオスタチンに着目して、骨格筋量を調節する仕組みに関して、次のような2つの仮説を立て、それぞれ検証するために実験を実施した。

1) 仮説 1 : 「高濃度アディポネクチンは骨格筋を萎縮させる」

高濃度アディポネクチン (Adipo) は骨格筋を萎縮させるという仮説を立証するため

に、培養細胞を用いた実験と実験動物（マウス）を用いた実験を計画した。

Adipo は入手が困難であることから、AdipoR のアゴニストである AdipoRon を用いて、AdipoR の活性化が、骨格筋量に及ぼす影響について、培養筋細胞モデルならびに実験動物を用いて検討した。培養細胞モデルには、マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 から分化誘導した筋管細胞を用いて、培地に異なる濃度の AdipoRon を添加して、その影響を評価した。また、AdipoR をノックダウンすることで、AdipoRon の C2C12 筋管細胞に対する影響が AdipoR を介したものであるかも併せて検討した。動物実験では、実験動物である C57BL/6J 雄性マウスを用いて、AdipoRon を静脈投与し、マウス下肢骨格筋に及ぼす影響を評価した。

2) 仮説 2 : 「ミオスタチン SNP は骨格筋トレーニング効果を変調させる」

ミオスタチン一塩基多型 (SNP) は骨格筋トレーニング効果を変調させるという仮説を立証するために、雄性サラブレッド骨格筋を対象とする実験を計画した。

サラブレッドのミオスタチン SNP は 4 種類報告されている (Hill EW et al 2010; Tozaki T et al 2011)。その中で、特に影響が大きいと報告されているミオスタチン遺伝子の第1イントロンに位置するg.66493737C> TのSNPに関して、雄性サラブレッド骨格筋における筋衛星細胞関連遺伝子発現を解析した。また、トレーニングが特定のミオスタチン SNP を持つサラブレッドに対するトレーニングが、筋衛星細胞関連遺伝子発現に及ぼす影響を検討し、骨格筋に対するトレーニング効果発現におけるミオスタチン SNP の影響の評価を試みた。また、骨格筋酸化能の評価もあわせて実施した。

2章 アディポネクチン受容体の活性化は、C2C12筋管および速筋型マウス骨格筋の筋肉量を低下させる

I. 緒言

骨格筋は大きな可塑性を持つ器官である。骨格筋の形態と機能は、細胞内外の刺激に応じて適応し、変化する。骨格筋萎縮は、不活動や荷重除去、そして栄養失調や癌、糖尿病あるいは心不全など様々な病態に伴って引き起こされる (Goto K et al 2003; Lecker SH et al 2004)。サルコペニアは加齢による骨格筋量と機能の低下を伴う骨格筋の脆弱化として知られ、結果的に全身の身体機能の低下をもたらす (Janssen I et al 2002)。さらに、こうした身体機能の低下は、肥満、骨粗鬆症、虚弱などの様々な生活習慣病を引き起こし、さらなる不活動をもたらす (Handschin C et al 2008)。したがって、骨格筋の量および機能の維持は、65歳以上の高齢者の人口の割合が増加するほとんどの国において優先的に解決されるべき課題となっている。なぜなら、こうした国では、社会の高齢化に伴い健康医療費が増加しているためである (Bock JO et al 2016; Janssen I et al 2004)。しかし、加齢に伴う骨格筋量の減少の分子メカニズムは依然として不明である。

基礎研究により、アディポネクチン (Adipo) は脂肪細胞で合成され、分泌されるアディポカインであり、標的組織や細胞に発現するアディポネクチン受容体 (AdipoR) を介して、インスリン感受性、抗炎症作用、エネルギー代謝効果など様々な生理作用を示す (Yamauchi T et al 2007; Yamauchi T et al 2003)。Adipo の主な標的組織である骨格筋では、AdipoR1 の発現量が高く、主として肝細胞に発現している AdipoR2 の発現量は低い (Kadowaki T et al 2005)。

最近、循環血液中の Adipo 濃度と死亡率や様々な臨床病態との間に負の相関関係が存在していること、いわゆる「アディポネクチン・パラドックス」がいくつかの疫学研究により示されている (Menzaghi C et al 2018; Woodward L et al 2017)。例えば、循環血液中 Adipo 濃度と骨格筋量あるいは筋力には負の相関にあることが報告されている (Huang C et al 2015; Gotoda T 2016; Loncar G et al 2013)。しかしながら、血中 Adipo 濃度の増加が骨格筋量に及ぼすことを示す実験的研究報告はない。

骨格筋細胞には、AdipoR だけでなく Adipo 自身も発現している (Goto A et al 2013; Delaigle AM et al 2004)。また、骨格筋細胞内の Adipo は、自己分泌および傍分泌様式で分泌されていることが示唆されている (Goto A et al 2013)。仮に、高濃度 Adipo が骨格筋量に影響を及ぼすのであれば、骨格筋における Adipo および AdipoR の発現量は骨格筋量を調節する重要な要因となり得ると考えられる。しかし、加齢に伴う骨格筋における Adipo および AdipoR の発現量の変化に関する研究報告はない。

骨格筋量は、タンパク合成と分解の動的バランスによって調節されている。機械的ストレッチのような筋肥大刺激は、タンパク合成を増加させ、筋タンパク量を増加させ、筋肉量の増加すなわち筋肥大を引き起こす (Goldspink G 1999; Perrone CE et al 1995)。一方、荷重除去は、骨格筋細胞におけるタンパク分解を刺激し、筋タンパクを低下させ、

筋肉量の減少、すなわち筋萎縮を誘発する (Goto K et al 2003; Goto A et al 2013; Sandri M et al 2004)。骨格筋に対する Adipo の影響に関しては、インスリン感受性や Adipo によって活性化される AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) に対して容量依存的な効果があることに関して多くの報告はあるが (Høeg LD et al 2013; Yamauchi T et al 2002)、様々な濃度の Adipo が骨格筋におけるタンパク合成および分解に及ぼす影響は不明である。

そこで本研究では、高濃度の Adipo が骨格筋萎縮を引き起こすか否かを明らかにするために、AdipoR アゴニストである AdipoRon 投与が培養骨格筋細胞およびマウス骨格筋量に及ぼす影響を検討した。また、マウス骨格筋における Adipo および AdipoR の発現量に対する加齢の影響もあわせて検討した。

II. 研究方法

A. 倫理規定の遵守

マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 を細胞培養実験に用いた。すべての動物実験は、米国国立衛生研究所 (NIH : Bethesda, MD) による実験動物の保管および使用のガイドラインに従って実施され、豊橋創造大学動物実験委員会によって承認を受けて実施された (承認番号 A2014002、A2015002、A2016004、A2017007)。実験動物に対するすべての処置は、ペントバルビタールナトリウム腹腔内注射による麻酔下で行い、実験動物の不快感や苦痛を防ぐためのあらゆる努力を講じた。実験には、10 週齢 (若齢) および 100 週齢 (老齢) の C57BL/6J 雄性マウスを用いた。すべてのマウスは 12 時間の明暗サイクル環境下で、室温約 23°C および湿度約 50% に維持された実験動物飼育室にて飼育した。なお、固形飼料および水は自由摂取とした。

B. 対象と検討方法

1. C2C12 筋管に対する AdipoRon の影響

1) 培養細胞実験

タイプ I コラーゲンでコーティングされた培養プレート (BioCoat, 12 ウェル: Corning, New York, USA) を用いて、C2C12 筋芽細胞を増殖培地 (ダルベッコ改変イーグル培地: DMEM high glucose + 10% fetal bovine serum) で 24 時間増殖させた。この 2 日間の増殖により、C2C12 筋芽細胞は約 80% コンフルエント状態に達した。その後、分化培地 (DMEM low glucose + 2% horse serum) へ交換することにより C2C12 細胞に分化を誘導し、5 日間培養を継続した。分化培地は 1 日おきに交換された。mRNA の解析は siRNA 添加 24 時間後を分析サンプルとし、タンパクの解析は分化誘導後 5 日後を分析サンプルとした。

2) RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンと分析サンプル

播種から 24 時間後、Lipofectamine™ RNAiMAX トランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて、業者提供のマニュアルに従って短い RNA 配列 (siRNA) を C2C12 筋芽細胞にトランスフェクトした。siRNA のトランスフェクションの詳細は、前報に記載されている (Egawa T et al 2014)。ここでは簡潔に、Lipofectamin/siRNA 複合体を増殖培地に添加し、その状態で C2C12 筋芽細胞を 24 時間インキュベートした。siRNA の最終濃度は、AdipoR1 または AdipoR2 の単独のノックダウンは 5 nM、AdipoR1 および AdipoR2 の同時ノックダウンの際には 10 nM にそれぞれ設定した。siRNA 導入開始 24 時間後、培地を分化培地 (DMEM low glucose + 2% horse serum) に交換した。その後、分化培地は 1 日おきに交換した。

アディポネクチン受容体 1 (AdipoR1) に対する siRNA (siAdipoR1 : 標的配列 5'-CAGGGATTGCTCTACTGATTA-3')、アディポネクチン受容体 2 (AdipoR2) に対する siRNA (siAdipoR2 : 標的配列 5'-CAGGCCCATCATGCTATGGAA-3') およびスクランブル非標的 siRNA (siScramble : All Stars Negative Control) の各 siRNA は Qiagen (Hilden, Germany) から入手した。各 siRNA のノックダウン効率は、リアルタイム RT-PCR を用いて確認した。本研究で用いた siRNA により、AdipoR1 および AdipoR2 の mRNA 発現量は約 76~90%低下した (Supplemental Fig 1)。なお、ノックダウンのポジティブコントロール実験を、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対する siRNA (4390849 : Silencer™ Select GAPDH positive control, Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。この実験では、GAPDH mRNA は約 90%減少した (Supplemental Fig 2)。この結果より、本研究で用いた siRNA によるノックダウン実験は、良好に機能していたと判断した。

3) AdipoRon 処置

本研究では、Adipo の代わりに AdipoR のアゴニストである AdipoRon (AdipoGen Life Sciences, San Diego, CA) が C2C12 筋管細胞に与える影響を検討した。AdipoRon は AdipoR に結合し、AMPK 関連細胞内シグナル伝達を介して Adipo による生理機能を発現する (Høeg LD et al 2013; Okada-Iwabu M et al 2013)。分化誘導 5 日後、AdipoRon を分化培地に添加し、その後 36 時間 C2C12 筋管細胞をインキュベートした。なお、AdipoRon は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。培地中の AdipoRon 最終濃度は、0、5、10 および 20 μ M に設定した。36 時間の AdipoRon インキュベーションの後、細胞を回収した。

2. AdipoRon 投与がマウス骨格筋量に与える影響

本研究では、AdipoRon 投与が骨格筋量に与える影響について、C57BL/6J 雄性マウス (10 週齢) を用いて検討した。マウスは、対照群 (n = 7) と AdipoRon 投与群 (n = 5) の 2 群に無為作為に分類した。

先行研究 (Okada-Iwabu M et al 2013) に従い、DMSO (0.75 μ l/g 体重) に溶解した AdipoRon (50 mg/kg 体重) を AdipoRon 投与群のマウスの尾静脈から投与した。本研究では血清中の AdipoRon 濃度を評価していないが、本研究で用いた AdipoRon 投与量は Adipo と同様に多様な生理作用を引き起こすことが予想されている (Okada-Iwabu M et al 2013)。AdipoRon の投与は、1 日 1 回、週 3 日、4 週間継続した。対照群のマウスには、DMSO (0.75 μ l/g 体重) のみを尾静脈より投与した。最終投与日より 3 日後、両群のマウス両後肢より遅筋型のヒラメ筋 (SOL) および速筋型の足底筋 (PLA) を摘出した。摘出した筋組織は、余分な脂肪および結合組織を切除後、秤量し、液体窒素中で凍結して -80°C で保存した。

3. 若齢および老齢マウス骨格筋における Adipo および AdipoR 発現量

本研究では、加齢が骨格筋量に与える影響について、10 週齢 (若齢、 $n = 5$) および 100 週齢 (老齢、 $n = 5$) の C57BL/6J 雄性マウスを用いて検討した。若齢および老齢マウスの両後肢より SOL および速筋型の長趾伸筋 (EDL) を摘出した。摘出した筋組織は、余分な脂肪および結合組織を切除後、秤量し、液体窒素中で凍結して -80°C で保存した。

サンプル調整

細胞培養実験の細胞サンプルは、既報の方法により調製した (Goto A et al 2013; Egawa T et al 2014)。ここでは簡単に、細胞溶解液 (CellLytic MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) に Protease/ Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) を添加し、超音波細胞破碎装置を用いて C2C12 を完全にホモジネートし、冷却遠心分離 (15,000 g、 4°C 、15 分間) 後、上清を得た。

動物実験の筋サンプルは、既報のホモジネートバッファーを用い、ガラスホモジナイザーにて筋組織を完全にホモジネートした。得られたホモジネートを冷却遠心分離 (15,000 g、 4°C 、15 分間) 後、上清を得た (Goto A et al 2013)。

上清中のタンパク濃度は、牛血清アルブミンを対照として Bradford 法 (Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, USA) に測定した (Goto A et al 2013; Egawa T et al 2014)。

C. 分析方法

1. タンパク合成の評価

Surface sensing of translation (SUnSET) は、哺乳動物細胞における総タンパク合成のモニタリングならびに定量化のための放射線を用いない方法である (Schmidt EK et al 2009)。簡単に説明すると、サンプル回収の 30 分前に、麻酔下で 100 μ l のリン酸緩衝食塩水に溶解した puromycin (0.04 μ mol/g) をマウスに腹腔内注射した。Puromycin で標識されたタンパクの発現を、以下に記載するウェスタンブロット法により分析した。

2. タンパク分解の評価

本研究では、骨格筋のタンパク分解を下記に記載するウェスタンブロット法を用いて、ユビキチン化タンパクの発現レベルにより評価した。

3. ウェスタンブロット法を用いたタンパク発現の解析

ウェスタンブロット法によるタンパク発現解析は、既報の方法により行った (Goto A et al 2013; Egawa T et al 2014)。細胞あるいは筋組織から抽出されたタンパクを、Laemmli のサンプルバッファー [30% (v/v) glycerol、5% (v/v) 2-mercaptoethanol、2.3% (w/v) sodium-dodecylsulfate、62.5 mM Tris-HCl、0.05% (w/v) bromophenol blue (BPB)、pH 6.8] にて溶解し、各サンプルのタンパク濃度が一定になるように調整した後、95 °Cで5 分間加熱処理を行った。処理後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパクの分画を行った。SDS-PAGE は、0.5%の SDS を含むアクリルアミド濃度 10% あるいは 15%のポリアクリルアミドゲルを用いて、各レーンに 10 µg のタンパクを添加し、20 mA の定電流にて 140 分間泳動した。泳動と転写のインターナルコントロールとして、各ゲルの両サイドに分子量マーカータンパク (Bio-Rad Precision Markers、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA) を添加した。

