

老齢マウスの運動トレーニングによる骨格筋 GDF (Growth and Differentiation Factor)-11 の変動

スポーツ医科学研究領域

5013A009-1 李 ミンジョン

研究指導教員：鈴木 克彦 教授

背景 世界的に高齢化が加速しており、高齢者のサルコペニアの予防・改善の対策が必要とされている。最近、Transforming growth factor (TGF)- β スーパーファミリーに属するサイトカインである GDF (Growth and differentiation factor) -11 が老化した骨格筋の「若返り」因子として注目され始めた。老齢マウスの血中、骨格筋において GDF-11 の発現量が低下しており、逆に老齢マウスへの GDF-11 の投与により、老化による骨格筋の修復能力低下、異常なサルコメア構造やミトコンドリアの蓄積が抑制され、トレッドミル走行時間の延長、筋力向上が認められたため、GDF-11 が老齢マウスの骨格筋機能を改善することが明らかになった (Sinha *et al.*, 2014)。一方、GDF-11 の機能についての詳細はまだ不明だが、成熟型 GDF-11 のアミノ酸配列が骨格筋成長や筋肥大を阻害する Myostatin と 90%一致しており、ともに共通のレセプターを介してシグナル伝達を行うため、GDF-11 も Myostatin と同様に筋の肥大や萎縮の調節に関与することが想定される。また、GDF-11 は骨格筋に発現しているため (Jeanplong *et al.*, 2012)、運動による骨格筋のダイナミックな収縮活動によりその発現が変動する可能性が考えられる。一方、様々な研究でサルコペニアは運動により改善することが可能であると報告されている。これらのことから、運動によるサルコペニア改善に GDF-11 が関与する可能性が考えられるが、運動による GDF-11 の発現変動についてはまだ研究がなされていない。

目的 そこで本研究では、老齢マウスに対する 6 週間の運動トレーニングが骨格筋 GDF-11 発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法 雄性的な若齢マウス (8 週齢, n=6) および老齢マウス (22~25 ヶ月齢, n=11) を用い、以下の実験を行った。老齢マウスは運動群 (n=6) と安静群 (n=5) に分けて、運動群には 6 週間のトレッドミルによる運動トレーニングを実施した。運動トレーニング終了後、

全てのマウスを解剖し、骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋) を採取した。

採取したサンプルを用い、RT-PCR による GDF-11 mRNA 発現量の測定、Western-blot による GDF-11 タンパク質発現量の測定を行い、蛍光免疫染色により骨格筋断面積および筋線維組成を検討した。2 群間の比較には対応のない t-test を行い、P 値 < 0.05 を統計学的有意水準とした。

結果

・加齢による変化

はじめに、加齢による骨格筋の変化と GDF-11 の発現変動を検討するため、老齢マウスの安静群と若齢マウスを比較した。老齢マウスのヒラメ筋と足底筋の体重当たり筋湿重量は若齢マウスより有意に低値を示した。筋線維 1 本当当たりの断面積の比較では、ヒラメ筋において老齢マウスのタイプ I 線維の断面積が若齢マウスより有意に減少し、タイプ IIa 線維の断面積は若齢マウスより有意に増加した。足底筋においては、老齢マウスのタイプ IIb と IIc/x 線維の断面積が若齢マウスより有意に増加し、タイプ IIa 線維の断面積は有意に減少した。一方、ヒラメ筋と足底筋における GDF-11 の mRNA とタンパク質の発現量は、老齢マウスと若齢マウスで有意な差が認められなかった。

・老齢マウス骨格筋の運動トレーニングによる変化

次に、老齢マウスを用いて運動トレーニングによる骨格筋の変化と GDF-11 の発現変動を検討した。その結果、6 週間の運動トレーニングにより、体重当たりの筋重量は変化を示さなかったが、ヒラメ筋のタイプ I, IIa, IIc/x 線維の 1 本当当たりの断面積が安静群より有意に増加した。足底筋においても、同様にタイプ IIb, IIa, IIc/x 線維の 1 本当当たりの断面積が有意に増加した。

GDF-11 の発現については、ヒラメ筋において安静群より運動群で GDF-11 mRNA の有意な発現量の増加が

認められた (図 1) . 一方, 足底筋では運動による GDF-11 mRNA の変動が認められなかった. また, GDF-11 タンパク質発現は, ヒラメ筋と足底筋両方とも運動トレーニングによる変化が認められなかった.