SDS-PAGE 終了後、ゲルのタンパクを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (0.2 µm、Bio-Rad) に転写 (100 V 定電圧、4°C、60 分間) した。PVDF 膜への転写後、ECL blocking reagent (RPN418、GE Healthcare) にてブロッキング処理を1 時間行った。ユビキチン標識ならびにピューロマイシン標識タンパクの発現レベルの分析のために、膜を Ponceau S 染色を行った。次いで、膜を一次抗体 [Adipo (ab22554、Abcam、Cambridge、UK)、AdipoR1 (GTX104770、GeneTex、Irvine、CA)、AdipoR2 (14361-1-AP、Proteintech、Rosemont、IL)、AMPK (2532、Cell signaling Technology)、ubiquitin (SPA-200、Enzo life sciences、NY)、puromycin (MABE343、Merck、Darmstadt、Germany)、AMPKαThr172 (2531、Cell Signaling Technology)、GAPDH (2118、Cell Signaling Technology) および β-アクチン (4967、Cell Signaling Technology)] で4°Cにて一晩反応させた。その後、膜を 0.1% Tween20 (TBS-T、pH 7.5) を含むトリス生理緩衝液で洗浄し、抗ウサギ IgG (7074、Cell Signaling Technology)、抗マウス IgG (7076、Cell signaling Technology) または抗マウス IgG2a (ab98698、abcam) を室温で1 時間反応させた。TBS-T に最終洗浄した後、化学発光試薬 (GE Healthcare) ならびに Light-Capture (AE-6971、ATTO Corporation、Tokyo、Japan) を用いてタンパクバンドを可視化し、ImageJ によりシグナルを定性評価した。

4. リアルタイム RT-PCR 分析

AdipoR1 および AdipoR2 の mRNA 発現量の解析は、既報の方法に従い、real-time reverse transcription-polymerasechain reaction (定量リアルタイム RT-PCR) により行った (Goto A et al 2013; Egawa et al 2013)。製品添付の方法に従い RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) によりトータル RNA を抽出した。抽出した RNA サンプルは、Prime Script RT

Master Mix (タカラバイオ、大津) を用いて complementary DNA (cDNA) に逆転写し、合成した cDNA は Takara SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) と混合し、Thermal Cycler Dice®Real Time System II MRQ (タカラバイオ) 装置にセットしてリアルタイム RT-PCR による解析を行った。相対的な発現量の解析は、比較 CT 法 (Takara Thermal Cycler Dice Real Time System Software Ver. 4.00 : タカラバイオ) により行った。各遺伝子の発現量は、GAPDH を内因性コントロールとして、GAPDH 発現量に対する相対値として求めた。

使用した各遺伝子のプライマー配列は、adiponectin は 5'-TTCTGTCTGTACGATTGTCAGTGG-3' (forward) および 5'-GTCATCTTCGGCATGACTGG-3' (reverse)、AdopoR1 は 5'-CTGGGCATCTCTGCCATCA-3' (forward) および 5'-CTTGACAAAGCCCTCAGCGATA-3' (reverse)、AdipoR2 は 5'-ATCAGCAGCCAGACGACTC-3' (forward) および 5'-TGACCAGTCCCAAAGACCTCTACTC-3' (reverse)、GAPDH は 5'-TGTGTCCGTCGTGTGGATCTGA-3' (forward) および 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' (reverse) とした。

5. 筋管細胞の形態解析

C2C12 筋管の直径の評価は、既報の方法により行った (Egawa T et al 2014)。ここでは簡単に述べると、顕微鏡下で 4 つの視野領域をランダムに選択し、各視野において 150 本の筋管細胞の直径を ImageJ にて測定した。筋管細胞の平均直径は、筋管細胞の長軸に沿って 3 か所の短軸の平均とした。また、筋管細胞の分化レベルを評価するために、1 本の筋管細胞当たりの筋核数をカウントした。

6. 組織化学的および免疫組織化学的解析

組織染色用に凍結した SOL および PLA の両筋組織より、クライオスタット (LEICA CM 1510S、ライカマイクロシステムズ、東京) を用いて、 -20°C にて厚さ $7\mu\text{m}$ の連続凍結筋横断切片を作成し、スライドガラスに貼付した。切片を風乾させた後、ヘマトキシリンおよびエオシン染色 (H&E 染色) を施して、筋細胞の損傷や再生の程度および筋線維横断面積 (CSA) の解析に用いた (Kojima A et al 2007; Koya T et al 2013)。

D. 統計処理

すべての測定値を平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的有意差検定は、二元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定にて解析した (Fig. 1B、2 および 3)。体重、絶対および相対的筋湿重量 (Fig 4)、筋線維 CSA (Fig 5)、puromycin およびユビキチン標識タンパク発現量 (Fig 6) および AMPK のリン酸化レベル (Fig 7) は、Student t-test を用いて有意差検定を行った。若齢マウスと老齢マウスの筋湿重量の差 (Fig 8) も、Student t-test を用いて分析した。Fig 9 および 10 のデータに関しては、二元配置分散分析後、Tukey

多重比較検定を行った。Supplemental Fig 1 および 2 のデータの解析は、一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定にて行った。実験群間の統計学的有意差は、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

E. 利益相反情報

本研究に関し、開示すべき COI 関係にある企業等はない。

III. 結果

1. C2C12 筋管に対する AdipoRon の影響

Fig 1 は、C2C12 筋管細胞に対する AdipoRon の影響を示したものである。C2C12 筋管細胞の直径および筋管細胞当たりの筋核数は、AdipoRon によって低下した (Fig 2)。しかし、AdipoR1 あるいは AdipoR2 あるいは両受容体のノックダウンは、AdipoRon による C2C12 筋管細胞のこうした変化を部分的に抑制した。

C2C12 筋管細胞におけるタンパク含有量は、AdipoRon 濃度依存的に減少した (Fig 1B、濃度の効果： $p < 0.05$)。20 μM の AdipoRon におけるタンパク含有量は、0、5 および 10 μM の AdipoRon より有意に低値を示した ($p < 0.05$ 、Fig 1B)。AdipoRon によるタンパク含有量の減少は、AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体のノックダウンによって部分的に抑制された (Fig 1B、処置の効果： $p < 0.05$)。siScramble と AdipoR1 あるいは AdipoR2 におけるタンパク質含量に有意差が認められた (AdipoR1： $p < 0.05$ 、AdipoR2： $p < 0.05$ 、AdipoR1+R2： $p < 0.05$)。

C2C12 筋管細胞の直径および筋管細胞当たりの筋核数も、AdipoRon 濃度依存的に低下した (Fig 2B および 2D、濃度の効果： $p < 0.05$)。一方、本研究では、AdipoR のノックダウンは C2C12 筋管細胞の直径および筋管細胞当たりの筋核数に影響を与えなかった (Fig 2A および 2C)。AdipoRon による C2C12 筋管細胞の直径および筋管細胞当たりの筋核数の低下は、AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体のノックダウンによって部分的に抑制された (Fig 2B および 2D、処置の効果： $p < 0.05$)。AdipoRon 濃度が 20 μM における筋管細胞直径は、siScramble と siAdipoR の間に有意差が認められた (AdipoR1： $p < 0.05$ 、AdipoR2： $p < 0.05$ 、AdipoR1+R2： $p < 0.05$)。

AMPK は、AdipoR に関連する細胞内シグナルの下流に位置し (Høeg LD et al 2013; Yamauchi T et al 2002)、骨格筋量を負に制御している (Egawa T et al 2015)。したがって本研究では、C2C12 筋管細胞における AMPK のリン酸化レベルに対する AdipoRon の効果を追究した。AMPK のリン酸化レベルは、AdipoRon によって増加する傾向を示した (Fig 3)。AMPK のリン酸化レベルの有意な増加が 20 μM の AdipoRon で観察されたが、5 μM あるいは 10 μM の AdipoRon では観察されなかつ

た。AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体のノックダウンは、C2C12 筋管細胞における AdipoRon 依存性の AMPK リン酸化レベルの増加を抑制した。

2. AdipoRon 投与がマウス骨格筋量に及ぼす影響

細胞培養実験により、高濃度の AdipoRon が筋肉量の減少を引き起こすことが示唆されたため、AdipoRon 投与がマウス骨格筋量に及ぼす影響を *in vivo* で検討した。マウスへの AdipoRon の継続的な静脈内投与は、対照群と比較して、速筋型の PLA の筋湿重量絶対値および体重あたりの相対的筋湿重量を有意に減少させた (Fig 4B および 4C : $p<0.05$)。しかし、遅筋型の SOL では AdipoRon 投与による筋重量の低下は認めなかった。なお、体重に有意な変化は認めなかった (Fig 4A)。SOL および PLA の代表的な H&E 染色像を Fig 5A に示した。PLA の筋線維 CSA は、AdipoRon 投与によって有意に低下した (Fig 5B)。しかし、SOL の筋線維 CSA は、AdipoRon 投与による影響は認めなかった。

本研究では、SUnSET 法およびユビキチン化タンパクを用いて、SOL および PLA におけるタンパク合成および分解のレベルを評価した (Fig 6A および 6B)。AdipoRon 投与によって PLA および SOL におけるタンパク合成は抑制される傾向が観察された。しかし、AdipoRon 投与による両筋のタンパク合成に統計学的に有意な影響は認めなかった。一方、両筋のユビキチン化タンパク発現量は、AdipoRon 投与によって有意に増加した ($p<0.05$, Fig 6B)。また、マウス SOL および PLA における AMPK リン酸化レベルに対する AdipoRon の効果を検討した。その結果、両筋における AMPK リン酸化レベルは、AdipoRon 投与によって有意に増加した (Fig 7)。

3. 若齢および老齢マウスの骨格筋における Adipo および AdipoR の発現量

我々は、マウス SOL および速筋型の EDL における Adipo および AdipoR の発現量が加齢の影響を受けるか検討した。両方の体重あたりの筋湿重量は、加齢によって有意に低下した (Fig 8, $p<0.05$)。若齢および老齢マウス共に、SOL における Adipo 発現量は EDL に比べて有意に高値を示した ($p<0.05$, Fig 9A)。加齢による Adipo 発現量の増加は EDL においてのみ認められ ($p<0.05$)、SOL では有意な変化は認めなかった。

Fig 9B と 9C には、若齢および老齢マウスの SOL ならびに EDL における AdipoR1 と AdipoR2 の発現量を示した。若齢マウスにおける AdipoR1 の発現量は、SOL に比べて EDL で有意に高値を示した ($p<0.05$)。一方、AdipoR2 の発現量は、SOL と EDL の間に有意差は認めなかった。加齢により AdipoR1 発現量の増加が SOL で認められたが ($p<0.05$)、EDL では認めなかった。逆に、両筋肉において、AdipoR2 の発現量は加齢により有意に低下した ($p<0.05$)。我々は、さらに AMPK のリン酸化レベルに対する加齢の影響を検討した。若齢マウスでは、SOL における AMPK のリン酸化レベルは、EDL に比べて有意に高値を示した ($p<0.05$)。AMPK のリン酸化レベルは、EDL においてのみ加齢による増加が認められた (Fig 10, $p<0.05$)。

IV. 考察

本研究では、AdipoRのアゴニストであるAdipoRonがC2C12筋管細胞のタンパク量およびマウス骨格筋の遅筋であるSOLならびに速筋であるPLAの筋肉量に及ぼす影響を検討した。AdipoRonは、AMPKリン酸化の増加を介して、C2C12筋管細胞のタンパク含有量、筋管細胞直径および筋管細胞当たりの筋核数を濃度依存性に低下させた。こうしたAdipoRonによるC2C12筋管細胞のタンパク質含量、筋管直径および筋管当たりの筋核数の低下は、AdipoR1およびAdipoR2あるいは両受容体のノックダウンにより部分的に抑制された。継続的なAdipoRonをマウスの静脈内投与により、PLAの筋湿重量を低下させたが、SOLにはAdipoRon投与の影響は認めなかった。しかし、PLAおよびSOLにおけるAMPKリン酸化レベルは、AdipoRon投与によって増加した。一方、Adipo発現量は速筋であるEDLよりも遅筋であるSOLで有意に高値を示した。さらに、EDLにおけるAdipo発現量およびAMPKリン酸化レベルは加齢により増加したが、SOLでは有意な増加は認めなかった。SOLならびにEDLにおけるAdipoR1およびAdipoR2発現量に、加齢の影響は認めなかった。

本研究では、AdipoRon投与が、C2C12筋管細胞のタンパク含有量、筋管細胞直径および筋管細胞当たりの筋核数、ならびに速筋であるPLAにおける筋湿重量および筋線維CSAを低下させた。本研究は、C2C12筋管細胞およびマウス速筋に対するAdipoRonの負の効果を示す最初の報告である。先行研究により、無血清増殖培地の飢餓状態下で、球状AdipoがC2C12筋芽細胞の筋分化を刺激することが報告されている(Fiaschi T et al 2009)。Adipoがない飢餓状態では、C2C12筋芽細胞は筋管細胞に分化しなかったとしている(Fiaschi T et al 2009)。一方、本研究では、ウマ血清2%を含む分化培地でインキュベートしたC2C12筋管細胞において、AdipoRアゴニストの効果を検討した。培養条件およびAdipoRon添加のタイミングの違いが、2つの研究の間における結果の矛盾を引き起こしたのかもしれない。

本研究において、AdipoR1およびAdipoR2あるいは両受容体のノックダウンは、AdipoRonによるC2C12筋管細胞あたりのタンパク含有量、筋管直径および筋管当たりの筋核数の低下を部分的に抑制した。一方、AMPKリン酸化レベルはAdipoR1およびAdipoR2あるいは両受容体のノックダウンにより低下した。球状Adipoは、C2C12筋芽細胞中のAMPKリン酸化レベルを増加させることも報告されている(Fiaschi T et al 2009)。リン酸化型AMPKは活性化型であり、C2C12細胞のタンパク含有量および筋分化を抑制することが報告されている(Høeg LD et al 2013)。本研究では、AdipoRon投与によりマウス骨格筋のユビキチン化タンパク発現レベルが増加した。さらに、AdipoRon投与はマウス骨格筋におけるタンパク合成に有意な影響を与えなかった。したがって、AdipoRonによる骨格筋量の減少は、AdipoR-AMPKシグナルの活性化を介したタンパク分解の増加によって誘発されるのかもしれない。

最近、高齢者における循環血液中Adipo濃度と骨格筋量あるいは身体機能との間には負の相関関係、いわゆるアディポネクチン・パラドックスの存在が報告されている

(Huang C et al 2015; Gotoda T 2016; Loncar G et al 2013)。しかし、これらの報告は疫学的横断研究によるものである。高濃度の Adipo による骨格筋萎縮、すなわち骨格筋におけるアディポネクチン・パラドックスに関する実験的証拠はこれまで報告されていない。本研究は、AdipoRon を継続的にマウスの静脈内に投与することで骨格筋萎縮を誘発するという初の実験的証明に成功した。この現象は、骨格筋における「アディポネクチン・パラドックス」を示す最初の実験的証拠であろう。肥満者の血清中 Adipo 濃度は健康な人と比較して低いため (Lecker SH et al 2004)、Adipo の高い血中レベルは、私達の健康に様々な利益をもたらす、生活習慣病に対する予防効果があると一般に考えられている (Delaigle AM et al 2004; Ouchi N et al 2011)。しかしながら、血中の Adipo 濃度が高いことで骨格筋機能を減弱化するかもしれない。

本研究では、AdipoRon による萎縮は速筋である PLA においてのみ認められ、遅筋である SOL では認めなかった。両筋におけるタンパク分解およびタンパク合成に対する AdipoRon の影響に差は認めなかった。さらに、両筋における AMPK リン酸化レベルは、AdipoRon 投与によって共に増加した。AdipoRon に対する筋タイプ依存性応答の分子メカニズムは依然として不明である。我々は、この矛盾について現在のところ明確な説明ができない。オートファジーあるいはカルパイン系など他のタンパク分解系が、AdipoRon による速筋特異的萎縮に関与しているのかもしれない。

本研究は、速筋である EDL における Adipo 発現量は遅筋の SOL よりも低いことを示した。さらに、EDL における Adipo 発現量は加齢により増加したが、SOL では加齢による有意な変化は認められなかった。一方、両筋における AdipoRs 発現量に加齢に伴う変化は認めなかった。本研究は、Adipo 発現量は筋タイプによって異なり、また速筋である EDL においてのみ Adipo は加齢により増加を示した最初の報告である。骨格筋における Adipo 発現量は、炎症により増加することが報告されている (Delaigle AM et al 2004; Ouchi N et al 2011)。加齢により遅筋ではなく速筋の骨格筋における炎症が増加する可能性も考えられる。

本研究の結果から、骨格筋細胞自身が Adipo を産生し、自己分泌および傍分泌により作用すると仮定すると (Goto A et al 2013)、骨格筋における Adipo の発現量は骨格筋量に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究では、速筋である EDL において加齢による AMPK の活性化することを示したが、遅筋である SOL では加齢の影響は認めなかった。これらの結果は、先行研究結果と一致する (Gonzalez AA et al 2004)。したがって、速筋における Adipo の加齢による増加は、サルコペニア発症の分子メカニズムを部分的に説明ができるかもしれない。しかし、この問題を解明するためには、さらなる研究が必要である。

V. 結論

AdipoRon は、AdipoR-AMPK シグナルを介して、濃度依存的に C2C12 筋管細胞のタンパク含有量、筋管直径および筋管細胞当たりの筋核数を低下させた。AdipoRon をマ

ウスに継続的に投与することにより、速筋である PLA の筋湿重量が低下した。しかし、遅筋である SOL の筋湿重量に AdipoRon 投与の影響は認めなかった。本研究の結果は、高濃度の循環血液中の Adipo は速筋の萎縮を引き起こすことを示している。加齢による骨格筋の Adipo 発現量の増加も、また加齢による骨格筋萎縮すなわちサルコペニアの発症に関与しているのかもしれない。

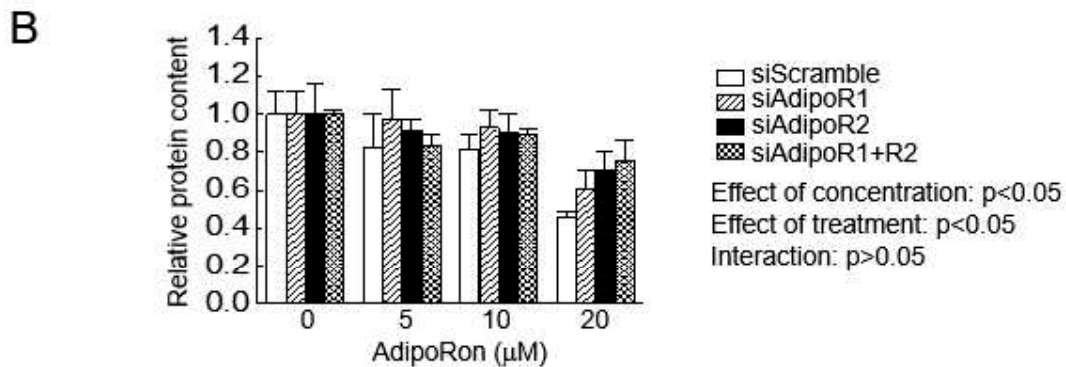
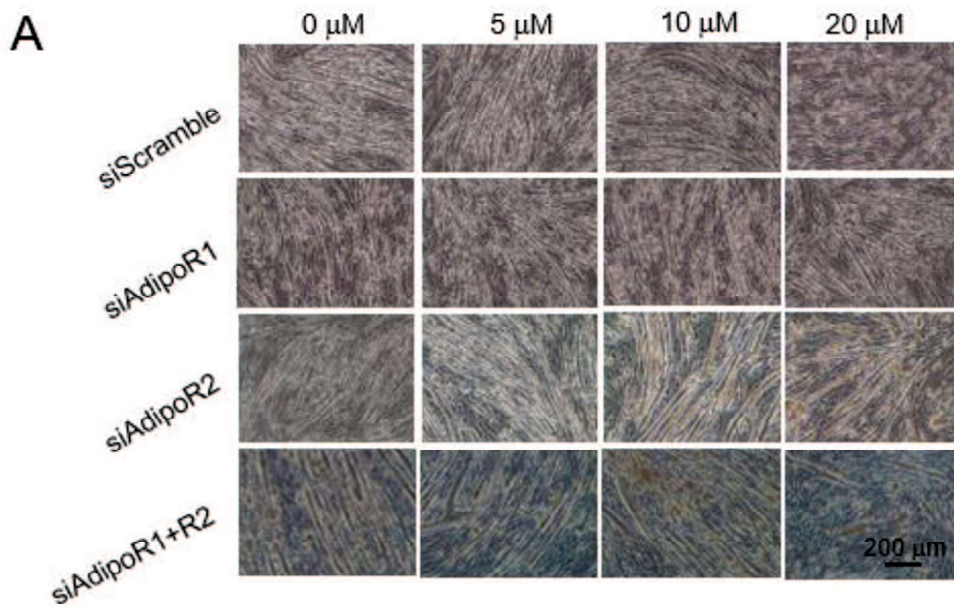


Fig 1. 異なる濃度の AdipoRon 添加ならびにアディポネクチン受容体 (AdipoR) ノックダウンが C2C12 筋管細胞に与える影響.

A: 異なる濃度の AdipoRon 添加ならびに AdipoR ノックダウンが C2C12 筋管細胞の形態に及ぼす影響を示す筋管細胞の顕微像

B: 異なる濃度の AdipoRon 添加ならびに AdipoR ノックダウンが C2C12 筋管細胞におけるタンパク含有量に及ぼす影響

分化培地中における AdipoRon の濃度は、0、5、10 および 20 μM に設定した。

siScramble: スクランブル非標的 siRNA, siAdipoR1: AdipoR1 に対する siRNA, siAdipoR2: AdipoR2 に対する siRNA、siAdipoR1+R2: AdipoR1 および AdipoR2 に対する siRNA。

Mean±SEM、n = 5 (各群 n=5)、二元配置分散分析 (濃度と処理) により有意差検定を行い、有意水準 p<0.05 とした。

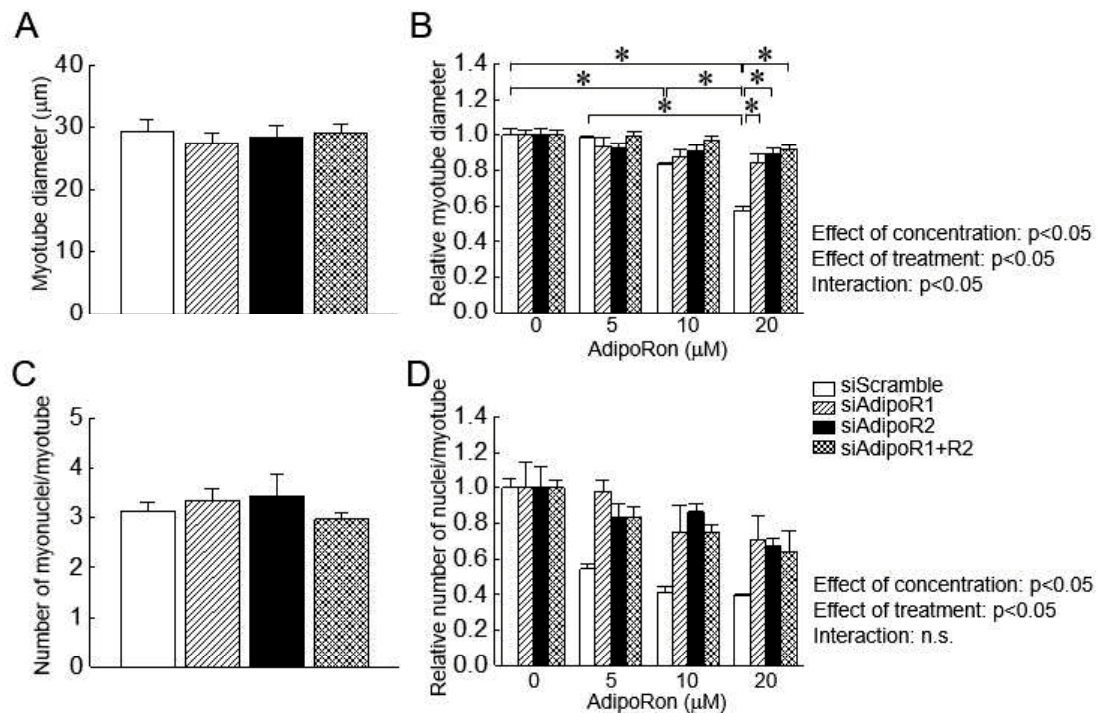


Fig 2. AdipoRon 添加およびアディポネクチン受容体 (AdipoR) ノックダウンが C2C12 筋管細胞の直径および 1 本の筋管細胞当たりの筋核数に及ぼす影響.

A: 0 μM の AdipoRon 条件下における筋管細胞直径に対する AdipoR ノックダウンの影響

B: AdipoRon 添加と AdipoR ノックダウンが筋管細胞直径に及ぼす影響

C: 0 μM の AdipoRon 条件下における 1 本の筋管細胞当たりの筋核数に対する AdipoR ノックダウンの影響

D: AdipoRon 添加と AdipoR ノックダウンが 1 本の筋管細胞当たりの筋核数に及ぼす影響

分化培地中における AdipoRon の濃度は、0、5、10 および 20 μM に設定した。

siScramble: スクランブル非標的 siRNA, siAdipoR1: AdipoR1 に対する siRNA, siAdipoR2: AdipoR2 に対する siRNA、siAdipoR1+R2: AdipoR1 および AdipoR2 に対する siRNA。

Mean±SEM、n = 5 (各群 n=5)、二元配置分散分析 (濃度と処理) 後、Tukey 多重比較検定を行い、有意水準 p<0.05 とした。

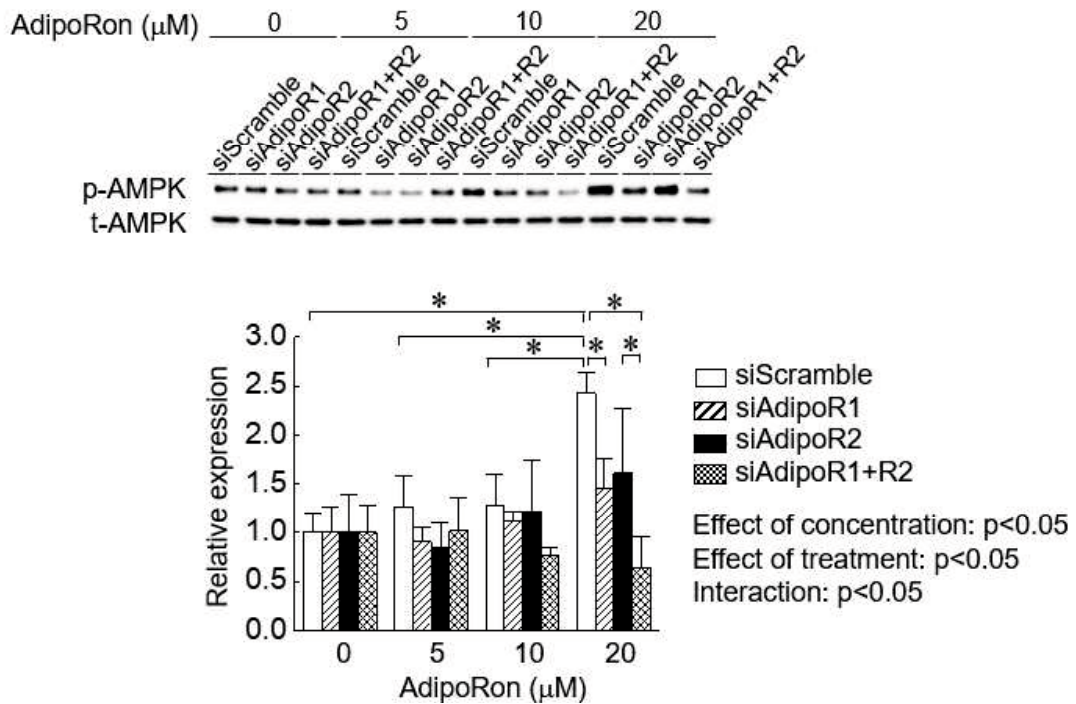


Fig 3. AdipoRon 添加およびアディポネクチン受容体 (AdipoR) ノックダウンが AMP 依存性タンパクキナーゼ (AMPK) のリン酸化レベルに及ぼす影響。

分化培地中における AdipoRon の濃度は、0、5、10 および 20 μM に設定した。

siScramble: スクランブル非標的 siRNA, siAdipoR1: AdipoR1 に対する siRNA, siAdipoR2: AdipoR2 に対する siRNA, siAdipoR1+R2: AdipoR1 および AdipoR2 に対する siRNA。

Mean±SEM, n = 5 (各群 n=5)、二元配置分散分析 (濃度と処理) 後、Tukey 多重比較検定を行い、有意水準 $p < 0.05$ とした。

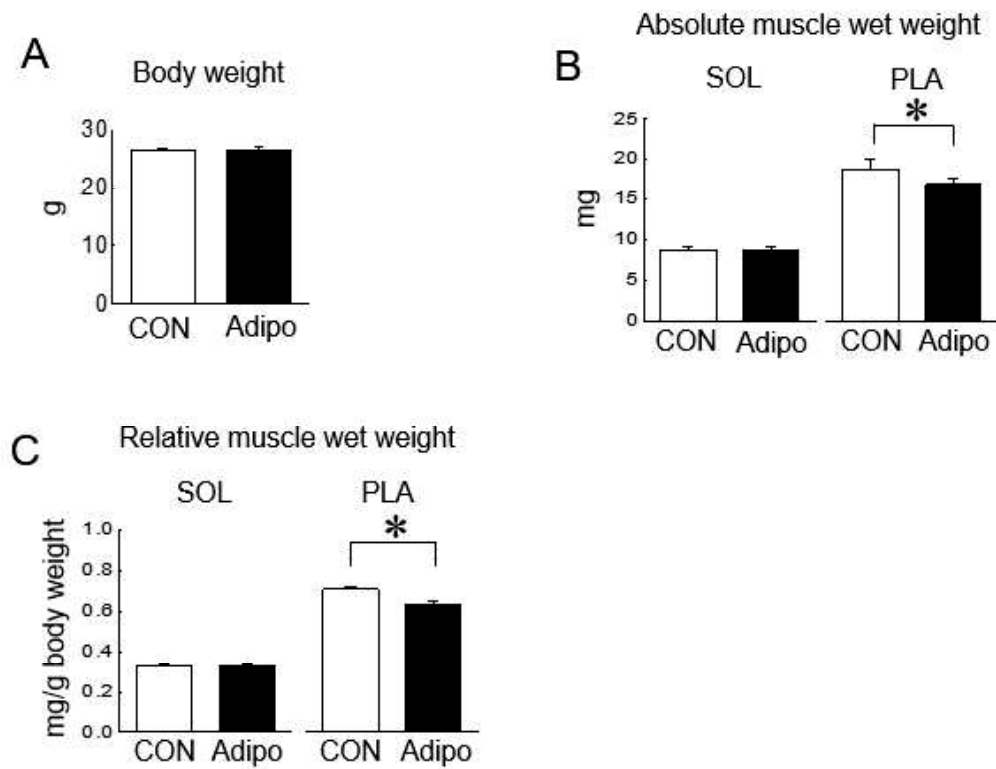


Fig 4. マウス骨格筋に対する AdipoRon 投与の影響.