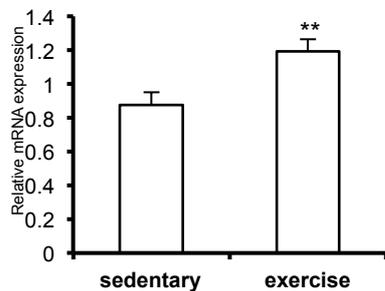


図 1. 運動トレーニングによる老齢マウスヒラメ筋における GDF-11 mRNA の発現量.
sedentary; 老齢マウスの安静群
exercise; 老齢マウスの運動群
**P < 0.01, vs. sedentary group.

考察 老齢マウスの骨格筋において若齢マウスに比べ体重当たりの筋重量は減少したが, 遅筋と速筋を構成する筋線維うち一部が断面積の増加を示した. 8 週齢のマウスは成長期を終えた成体のマウスとして多くの実験に用いられているため, 本研究でも老齢マウスの比較対象として設定したが, 8 週齢以降も骨格筋は成長を続ける可能性が考えられる. コントロールとして用いた若齢マウスの筋線維の断面積が小さいために, 老齢マウスの加齢による筋線維断面積の萎縮が過小評価されたのではないかと考えられた. 一方, 骨格筋全体のきれいな断面を染色した画像を観察すると, 老齢マウスの骨格筋は若齢マウスより筋線維の数が少なく, 筋全体の面積は減少していた. また, 老齢マウスにおいて加齢性変化である細長い形の筋線維が多く観察されたことから, 本研究で用いた老齢マウスで骨格筋における加齢性変化は確かに生じていると考えられる.

加齢による GDF-11 の発現変動について先行研究では骨格筋 GDF-11 mRNA の発現は 2~6 週齢で上昇し, その後 32 週齢まで低下すると報告されているが (Jeanplong *et al.*, 2012), 成長期を終えて老齢になるまでの GDF-11 mRNA 発現変動については不明であった. 本研究により 8 週齢の若齢マウスと 23~26 ヶ月齢の老齢マウスの間で骨格筋における GDF-11 mRNA 発現量に有意な差が認められなかったことから, 骨格筋の GDF-11 mRNA 発現量は成体になってから老齢になるまでには変動しないことが示唆された.

運動トレーニングの影響に関しては, 老齢マウスに

おいて 6 週間の運動トレーニングにより筋線維 1 本当たりの断面積は増加したが, 体重当たりの筋重量は変化を示さなかった. 老齢マウスの持久性運動による骨格筋の適応が認められず, 本研究で行った持久性運動は骨格筋に変化を大きく誘導する強度には満たなかった可能性があると考えられる.

また, 運動トレーニングにより遅筋型ミオシンが優位に発現しているヒラメ筋の GDF-11 mRNA 発現量が増加し, 速筋型ミオシンが優位に発現している足底筋では GDF-11 mRNA の発現量に変動が認められなかったことから, 運動トレーニングが遅筋優位に骨格筋 GDF-11 mRNA の発現を亢進することが示唆された. 筋線維タイプにより GDF-11 mRNA 発現が異なる理由として mRNA の転写後調節を行う microRNA が関与する可能性が考えられる. microRNA は標的の mRNA の分解および翻訳阻害を行うが, 速筋に優位に発現している microRNA のうち, GDF-11 mRNA を標的とする miR-133 がバイオインフォマティクスにより同定された. したがって, 速筋における miR-133 が GDF-11 mRNA の発現を制御する可能性があるが, これらはバイオインフォマティクスを用いた予測であるため, 実際 microRNA が GDF-11 mRNA 発現に関与するこのかについては今後実験による検討が必要であると考えられる.

本研究で検出した GDF-11 タンパク質の発現量は GDF-11 前駆体であるが, Western blot により複数のシグナルが検出されており, 今後 GDF-11 組み換えタンパク質を作製し, より正確に GDF-11 タンパク質の位置を判別する必要があると考えられる. さらに, GDF-11 の機能は成熟型 GDF-11 のレセプターへの結合によりなされるため, 成熟型 GDF-11 の測定は必要と考えられ, 今後抗体の反応性を高める実験条件を工夫する必要があると考えられる. 一方, これまでに GDF-11 のタンパク質の定量を試みた先行研究がほとんどなく, 特異性の高い抗体がまだ開発されていないために, GDF-11 に対する特異性の高い抗体の開発も今後の課題であると考えられる.

結論 本研究により, 骨格筋 GDF-11 の発現は加齢による変動は示さないが, 老齢マウスにおいて運動刺激により遅筋優位にその mRNA の発現量が上昇することが明らかになった.