A : 体重

B : ヒラメ筋 (SOL) および足底筋 (PLA) の筋湿重量

C : SOL および PLA の体重あたりの相対的筋湿重量

CON : 対照群、Adipo : AdipoRon 投与群、対照群 : n=7、AdipoRon 投与群 : n=5、Mean ± SEM、* : p<0.05.

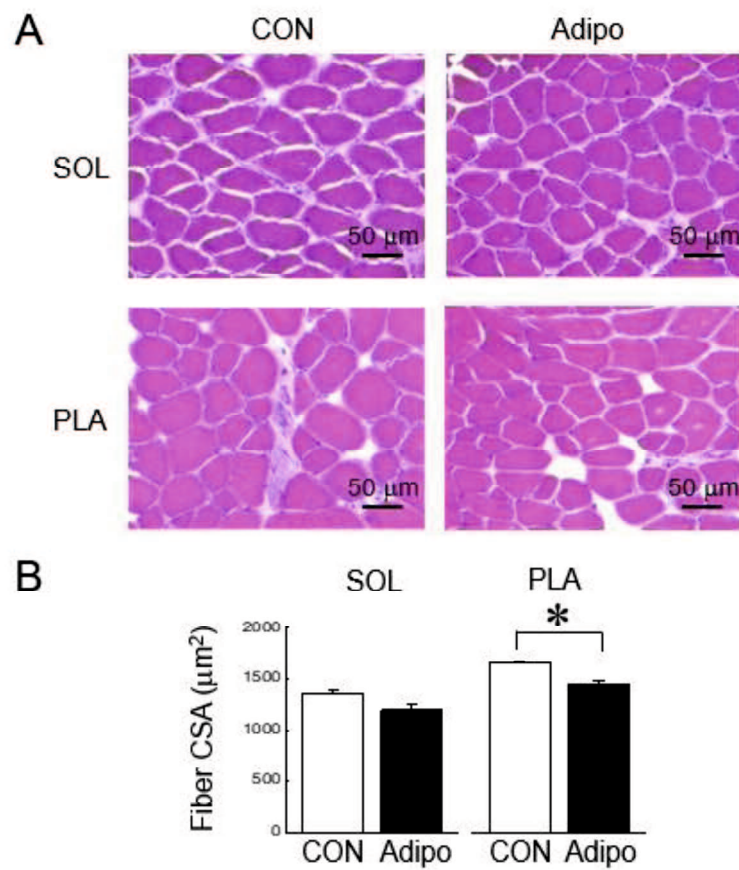


Fig 5. AdipoRon 投与がマウス筋線維横断面積（CSA）に及ぼす影響.

A：ヒラメ筋（SOL）および足底筋（PLA）の H&E 染色像

B：SOL および PLA の筋線維 CSA

CON：対照群、Adipo：AdipoRon 投与群、対照群：n=3、AdipoRon 投与群：n=3、Mean ± SEM、*：p<0.05.

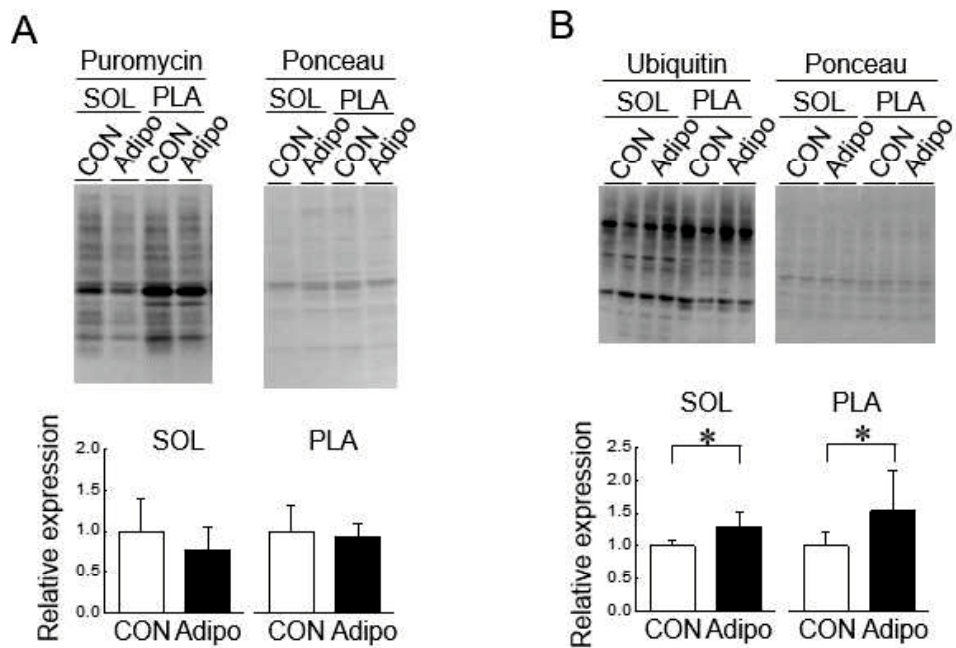


Fig 6. AdipoRon 投与がマウス骨格筋における Puromycin 標識およびユビキチン化タンパクの発現レベルに及ぼす影響.

A : Puromycin 標識タンパク

B : ユビキチン化タンパク

CON : 対照群、Adipo : AdipoRon 投与群、対照群 : n=7、AdipoRon 投与群 : n=5、Mean \pm SEM、* : p<0.05.

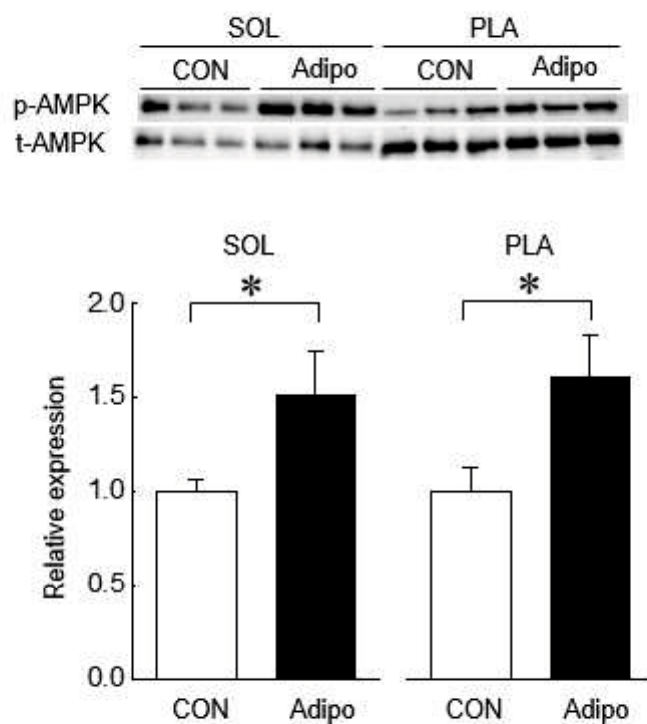


Fig 7. AdipoRon 投与がマウス骨格筋における AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) のリン酸化レベルに及ぼす影響.

SOL : ヒラメ筋、PLA : 足底筋

CON : 対照群、Adipo : AdipoRon 投与群、対照群 : n=7、AdipoRon 投与群 : n=5、Mean \pm SEM、* : p<0.05.

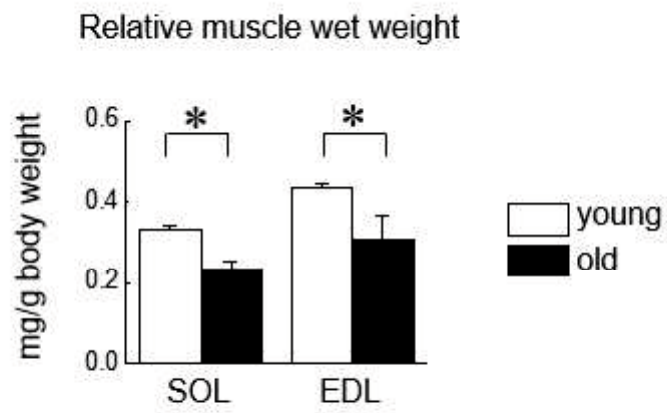


Fig 8. 若齢および老齢マウスのヒラメ筋（SOL）および長趾伸筋（EDL）の体重当たりの相対的筋湿重量.

young : 10 週齢、old : 100 週齢

各群 : n = 5、Mean ± SEM、* : p < 0.05.

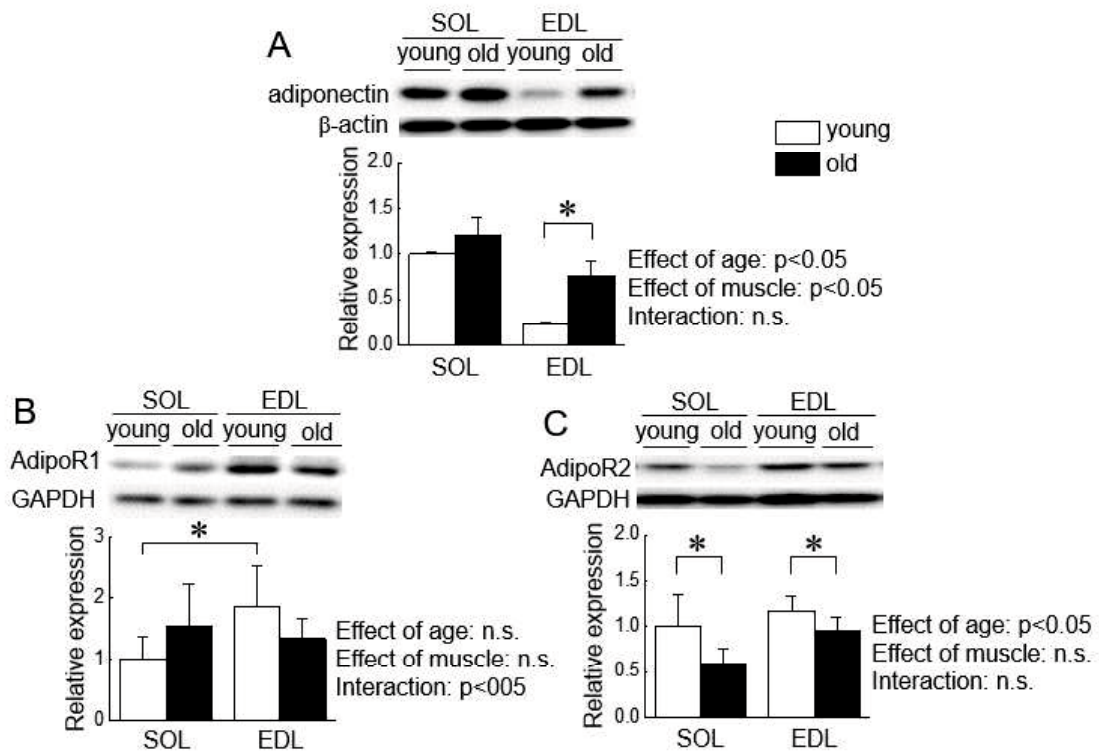


Fig 9. 若齢および老齢マウスのヒラメ筋（SOL）および長趾伸筋（EDL）におけるアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体の発現レベル。

A : アディポネクチン

B : アディポネクチン受容体 1 (AdipoR1)

C : アディポネクチン受容体 2 (AdipoR2)

young : 10 週齢、old : 100 週齢

各群 : $n = 5$ 、Mean \pm SEM、2 元配置分散分析（年齢と筋肉）後、Tukey 多重比較検定、

* : $p < 0.05$.

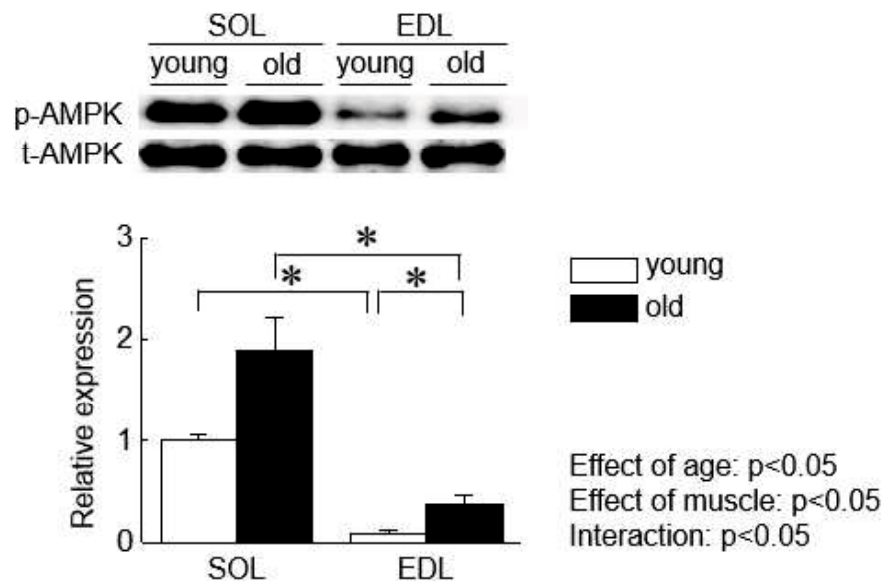


Fig 10. 若齢および老齢マウスのヒラメ筋（SOL）および長趾伸筋（EDL）筋におけるAMP依存性プロテインキナーゼ（AMPK）のリン酸化レベル。

A：アディポネクチン

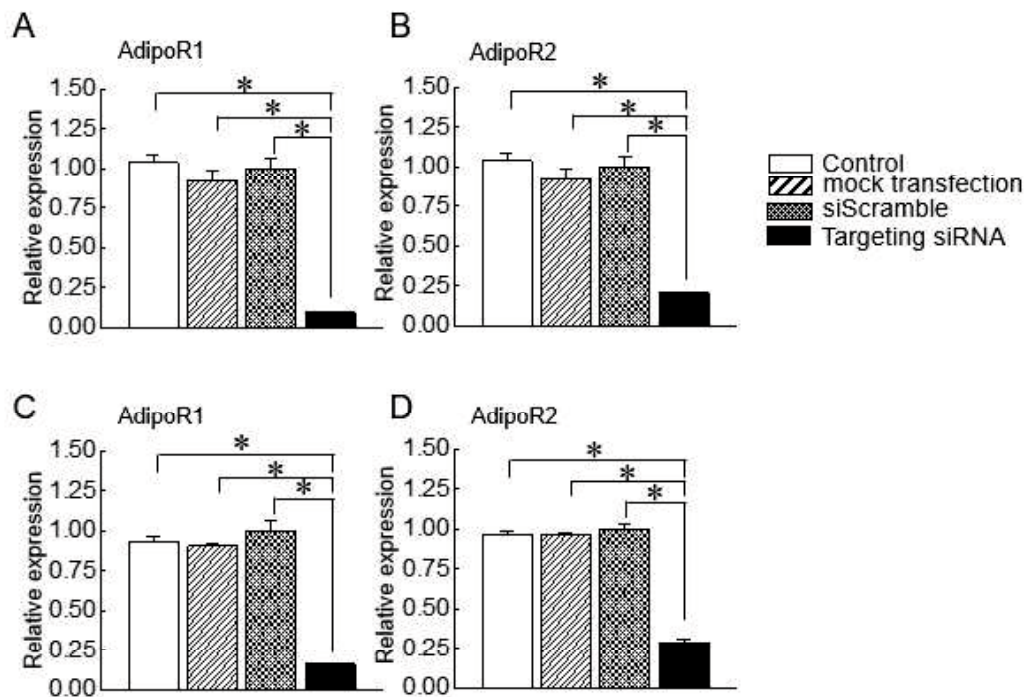
B：アディポネクチン受容体1（AdipoR1）

C：アディポネクチン受容体2（AdipoR2）

young：10週齢、old：100週齢

各群：n = 5、Mean±SEM、2元配置分散分析（年齢と筋肉）後、Tukey多重比較検定、

*： $p < 0.05$.



Supplemental Fig 1. アディポネクチン受容体 (AdipoR) に対する siRNA トランスフェクションの影響 (ノックダウン効率).

A : AdipoR1 ノックダウンが AdipoR1 mRNA 発現量に及ぼす影響

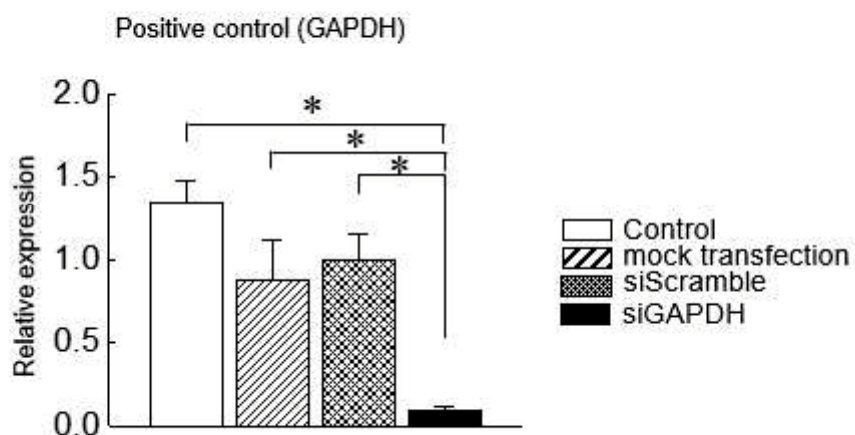
B : AdipoR2 ノックダウンの AdipoR2 mRNA 発現量に及ぼす影響

C : AdipoR1 および AdipoR2 の同時ノックダウンが AdipoR1 mRNA 発現量に及ぼす影響

D : AdipoR2 および AdipoR2 の同時ノックダウンが AdipoR2 mRNA 発現量に及ぼす影響

Control : 未処理細胞、mock-transfection : siRNA を含まないトランスフェクション試薬で処理、siScramble : スランブル非標的 siRNA、targeting siRNA : AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体に対する siRNA.

各群 : n = 5、Mean ± SEM, * : p < 0.05.



Supplemental Fig 2. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いたポジティブコントロールsiRNAのノックダウン効率.

Control : 未処理細胞、mock-transfection : siRNA を含まないトランスフェクション試薬で処理、siScramble : スクランブル非標的 siRNA、targeting siRNA : AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体に対する siRNA.

各群 : n = 5、Mean±SEM, * : p<0.05.

3章 ミオスタチンSNPがオスのサラブレッドが骨格筋特性に及ぼす影響

I. 緒言

サラブレッドは、17世紀初頭から主に走行能力を強化することを目的に繁殖されている (Bower M et al 2011; Cunningham EP et al 2001; Hill EW et al 2002)。その結果、サラブレッドの骨格筋量は全体重の 50% を超え、最大酸素摂取量は約 180 ml /分/ kg 体重であると報告されている (Jones JH et al 1993)。しかしながら、選択的交配により走行能力の向上は、ほぼ限界に達していると考えられる。分子生物学的な分析の進歩により、走行能力を決定する遺伝的要因が注目されている。

近年、ミオスタチンは、骨格筋量を制御する重要な分子として注目されている。ミオスタチンは、筋細胞の増殖および分化を抑制することによって筋肉の成長を阻害するトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) ファミリーのメンバーであり、ミオスタチン発現量の抑制により筋肉の成長を誘導することが知られている (Steelman CA et al 2006; Murphy KT et al 2010)。ウマのミオスタチン遺伝子配列の変異は、サラブレッドの至適レース距離と関連していることが報告されている (Hill EW et al 2010; Tozaki T et al 2011)。これらの先行研究 (Hill EW et al 2010; Tozaki T et al 2011; Tozaki T et al 2011) によれば、サラブレッドの遺伝的予測の候補として、ウマ 18 番染色体上に g.65809482T> C、g.65868604G> T、g.66493737C> T および g.66539967A> G の 4 つの遺伝子一塩基多型 (SNPs) が確認されている。g.66493737C> T は、ウマのミオスタチン遺伝子の第 1 イントロンに位置し、至適レース距離を決定する最有力遺伝子であると報告されている。さらに、この SNP の起源と歴史は、近年および歴史的な馬のサンプルによって遺伝学的分子および家系のアプローチの組み合わせによって明らかされた (McCroskery S et al 2003)。

筋衛星細胞の増殖能力の活性化は、骨格筋の肥大にとって重要な因子である。ミオスタチンは、出生後の筋形成において筋衛星細胞の活性化を抑制することが示されている (Bower MA et al 2012)。したがって、筋衛星細胞とミオスタチン遺伝子多型との間には非常に興味深い関連があるかもしれない。しかし、ミオスタチン遺伝子多型と骨格筋に対するトレーニング効果の関連性は明らかでない。筋肥大に加えて、骨格筋の酸化的能力は、特に発育期のサラブレッドの走行能力に大きな影響を与えることが報告されている (Yamano S et al 2005)。サラブレッドの発育初期段階におけるトレーニングの重要性が指摘されている (Smith RK et al 1999; Kasashima Y et al 2002) が、ほとんどの競走馬の定期的なトレーニングは約 1.5 歳である。そこで、サラブレッドの総走行性能を考察するために、我々は筋衛星細胞関連因子の遺伝子だけでなく、酸化的代謝関連因子の遺伝子発現の評価を行った。

本研究の目的は、成長期の競走馬におけるミオスタチン遺伝子多型 (g.66493737、T/T、C/T、および C/C 遺伝子型) と筋衛星細胞関連および酸化的代謝関連因子の mRNA 発現レベルとの間の関連を明らかにすることとした。

II. 研究方法

1. 動物およびトレーニングプロトコル

すべての実験手順は、JRA 日本中央競馬会日高育成牧場の動物福祉倫理委員会によって承認され、米国生理学会の動物ケアガイドラインに従って実施した。

本研究では、訓練を受けていない 27 頭のサラブレッド（雄性、1.5 歳）を用いた。PCR 法を用いた SNP 分析により、27 頭のサラブレッドを T/T、T/C および C/C の遺伝子型を持つ 3つの SNP グループに分けた（各グループ n=9）。

これらのサラブレッドは、3 m x 3.5 m の厩舎で個別に飼育した。サラブレッドは運動開始の 10 月まで、1 日約 6 時間、1~2 haの牧草地に放牧し、1 日2 回（約 4kg/日）の濃縮飼料ペレット（JRA オリジナル飼料 10、NOSAN 社、神奈川）を与え、水とティモシー乾草は自由摂取とした。5ヶ月間のトレーニング期間中は、乾草（約 2 kg/日）、オート麦（約2 kg/日）、完全な産業用飼料（約 5 kg/日）を 1 日に 4 回与え、水とティモシー乾草は自由に摂取させた。

トレーニングプログラムは、若い馬の伝統的なトレーニングスケジュールである、1 週間に 2 回の高強度訓練活動と 3 回または 4 回の低強度活動とした。1 月の終わりまで、ウォーキングマシンでウォームアップした後、馬は1週間に 2 回、かけあしで平坦トラックコース 1600 m、そして最後の 500 m を中速度 9.0 m/秒で、ギャロップで斜面コース（最大傾斜 5.5°）1000 m を平均速度 10 m/秒で週に 2 回実施した。他の 2 日間で、馬は 7.7 ~ 9.0m/秒で 2400 m の平坦コースをかけあしでトレーニングした。2 月から3 月の間に、運動強度を徐々に増加させた。1 週間に 2 度、馬は 800 m をはやあしでウォームアップし、次いで平均速度 10.0~12.5 m/秒で、傾斜コース 1000 m のギャロップ2回行った。他の 4 日間は、馬はかけあしで 2400 m の平坦トラックコースを 7.7~9.0 m/秒の速度で行った。トレーニング実施日は、馬は約 2400 m 歩くことでクールダウンを実施した。トレーニングセッション以外で、1日約 4 時間、パドックに馬 1 頭ずつ放牧した。

2. 筋のサンプリング

筋サンプル（約20 mg）は、トレーニング開始前および 5 か月間の通常トレーニング期間終了後に、リドカイン（藤沢薬品、大阪、日本）による局所麻酔下にて、中殿筋の中央部領域（2 回目のサンプリングは 1 回目のサンプリングポイントから同心円状に 2cm 離れた部位）で皮膚表面から 5 cmの深さの部位から、18 G で 9 cm のニードルバイオプシー（SuperCore Biopsy Instrument、Argon Medical、Device Japn、東京、日本）を用いて採取した。先行研究（Kasashima Y et al 2002）で我々は、疲労困憊運動後 14 日間の間隔があれば、すべての mRNA 発現が安静レベルに回復するのに十分であることを確認している。全ての筋サンプルは液体窒素で凍結し、分析するまで -80°C で保存した。

3. 免疫組織化学分析

筋線維タイプは、既報の方法により同定した (Yamano S et al 2005)。 -20°C に設定したクライオスタット (Leica CM510、Nussloch、Germany) を用いて、筋サンプルから厚さ $7\ \mu\text{m}$ の凍結連続切片を作成した。切片を室温 (RT) にまで温め、次いで室温にて $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液 (PBS、 $\text{pH}\ 7.6$) で調整した 1% 正常ヤギ血清 (Millipore-Chemicon、Billerica、MA、USA) で 10 分間インキュベーションした。その後、(1) ミオシン重鎖 (MHC) -IIa および IIx に特異的に反応する速筋型ミオシン (SIGMA、St. Louis、USA; $1:4000$)、(2) MHC-IIa に特異的に反応する SC-71 (Developmental Studies Hybridoma Bank、Iowa、USA; $1:1000$) の各モノクローナル一次抗体を室温で一晩インキュベートし、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP、Bio-Rad、Hercules、CA、USA; $1:1000$) が標識された二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG) で室温にて 3 時間インキュベートした。その後、HRP を局在化するための色素原として DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride : Bio-Rad) を用いた。染色された筋線維像は、顕微鏡写真撮影装置 (E600、ニコン、東京) 画像処理システム (DS-U1、ニコン) を用いて記録した。筋線維は、免疫組織化学的染色特性に基づいて、タイプ I、IIa あるいは IIx に分類し、各筋線維タイプの構成比率 (%) および筋線維断面積 (CSA) を少なくとも 50 本の筋線維から算出した。

4. RNA 抽出および リアルタイム RT-PCR

TRIzol 試薬 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を用いて、各筋サンプルから全 RNA を抽出した。TURBO DNase (Ambion、Austin、TX、USA) および ExscriptTM RT 試薬キット (Takara、東京) を用いて cDNA を合成した。既報 (Kawai M et al 2013) に記載されている方法により、リアルタイム RT-PCR システム (Applied Biosystems Japan、東京) を用いて mRNA 発現の相対的定量解析を行った。標的遺伝子の相対的発現量は、トレーニング前の 1 頭の A/A 型の値の相対値と示し、内在性のコントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を使用した。

本研究で使用したプライマーの配列は表1に示した。各 PCR プライマーは、Primer Express[®] ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて設計し、オリゴヌクレオチドは FASMAC (神奈川) から購入した。

5. 統計処理

すべてのデータは、 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ として示した。トレーニング前後の比較および SNP 群の間の比較は、二元配置分散分析 (ANOVA) 後に Bonferroni 補正 t-test を適応した。すべてのケースで、統計学的有意性は $p < 0.05$ とした。

III. 結果

1. 体重

トレーニング期間前の T/T 型、C/T 型、C/C 型の平均体重は、 444 ± 8.4 kg、 438 ± 6.8 kg、 470 ± 6.5 kg、トレーニング後は 467 ± 7.8 kg、 452 ± 6.2 kg および 486 ± 7.4 kg であった (Table 2)。トレーニング期間中の体重増加率は、T/T 型で 5.0%、C/T 型で 3.2%、C/C 型で 3.5% であった。トレーニング期間後に、全ての遺伝子型において有意な体重の増加が認められた。C/C 型の体重は他の2つの遺伝子型よりも重かったが、遺伝子型間に有意差は認められなかった。

2. 筋線維の組織化学的性質

本研究では、筋線維を免疫組織化学的方法によりタイプ I、IIa および IIx に分類し、各線維の構成比率 (%) と CSA (μm^2) を求めた (Table 2)。

遺伝子型間に線維タイプ構成比率に有意差は検出されなかった。一方、トレーニング前と比較して、トレーニング後にタイプ IIx 線維の構成比率がすべての遺伝子型で減少する傾向を示し、T/T 型においてのみ有意な減少が認められた。

トレーニング前後共に、筋線維 CSA に遺伝子型による差は認めなかった。トレーニング前に比べて、タイプ IIx 線維の CSA はトレーニング後にすべての遺伝子型で増加する傾向を示し、C/C 型においてのみ有意な増加が認められた。

3. mRNA発現

1) 筋衛星細胞関連分子

ミオスタチン、Pax7 (paired box transcription factor-7)、MyoD (myogenic determination factor)、myogenin および HGF (hepatocyte growth factor) の mRNA 発現を Fig 1a~e に示した。ミオスタチン mRNA 発現は、トレーニング後の全ての遺伝子型で減少し、C/C 型において有意な減少が認められた。筋衛星細胞のマーカーである Pax7 発現量は、すべての遺伝子型においてトレーニング後に有意に増加した。トレーニング後、T/T 型においてのみ筋衛星細胞の増殖および分化マーカーである MyoD と myogenin mRNA が有意に増加し、T/T 型と C/T 型の間で myogenin mRNA 発現量に有意差が認められた。筋衛星細胞の活性化因子である HGF mRNA 発現量は、すべての遺伝子型で増加傾向が認められ、C/T 型においてのみ有意に増加した。

2) 酸化的代謝関連分子

SDHa (succinate dehydrogenase subunit a)、PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator-1a) および VEGFa (vascular endothelial growth factor-A) mRNA 発現をそれぞれ Fig 2a~c に示した。ミトコンドリアのマーカーである SDHa mRNA 発現量は、トレーニング後にすべての遺伝子型で有意に増加し、トレーニング後において C/C 型に比べて T/T 型の SDHa 発現量は有意に高値を示した。PGC1 α mRNA 発

現量は、トレーニング後のすべての遺伝子型において増加し、C/C 型においてのみ有意な増加が認められた。血管新生マーカーである VEGFa mRNA 発現量は、すべての遺伝子型でトレーニングによる変化は認められなかった。トレーニング後において、T/T 型の VEGFa mRNA 発現量は C/C 型に比べて有意に高値を示した。

3) ミオシン重鎖 (MHC)

MHC I および II mRNA 発現をそれぞれ Fig 3a および 3b に示した。どちらの MHC 発現量においても、すべての遺伝子型の間には有意差は認められなかった。C/C 型における MHC I 発現量は、トレーニング後に有意に減少した。一方、MHC II 発現量は、トレーニング後に T/T 型で有意な増加が認められた。

IV. 考察

本研究は、成長期の競走馬のトレーニング効果に対してミオスタチン SNP が影響するか否かについて検討した。組織化学的分析により、トレーニング前における筋線維タイプ構成比率や筋線維 CSA においてミオスタチン SNP の影響は認めなかった。しかし、T/T 型における IIx 筋線維構成比率はトレーニングより有意に減少した。さらに、トレーニングにより C/C 型のミオスタチン mRNA 発現レベルは有意に低下し、タイプ IIx 筋線維 CSA は有意に肥大した。さらに、すべての遺伝子型の中で最も顕著な差は、トレーニング後における T/T 型のミトコンドリア生合成に関与する分子 (SDHa および PGC1 α) の mRNA 発現レベルの増加であった。

1) ミオスタチン SNP と骨格筋の成長

ミオスタチン遺伝子の変異は、牛 (Grobet L et al 1997; McPherron AC et al 1997)、犬 (Mosher DS et al 2007)、マウス (McPherron AC et al 1997)、羊 (Clop A et al 2006) そしてヒト (Schuelke M et al 2004) などの哺乳類で高度に保存されており、筋肥大の表現型と関連している。ミオスタチン遺伝子の変異が生涯賞金や生涯ランクそして至適レース距離に影響するからであるので、ミオスタチン遺伝子の変異は特にサラブレッドにおいて興味深い (Tozaki T et al 2011; Tozaki T et al 2010)。

筋線維を免疫組織化学染色により I、IIa および IIx に分類 (Yamano S et al 2005) し、SNP との関連性 (g.66493737C>T) を検討した。タイプ I 線維は、ゆっくりと収縮し、高い酸素供給能力があり持久性に優れる。タイプ IIx 線維の収縮速度は高く、パワーを発揮するのに適している。タイプ IIa 線維の特徴はこれらの線維の中間タイプである。したがって、CC 型でタイプ IIx 線維構成比率は高いか、タイプ IIx 線維が肥大していることが先行研究 (Petersen JL et al 2013) から予想されるが、トレーニング前における組織化学的特徴にミオスタチン SNP による差は認められなかった。mRNA 発現レベルの解析により、SNP 群間においてミオスタチンを含む分子の発現量に有意差は認められなかった。これらの結果は、ミオスタチン SNP は、出生後 1.5年

の期間では筋線維レベルでは差をもたらさなかったことを示唆し、この知見は先行研究と一致したものであった。

多くの先行研究は、タイプ I 線維構成比率は変化しないが、従来のトレーニングによりタイプ IIa 線維構成は有意に増加し、タイプ IIx 線維構成比率は有意に減少すること報告している (Yamano S et al 2005; Rivero JL et al 2016)。本研究では、トレーニング後において3つの遺伝子型の体重増加はほぼ同等であったが、筋線維型を分析したところ、C/C 型のタイプ IIx 線維においてのみ有意な増加が認められた。この結果は、解糖優位な筋線維に対するトレーニング効果が C/C 型において高く、C/C 型の馬は近距離の競走馬の素質を持つことを示唆している (Hill EW et al 2010; Tozaki T et al 2010)。一般に、ミオスタチン mRNA 発現量の減少は、組織的変化の要因としてトレーニング後に認められる (Roth SM et al 2003; Hulmi JJ et al 2007)。C/C 型においてのみ認められたミオスタチン mRNA 発現レベルの有意な減少は、C/C 型におけるタイプ IIx 線維の肥大という結果と一致する。選択的なタイプ IIx 線維の肥大は、C/C 型が最大速度に速く達する理由と T/T 型の速度が他の遺伝子型と比較して高い理由の要因と解釈できる (Hill EW et al 2012)。ミオスタチン SNP が筋線維表現型の発現とどのように関連しているかを説明することは困難であるが、先行研究で示されているように、我々はミオスタチン遺伝子の第1イントロンの SNP が転写促進因子の結合部位であると考えている (Seo S et al 2013; Millar DS et al 2010)。

筋衛星細胞の活性化は、骨格筋肥大において重要な役割を果たしている。我々は、筋衛星細胞活性化因子 HGF (Tatsumi R et al 2002)、骨格筋における筋衛星細胞のプール形成に必要な静止期にある筋衛星細胞の Pax7 (Reimann J et al 2004)、筋衛星細胞の増殖/分化マーカーである MyoD および myogenin (Yablonka-Reuveni Z et al 1999; Schultz E et al 2006; Wright WE et al 1989) の発現量を検討した。予想外にも、筋衛星細胞の活性化および増殖/分化関連因子は、C/C 型に比べて T/T 型において有意に増加した。近年、筋衛星細胞は毛細血管の新生に参与する可溶性毛細血管成長因子を分泌することが報告されている (Rhoads RP et al 2013; Christov C et al 2007)。実際、C/C 型と比較して T/T 型では VEGF 発現レベルが有意に上昇してことから、T/T 型の筋衛星細胞の活性が筋肥大ではなく毛細血管新生に参与することが示唆された。

2) ミオスタチン SNP および酸化的代謝能力

トレーニング前の mRNA 発現レベルの解析により、SNP 群間においてミトコンドリアおよび血管新生に関連する SDHa、PGC-1 α または VEGFa の mRNA 発現レベルに有意差は認められなかった。対照的に、トレーニング後では、これらの発現レベルはすべてトレーニング前のレベルより増加し、SDHa および PGC-1 α mRNA の増加は T/T 型で有意であった。その結果、T/T 型における SDHa および VEGFa の mRNA 発現レベルは C/C 型に比べて有意に高値を示した。これらの結果より、血管新生が T/T 型においてより強く促進され、酸素供給能力を増大させ、細胞におけるミトコン

ドリアの生合成を促進し、その結果として ATP 産生を増加させることが示唆される。さらに、これは T/T 型においてタイプ I 線維の占有面積が大きいという組織化学的特徴をもたらしたのかもしれない。

トレーニング後における全ての酸化的代謝関連因子の発現レベルは、T/T 型で最も高く、次いで C/T 型、そして C/C 型で最も低かった。この順序は、T/T 型において優れた酸素供給能力を有するタイプ I 線維の構成比率が高いという組織化学分析結果と一致する。さらに、トレーニングによるミトコンドリア容量を反映する SDHa とミトコンドリア生合成を促す PGC-1 α の増加が、すべての遺伝子型で確認された。T/T 型における高い酸素供給および利用能力は、血管形成およびミトコンドリア生合成が強く促進されたことによるのかもしれない。また、組織化学的分析により、すべての遺伝子型において、タイプ I 線維構成比率はトレーニングによって増加し、筋線維は持久的運動に適した性質になった。このことは、実施されたトレーニングは全ての遺伝子型における持久的能力を改善するのに有効であることを示唆する。これらの知見は、持久性に優れたエジプトのアラビア馬で C/C 型が非常にまれである理由を説明するかもしれない (Hill EW et al 2010)。

先行研究 (Steelman CA et al 2006; Ploquin C et al 2012) により、特定のシグナル伝達遮断によって引き起こされるミオスタチンシグナルの欠損に近い状態では、酸化的代謝の低下を誘発するが、ミオスタチンシグナルの適度な減少は酸化的代謝を高めることが報告されている (Murphy KT et al 2010)。これらの結果は、エネルギー代謝の調節におけるミオスタチンの直接的または間接的で複雑な役割を支持する。本研究では、ミオスタチン SNP が酸化的代謝関連因子の遺伝子発現とどのように関連しているかを明らかにすることができなかった。先行研究 (Schuelke M et al 2004) では、ミオスタチン遺伝子領域の第1イントロンにおけるポイントミューテーションの存在およびその後のミオスタチン転移がスプライシングの異常に起因することが、出生直後から著しい骨格筋肥大を呈するヒトにおいて同定されている。サラブレッドのミオスタチン SNP も第1イントロンに存在するので、筋肥大に影響を及ぼすだけでなく、酸化的代謝関連因子の遺伝子発現に直接的または間接的に影響する同様の機構が存在するかもしれない。したがって、他の遺伝子の発現および筋機能への影響に関するミオスタチン SNP のメカニズムの多面的な研究が期待される。

Table 1. Real-time reverse transcriptional (RT)-PCR primer sequences.

	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	CAAGGCTGTGGGCAAGGT	GGAAGGCCATGCCAGTGA
Myostatin	TGACAGCAGTGATGGCTCTT	TGGGTTTTTCCTTCCACTTG
Pax7	CATCGGCGGCAGCAA	TCCTCGATCTTTTTCTCCACATC
MyoD	ACGGCTCTCTGCAACTTTG	GAGTCGAAACACGGGTCATCA
myogenin	TCACGGCTGACCCTACAGATG	GGTGATGCTGTCCACAATGG
SDHa	AGGTTTGCTGATGGCAGTATAAGA	TGCATCGACTTCTGCATGCT
VEGFa	CCCACTGCGGAGTTCAACAT	TGGCTTTGGTGAGGTTTGAT
PGC1 α	TCCGTGTCACCACCCAAAT	TGAACGAGAGCGCATCCTT
HGF	GGTACGCTACGAAGTCTGTGACA	CCCATTGCAGGTCATGCAT
MHC1	GGAATGACAACCTCTCTCGCTTT	TCAATATCAGCAGAAGCCAGTTTC
MHC2	CCCATGAACCCTCCCAAATA	GCAGGCTCATGCAGGTGAGT

GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, Pax7: paired box transcription factor-7, MyoD: myogenic determination factor, SDHa: succinate dehydrogenase subunit a, VEGFa: vascular endothelial growth factor-A, PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator-1a, HGF: hepatocyte growth factor, MHC: Myosin heavy chain.

Table 2. Body weight and muscle fiber properties (population and area) before and after training of Thoroughbred horses in each genotype (g.66493737C/T: T/T, C/T and C/C genotypes).

	Before training			After training		
	T/T	C/T	C/C	T/T	C/T	C/C
Body weight (kg)	444 ± 8.4	438 ± 6.8	470 ± 6.5	467 ± 7.8*	452 ± 6.2*	486 ± 7.4*
Population (%)						
Type I	11.1 ± 1.9	13.7 ± 2.8	7.5 ± 1.9	15.7 ± 11.1	13.8 ± 9.1	9.4 ± 6.5
Type IIa	40.4 ± 4.5	41.5 ± 3.5	40.8 ± 2.6	48.7 ± 5.9	45.8 ± 6.4	45.5 ± 7.8
Type IIx	48.5 ± 5.2	44.8 ± 2.6	51.7 ± 2.5	35.6 ± 12.7 *	40.4 ± 10.7	45.1 ± 9.4
Area (μm ²)						
Type I	2230 ± 186	1749 ± 64	2487 ± 300	2577 ± 291	2445 ± 299	2626 ± 284
Type IIa	2543 ± 179	2522 ± 174	2202 ± 158	2753 ± 129	2838 ± 218	2816 ± 331
Type IIx	3939 ± 299	3538 ± 298	3832 ± 332	4233 ± 450	3898 ± 378	4647 ± 325 *

Mean±SEM、各群：n = 9.

*：同じ遺伝子型におけるトレーニング前後での有意差あり (p<0.05) .

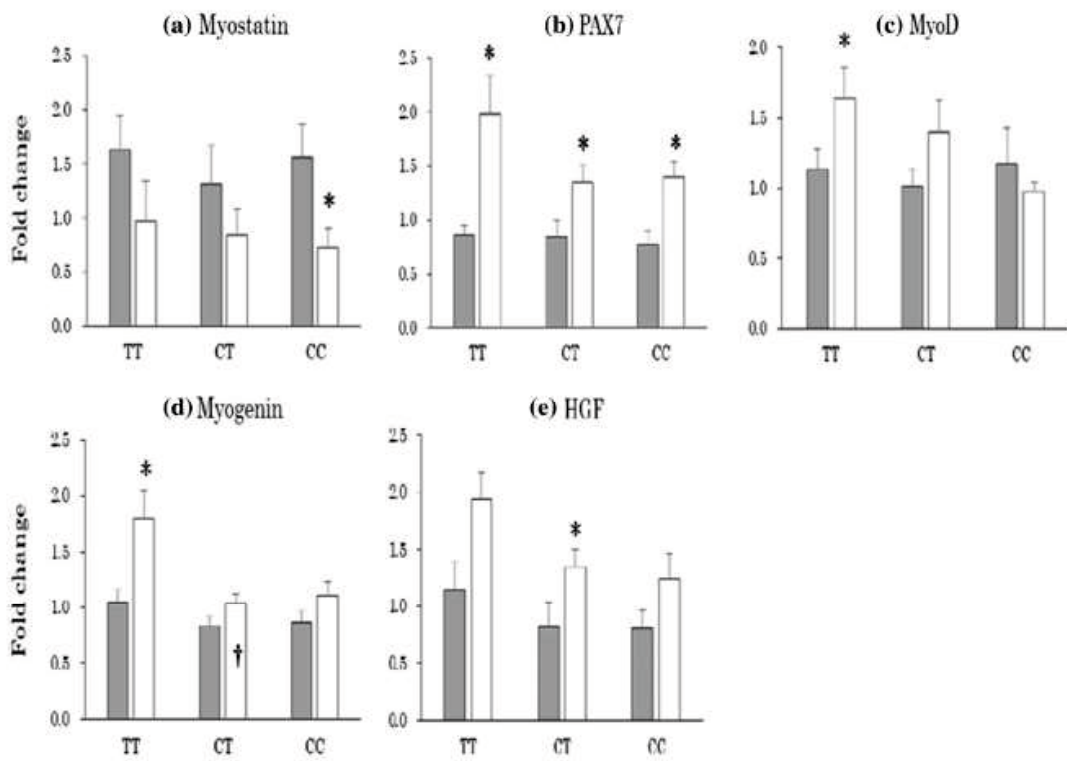


Fig 1. トレーニング前（灰色）後（白）における各遺伝子型サラブレッド骨格筋のミオスタチン (a)、Pax7 (b)、MyoD (c)、myogenin (d) および HGF (e) mRNA の相対的発現量.

各遺伝子において、1頭の T/T 型の馬の発現量をベースライン (1) として表示.

Mean ± SEM、各群：n=9.

*：同じ遺伝子型におけるトレーニング前後の有意差あり (p<0.05)

†: T/T 型の各値と比較して有意差あり (p<0.05)

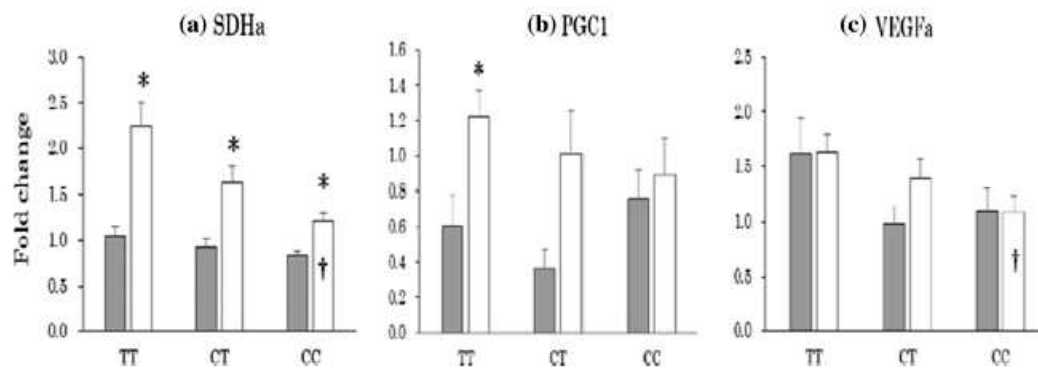


Fig. 2. トレーニング前（灰色）後（白）における各遺伝子型サラブレッド骨格筋の SDHa (a)、PGC-1 α (b) および VEGFa (c) 相対的発現量.

各遺伝子において、1頭の T/T 型の馬の発現量をベースライン (1) として表示.

Mean \pm SEM、各群 : n=9.

*: 同じ遺伝子型におけるトレーニング前後の有意差あり (p<0.05)

†: T/T 型の各値と比較して有意差あり (p<0.05)

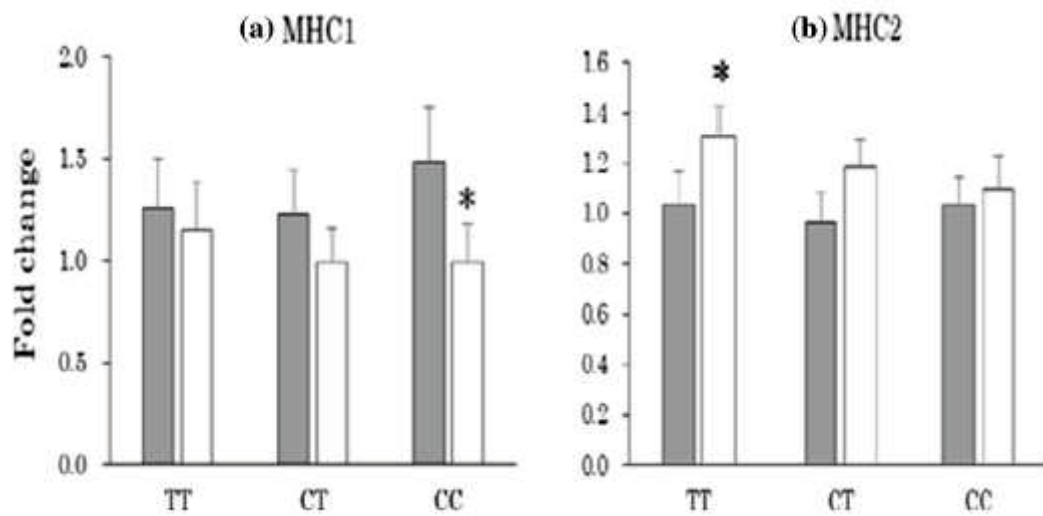


Fig 3. トレーニング前（灰色）後（白）における各遺伝子型サラブレッド骨格筋のミオシン重鎖1 (a) およびミオシン重鎖2 (b) mRNA の相対的発現量.

MHC1 : ミオシン重鎖1、MHC2 : ミオシン重鎖2.

各遺伝子において、1頭のT/T型の馬の発現量をベースライン(1)として表示.

Mean ± SEM、各群 : n=9.

*: 同じ遺伝子型におけるトレーニング前後の有意差あり (p<0.05)

4章 まとめ

運動機能の低下は健康寿命の延伸に対して負に作用することから、運動器機能、特にその中心的な役割を担う骨格筋機能の維持は重要である。また、骨格筋は力発揮だけでなく、代謝や内分泌さらには血液量の維持など様々な機能を持つ。そこで本研究では骨格筋量の維持と増加に着目した。

骨格筋量は、タンパク合成と分解の動的バランスによって決定されている。その結果として、相対的に筋タンパク量が増えれば筋肥大し、逆に、タンパク分解が合成に比べて増加することで骨格筋は萎縮する。骨格筋の肥大と萎縮について、それらの現象は明らかであるものの、筋肥大ならびに筋萎縮の分子機構の全貌は未解明である。このことが、不活動や加齢に伴う骨格筋萎縮の有効な予防策の確立に至っていない最大の要因である。本研究では、アディポネクチンとミオスタチンに着目して、骨格筋量を調節する仕組みに関して、次のような2つの仮説を立て、それぞれ検証するために実験を実施した。サイトカインおよび遺伝子の発現によりその機能を検討した。

- 1) 仮説1：「高濃度アディポネクチンは骨格筋を萎縮させる」
- 2) 仮説2：「ミオスタチン SNP は骨格筋トレーニング効果を変調させる」

1) では、高濃度のアディポネクチン (Adipo) が骨格筋萎縮を引き起こすか否かを明らかにするために、アディポネクチン受容体 (AdipoR) のアゴニストである AdipoRon 投与が培養骨格筋細胞およびマウス骨格筋量に及ぼす影響を検討した。また、マウス骨格筋における Adipo および AdipoR の発現量に対する加齢の影響もあわせて検討した。その結果、AdipoRon は、AMPK リン酸化の増加を介して、C2C12 筋管細胞のタンパク含有量、筋管細胞直径および筋管細胞当たりの筋核数を濃度依存性に低下させた。こうした AdipoRon によるC2C12筋管細胞のタンパク質含量、筋管直径および筋管当たりの筋核数の低下は、AdipoR1 および AdipoR2あるいは両受容体のノックダウンにより部分的に抑制された。継続的な AdipoRon をマウスの静脈内投与により、速筋型の足底筋 (PLA) の筋湿重量を低下させたが、遅筋型のヒラメ筋 (SOL) にはAdipoRon投与の影響は認めなかった。しかし、PLA および SOL における AMPK リン酸化レベルは、AdipoRon 投与によって増加した。一方、Adipo 発現量は速筋型の長趾伸筋 (EDL) よりもSOLで有意に高値を示した。さらに、EDL における Adipo 発現量および AMPK リン酸化レベルは加齢により増加したが、SOL では有意な増加は認めなかった。SOL ならびに EDL における AdipoR1 および AdipoR2 発現量に、加齢の影響は認めなかった。以上の結果より、高濃度の循環血液中の Adipo は速筋の萎縮を引き起こすことが示唆された。加齢による骨格筋の Adipo 発現量の増加も、また加齢による骨格筋萎縮すなわちサルコペニアの発症に関与しているのかもしれない。

2) では、発育期の競走馬のトレーニング効果に対してミオスタチン一塩基多型 (SNP) が影響するか否かについて、成長期の競走馬におけるミオスタチン遺伝子多型 (g.66493737, T/T、C/T、および C/C 遺伝子型) と筋衛星細胞関連および酸化的代謝関連因子の mRNA 発現レベルとの間の関連を検討した。組織化学的分析により、トレーニング前における筋線維タイプ構成比率や筋線維横断面積においてミオスタチン SNP の影響は認めなかった。しかし、T/T 型における IIx 筋線維構成比率はトレーニングより有意に減少した。さらに、トレーニングにより C/C 型のミオスタチン mRNA 発現レベルは有意に低下し、タイプ IIx 筋線維横断面積は有意に肥大した。さらに、すべての遺伝子型の中で最も顕著な差は、トレーニング後における T/T 型のミトコンドリア生合成に関与する分子 (SDHa および PGC1 α) の mRNA 発現レベルの増加であった。以上の結果より、ミオスタチン発現量ならびミオスタチン SNP は、サラブレッド骨格筋のトレーニングに対する収縮および代謝的適応変化に影響を与えることが示唆された。

これらの結果から、高濃度の循環血液中の Adipo および骨格筋 Adipo 発現量の増加が加齢による骨格筋萎縮すなわちサルコペニアの発症に関与していることが示唆された。また、ミオスタチン SNP はトレーニングに対する骨格筋の収縮および代謝的適応変化に影響を与えることが示唆された。しかし、本研究により明らかになったメカニズムは骨格筋量の制御機構の全貌の一部であり、今後、健康寿命の延伸に寄与する骨格筋量の維持・向上のためにはさらなる検討が必要であることは言うまでもない。

謝辞

本研究を推進するにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

研究活動にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました山口大学大学院創成科学研究科宮田浩文教授、豊橋創造大学大学院健康科学研究科後藤勝正教授に甚大なる謝意を表します。そして、本研究を遂行するにあたり、多くの御指導と御鞭撻を賜りました豊橋創造大学保健医療学部理学療法学科講師大野善隆先生と助教横山真吾先生そして京都大学大学院人間環境学研究科助教江川達郎先生に深く感謝します。

引用文献

1. 総務省 (2018) 統計トピックス No.113 統計からみた我が国の高齢者. P.1-6
2. Kadono Y, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Matsuda S, Tanaka S, Nakamura K (2010) Statistics for orthopedic surgery 2006-2007: data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *J Orthop Sci* 15: 162-170
3. Nakamura K (2008) A“super-aged” society and the “locomotive syndrome”. *J Orthop Sci* 13: 1-2
4. Rosenberg IH (1997) Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr*127 (5 Suppl): 990S-991S
5. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group (2001) Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Biol Sci Med Sci* 56: 146-156
6. Lizuka K, Machid T, Hirafuji M (2014) Skeletal Muscle Is an Endocrine Organ. *J Pharmacol Sci* 125: 125-131
7. Stromme SB, Hammel HT (1967) Effects of physical training on tolerance to cold in rats. *J Appl Physiol* 23: 815-824
8. Chin A, Seaman R, and Kapileshwarker M (1973) Plasma catecholamine response to exercise and cold adaptation. *J Appl Physiol* 34: 409-412
9. Fukunaga T, Roy RR, Shellock FG, Hodgson JA, Day MK, Lee PL, Kwong-Fu H, Edgerton VR (1992) Physiological cross-sectional area of human leg muscles based on magnetic resonance imaging. *Journal of Orthopaedic Research* 10: 926-934
10. Goldspink G (1999) Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 194: 323-334
11. Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM (1987) Time course adaptations in rat skeletal muscle isomyosins during compensatory growth and regression. *J Appl Physiol* 63: 2111-2121
12. Greenlund LJ, Nair KS (2003) Sarcopenia-consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev* 124: 287-299
13. Akima H, Kuno S, Suzuki Y, Gunji A, Fukunaga T (1997) Effects of 20 days of bed rest on physiological cross-sectional area of human thigh and leg muscles evaluated by magnetic resonance imaging. *J Gravit Physiol* 4 (1): S15-21
14. Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD, Dombrowski MJ, Oganov VW, Ilyina-Kakueva EI (1992) Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness : vastus medialis. *J APPI Physiol* 73 (2 Supp): 44S-50S
15. Thmason DB, Booth FW (1990) Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J appl physio* 68 (1): 1-12

16. Doherty TJ (2003) Physiology of Aging Invited Review: Aging and sarcopenia. *Journal of Applied Physiology* 95: 1717-1727
17. Poggi P, Marchetti C, Scelsi R (1987) Automatic morphometric analysis of skeletal muscle fibers in the aging man. *Anat Rec* 217: 30-34
18. Kanehisa H, Ikegawa S, Tsunoda N, Fukunaga T (1994) Cross-Sectional Areas of Fat and Muscle in Limbs During Growth and Middle Age. *Int J Sports Med* 15 (7): 420-425
19. Kanehisa H, Ikegawa S, Tsunoda N, Fukunaga T (1995) Strength and cross-sectional areas of reciprocal muscle groups in the upper arm and thigh during adolescence. *Int J Sports Med* 16 (1): 54-60
20. Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* 89 (1): 81-88
21. Himann JE, Cunningham DA, Rechnitzer PA, Paterson DH (1998) Age-related changes in speed of walking. *Med Sci Sports Exerc* 20 (2): 161-166
22. Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1974-1984
23. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P (2009) SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* 6 (4): 275-277
24. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18: 39-51
25. Suzuki K, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Minami Y, Ohno S (1987) Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Letters* 220: 271-277
26. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M (2009) Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10: 507-515
27. Egawa T, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Ikuta A, Suzuki M, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K (2015) Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E651-E662
28. Krawiec BJ, Nystrom GJ, Frost RA, Jefferson LS, Lang CH (2007) AMPactivated protein kinase agonists increase mRNA content of the musclespecific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1555-E1567
29. Nakashima K, Yakabe Y (2007) AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1650-1656
30. Ishido M, Uda M, Kasuga N, Masuhara M (2009) The expression patterns of Pax7 in satellite

- cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol (Oxf)* 195 (4): 459-469
31. He L, Li G, Feng X, Shi H, Chang D, Ye K, Wang S (2008) Effect of energy compound on skeletal muscle strain injury and regeneration in rats. *Ind Health* 46 (5): 506-512
 32. Ishido M, Uda M, Masuhara M, Kami K (2006) Alterations of M-cadherin, neural cell adhesion molecule and beta-catenin expression in satellite cells during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol (Oxf)* 187 (3): 407-418
 33. Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA (2006) Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 172 (1): 103-113
 34. Lepper C, Partridge TA, Fan CM (2011) An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138 (17): 3639-3646
 35. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A (2011) Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 138 (17): 3647-3656
 36. Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne G, Thornell LE (1999) Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol* 111: 189-195
 37. Anderson JE (2006) The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol* 209: 22276-2292
 38. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z (2006) The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 54: 1177-1191
 39. Petrella JK, Kim J, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM (2006) Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and woman. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E937-E946
 40. Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JN, Christensen LR, Andersen JL (2004) The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558: 1005-1012
 41. Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495
 42. Snow MH (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188: 201-217
 43. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T (2007) Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13: 332-339
 44. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M,

- Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769
45. Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439-451
 46. Atzmon G, Pollin TI, Crandall J, Tanner K, Schechter CB, Scherer PE, Rincon M, Siegel G, Katz M, Lipton RB, Shuldiner AR, Barzilai N (2008) Adiponectin levels and genotype: a potential regulator of life span in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63: 447-453
 47. Huang C, Tomata Y, Kakizaki M, Sugawara Y, Hozawa A, Momma H, Tsuji I, Nagatomi R (2015) High circulating adiponectin levels predict decreased muscle strength among older adults aged 70 years and over: A prospective cohort study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 25: 594-601
 48. Menzaghi C, Trichitta V (2018) The adiponectin paradox for all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes* 67: 12-22
 49. Woodward L, Akoumianakis I, Antoniadis C (2017) Unravelling the adiponectin paradox: novel roles of adiponectin in the regulation of cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 174: 4007-4020
 50. Jespersen J, Kjaer M, Schjerling P (2006) The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci. Sports* 16 (2): 74-82
 51. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM (2006) Transcriptional profiling of Myostatin -knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J* 20: 580-582
 52. Murphy KT, Koopman R, Naim T, Le'ger B, Trieu J, Ibebunjo C (2010) Lynch GS Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J* 24: 4433-4442
 53. Hill EW, Gu J, Eivers SS, Fonseca RG, McGivney BA, Govindarajan P, Orr N, Katz LM, MacHugh DE (2010) A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred horses. *PLoS One* 20: e8645
 54. Tozaki T, Hill EW, Hirota K, Kakoi H, Gawahara H, Miyake T, Sugita S, Hasegawa T, Ishida N, Nakano Y, Kurosawa M (2011) A cohort study of racing performance in Japanese Thoroughbred racehorses using genome information on ECA18. *Anim Genet* 43: 42-52
 55. Goto K, Okuyama R, Honda M, Uchida H, Akema T, Ohira Y, Yoshioka T (2003) Profiles of connectin (titin) in atrophied soleus muscle induced by unloading of rats. *J Appl Physiol* 94: 897-902
 56. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Mitch WE, Goldberg AL (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in

- gene expression. *FASEB J* 18: 39-51
57. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R (2002) Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 50: 89-96
 58. Handschin C, Spiegelman BM (2008) The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature* 7203: 463-469
 59. Bock JO, König HH, Brenner H, Haefeli WE, Quinzler R, Matschinger H, Saum KU, Schöttker B, Heider D (2016) Associations of frailty with health care costs results of the ESTHER cohort study. *BMC Health Serv Res* 16: 128
 60. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004) The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52: 80-85
 61. Gotoda T (2016) Another paradox regarding adiponectin revisited. *J Atheroscler Thromb* 2: 292-294
 62. Loncar G, Bozic B, Haehling SV, Düngen HD, Prodanovic N, Lainscak M, Arandjelovic A, Dimkovic S, Radojicic Z, Popovic V (2013) Association of adiponectin with peripheral muscle status in elderly patients with heart failure. *Eur J Intern Med* 24: 818-823
 63. Goto A, Ohno Y, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, Sugiura T, Yoshioka T, Ohira Y, Goto K (2013) Up-regulation of adiponectin expression in antigravitational soleus muscle in response to unloading followed by reloading, and functional overloading in mice. *PLoS ONE* 8: e81929
 64. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM (2004) Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 145: 5589-5597
 65. Goldspink G (1999) Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 194: 323-334
 66. Perrone CE, Fenwick-Smith D, Vandeburgh HH (1995) Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 270: 2099-2106
 67. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117: 399-412
 68. Høeg LD, Sjøberg KA, Lundsgaard AM, Jordy AB, Hiscock N, Wojtaszewski JF, Richter EA, Kiens B (2013) Adiponectin concentration is associated with muscle insulin sensitivity, AMPK phosphorylation, and ceramide content in skeletal muscles of men but not women. *J Appl Physiol* 114: 592-601
 69. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita

- S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295
70. Egawa T, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K (2014) AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306: E344-E354
 71. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T (2013) A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503: 493-499
 72. Kojima A, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Fujiya H, , Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Aoki H, Yoshioka T (2007) Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci* 12: 74-82
 73. Koya T, Nishizawa S, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Beppu M, Goto K (2013) Heat shock transcription factor 1-deficiency attenuates overloading-associated hypertrophy of mouse soleus muscle. *PLOS ONE* 8: e77788
 74. Fiaschi T, Cirelli D, Comito G, Gelmini S, Ramponi G, Serio M, Chiarugi P (2009) Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells. *Cell Res* 19: 584-597
 75. Ouchi N, Parker J, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11: 85-97
 76. Gonzalez AA, Kumar R, Mulligan JD, Davis AJ, Saupe KW (2004) Effects of aging on cardiac and skeletal muscle AMPK activity: basal activity, allosteric activation, and response to invitro hypoxemia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1270-R 1275
 77. Bower M, Campana M, Whitten C, Edwards C, Jones H, Barrett E, Cassidy R, Nisbet RE, Hill EW, Howe C, Binns M (2011) The cosmopolitan maternal heritage of the Thoroughbred racehorse breed shows a significant contribution from British and Irish Native mares. *Biol Lett* 7: 316–320
 78. Cunningham EP, Dooley JJ, Splan RK, Bradley DG (2001) Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to Thoroughbred horses. *Anim Genet* 32: 360-364
 79. Hill EW, Bradley DG, Al-Barody M, Ertugrul O, Splan RK, Zakharov I, Cunningham EP (2002) History and integrity of Thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Anim Genet* 33: 287-294
 80. Jones JH, Lindstedt SL (1993) Limits to maximal performance. *Annu Rev Physiol* 55: 547-569

81. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM (2006) Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J* 20: 580-582
82. Murphy KT, Koopman R, Naim T, Le'ger B, Trieu J, Ibejunjo C (2010) Lynch GS Antibody directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J* 24: 4433-4442
83. Hill EW, Gu J, Eivers SS, Fonseca RG, McGivney BA, Govindarajan P, Orr N, Katz LM, MacHugh DE (2010) A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred horses. *PLoS One* 20: e8645
84. Tozaki T, Hill EW, Hirota K, Kakoi H, Gawahara H, Miyake T, Sugita S, Hasegawa T, Ishida N, Nakano Y, Kurosawa M (2011) A cohort study of racing performance in Japanese Thoroughbred racehorses using genome information on ECA18. *Anim Genet* 43: 42-52
85. Tozaki T, Sato F, Hill EW, Miyake T, Endo Y, Kakoi H, Gawahara H, Hirota K, Nakano Y, Nambo Y, Kurosawa M (2011) Sequence variants at the myostatin gene locus influence the body composition of Thoroughbred horses. *J Vet Med Sci* 73: 1617-1624
86. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162: 1135-1147
87. Bower MA, McGivney BA, Campana MG, Gu J, Andersson LS, Barrett E, Davis CR, Mikko S, Stock F, Voronkova V, Bradley DG, Fahey AG, Lindgren G, MacHugh DE, Sulimova G, Hill EW (2012) The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nat Commun* 3: 643
88. Yamano S, Eto D, Kasashima Y, Hiraga A, Sugiura T, Miyata H (2005) Evaluation of developmental changes in the coexpression of myosin heavy chains and metabolic properties of equine skeletal muscle fibers. *Am J Vet Res* 66: 401-405
89. Smith RK, Birch H, Patterson-Kane J, Firth EC, Williams L, Cherdchutham W, van Weeren WR, Goodship AE (1999) Should equine athletes commence training during skeletal development? Changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Vet J Suppl* 30: 201-209
90. Kasashima Y, Smith RK, Birch HL, Takahashi T, Kusano K, Goodship AE (2002) Exercise-induced tendon hypertrophy: cross-sectional area changes during growth are influenced by exercise. *Equine Vet J Suppl* 34: 264-268
91. Kawai M, Aida H, Hiraga A, Miyata H (2013) Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 45: 512-517
92. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Me'nissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17: 71-74
93. McPherron AC, Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin

- gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12457-12461
94. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA (2007) A mutation in the Myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 3: e79
 95. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83-90
 96. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe´ B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38: 813-818
 97. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hu¨bner C, Riebel T, Ko¨men W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682-2688
 98. Tozaki T, Miyake T, Kakoi H, Gawahara H, Sugita S, Hasegawa T, Ishida N, Hirota K, Nakano Y (2010) A genome-wide association study for racing performances in Thoroughbreds clarifies a candidate region near the MSTN gene. *Anim Genet* 41(S2): 28-35
 99. Petersen JL, Mickelson JR, Rendahl AK, Valberg SJ, Andersson LS, Axelsson J, Bailey E, Bannasch D, Binns MM, Borges AS, Brama P, da Caˆmara Machado A, Capomaccio S, Cappelli K, Cothran EG, Distl O, Fox-Clipsham L, Graves KT, Gue´rin G, Haase B, Hasegawa T, Hemmann K, Hill EW, Leeb T, Lindgren G, Lohi H, Lopes MS, McGivney BA, Mikko S, Orr N, Penedo MC, Piercy RJ, Raekallio M, Rieder S, Røed KH, Swinburne J, Tozaki T, Vaudin M, Wade CM, McCue ME (2013) Genomewide analysis reveals selection for important traits in domestic horse breeds. *PLoS Genet* 9: e1003211
 100. Rivero JL, Hill EW (2016) Skeletal muscle adaptations and muscle genomics of performance horses. *Vet J* 209: 5-13
 101. Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers M (2003) Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training. *Exp Biol Med* 228: 706-709
 102. Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, Pollanen E, Hakkinen K, Alen M, Selanne H, Kovanen V, Mero AA (2007) Post exercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sports Exerc* 239: 289-297
 103. Hill EW, Fonseca RG, McGivney BA, Gu J, MacHugh DE, Katz LM (2012) MSTN genotype (g.66493737C/T) association with speed indices in Thoroughbred racehorses. *J Appl Physiol* 112:86-90
 104. Seo S, Takayama K, Uno K, Ohi K, Hashimoto R, Nishizawa D, Ikeda K, Ozaki N, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A (2013) Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene. *PLoS One* 8(10): e76960

105. Millar DS, Horan M, Chuzhanova NA, Cooper DN (2010) Characterisation of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GH1) gene. *Hum Genom* 4(5): 289-301
106. Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE (2002) Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 13: 2909-2918
107. Reimann J, Brimah K, Schroeder R, Wernig A, Beauchamp JR, Partridge TA (2004) Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res* 315: 233-242
108. Yablonka-Reuveni Z, Rudnicki MA, Rivera AJ, Primig M, Anderson JE, Natanson P (1999) The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* 210: 440-455
109. Schultz E, Chamberlain C, McCormick KM, Mozdziak PE (2006) Satellite cells express distinct patterns of myogenic proteins in immature skeletal muscle. *Dev Dyn* 235: 3230-3239
110. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617
111. Rhoads RP, Flann KL, Cardinal TR, Rathbone CR, Liu X, Allen RE (2013) Satellite cells isolated from aged or dystrophic muscle exhibit a reduced capacity to promote angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 440: 399-404
112. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK (2007) Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 18: 1397-1409
113. Ploquin C, Chabi B, Fouret G, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonnieu A, Ramonatxo C (2012) Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am J Physiol* 302: E1000-E1008

要旨

本研究ではアディポネクチンとミオスタチンに着目して、骨格筋量を調節する仕組みに関して、1) 高濃度アディポネクチンは骨格筋を萎縮させる、2) ミオスタチン SNP は骨格筋トレーニング効果を変調させる、という仮説を検証した。

アディポネクチン受容体 (AdipoR) の アゴニストであるAdipoRon は、AMPK リン酸化の増加を介して、C2C12 筋管細胞のタンパク含有量、筋管細胞直径および筋管細胞当たりの筋核数を濃度依存性に低下させた。このようなAdipoRon による C2C12 筋管細胞のタンパク質含量、筋管直径および筋管当たりの筋核数の低下は、AdipoR1 および AdipoR2 あるいは両受容体のノックダウンにより部分的に抑制された。継続的なAdipoRon をマウスの静脈内に投与することにより、速筋型の足底筋 (PLA) の筋湿重量を低下させたが、遅筋型のヒラメ筋 (SOL) には AdipoRon 投与の影響は認めなかった。しかし、PLA および SOL における AMPK リン酸化レベルは、AdipoRon 投与によって増加した。一方、Adipo 発現量は速筋型の長趾伸筋 (EDL) よりも SOL で有意に高値を示した。さらに、EDL における Adipo 発現量および AMPK リン酸化レベルは加齢により増加したが、SOL では有意な増加は認めなかった。SOL ならびに EDL における AdipoR1 および AdipoR2 発現量に、加齢の影響は認めなかった。以上の結果より、高濃度の循環血液中のアディポネクチンは速筋の萎縮を引き起こすことが示唆された。

また、競走馬のトレーニング効果に対してミオスタチン一塩基多型 (SNP) が影響するか否かについて、成長期の競走馬におけるミオスタチン遺伝子多型 (g.66493737、T/T、C/T、および C/C 遺伝子型) と筋衛星細胞関連および酸化的代謝関連因子の mRNA 発現レベルとの間の関連を検討した。その結果、トレーニング前における筋線維タイプ構成比率や筋線維横断面積においてミオスタチン SNP の影響は認めなかった。しかし、T/T 型における IIx 筋線維構成比率はトレーニングにより有意に減少した。さらに、トレーニングにより C/C 型のミオスタチン mRNA 発現レベルは有意に低下し、タイプ IIx 筋線維横断面積は有意に肥大した。さらに、すべての遺伝子型の中で最も顕著な差は、トレーニング後における T/T 型のミトコンドリア生合成に関与する分子 (SDHa および PGC1 α) の mRNA 発現レベルの増加であった。以上の結果より、ミオスタチン発現量ならびにミオスタチン SNP は、サラブレッド骨格筋のトレーニングに対する収縮および代謝的適応変化に影響を与えることが示唆された。

以上の結果より、高濃度の循環血液中の Adipo および骨格筋 Adipo 発現量の増加が加齢による骨格筋萎縮すなわちサルコペニアの発症に関与していること、ミオスタチン SNP はトレーニングに対する骨格筋の適応変化に大きく影響することが示唆された。

論文目録

- 1) Ito R, Higa M, Goto A, Aoshima M, Ikuta A, Ohashi K, Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Miyata H, Goto K (2018) Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle. PLoS ONE 13(10): e0205645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205645> 第2章

- 2) Miyata H, Itoh R, Sato F, Takebe N, Hada T, Tozaki T (2018) Effect of Myostatin SNP on muscle fiber properties in male Thoroughbred horses during training period. J Physiol Sci 68 (5): 639–646. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0575-3> 第3章