

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670641

研究課題名(和文)加齢による筋Caチャンネルの異常が骨格筋力低下を生じる分子メカニズム

研究課題名(英文)Changes in expression of L-type calcium channel subunits in skeletal muscle with aging.

研究代表者

加藤 博之(KATO, Hiroyuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：40204490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋のL型Ca²⁺チャンネル(LTCC)の異常とサルコペニアの発症機序の関係について検討を行った。5および26ヶ月齢のC57BL/6マウスの前脛骨筋を比較した結果、単位面積当たりの張力が加齢によって有意に減少していた。次にウェスタンブロットによってLTCCの各サブユニットの発現量を定量した。その結果、CaV1.1の発現量が加齢によって減少していた。一方、CaV1サブユニットの発現量は有意に増加していた。また、除神経による筋萎縮モデルにおいても、CaV1の発現増加が認められた。CaV1の発現量の変化が、興奮収縮連関の異常や筋萎縮に関わっている可能性もあり、現在解析を続けている。

研究成果の概要(英文)：L-type calcium channels (LTCC) play an essential role in excitation-contraction coupling of skeletal muscle; however, it is controversial whether expression levels of LTCC subunits change in muscle atrophy. We investigated if this is the case in sarcopenia by using young (5-month-old) and aged (26-month-old) mice, and also in a mouse model of denervation-induced muscle atrophy. Absolute and specific force of tibialis anterior (TA) muscle significantly decreased with aging and denervation. Expression of CaV1.1 subunits, main subunits of LTCC, in TA was significantly lower whereas that of auxiliary CaV1 subunits was significantly higher in aged than young mice. In the case of denervation-induced muscle atrophy, expression of CaV1.1 subunits was unaltered whereas expression of CaV1 proteins but not mRNA increased. Thus, in various types of muscle atrophy, CaV1 protein expression may increase through the post-translational modification and be involved in the pathological process.

研究分野：医歯薬学 外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：サルコペニア 加齢 L型カルシウムチャンネル 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

高齢者が要介護、要支援に陥る原因として、加齢による筋量および筋力低下(サルコペニア)が注目されている。サルコペニアでは、筋力の減少と共に、筋肉の断面積あたりの張力(特異張力)が減少することが知られている。この原因の一つとして、老化した骨格筋におけるカルシウム代謝の異常が考えられる。骨格筋において、L型Ca²⁺チャンネル(LTCC)やリアノジン受容体(RyR)は電気信号をカルシウム信号に変換する、興奮収縮連関に必要な不可欠な役割を果たしている。老化によってこれらの分子の機能や発現量に異常が起こることが報告されているが、その詳細は不明である。

また、老化した骨格筋の興奮収縮連関は、収縮の細胞外Ca²⁺依存性が強くなることが報告されており、このことは、LTCCの機能異常が起こっていることを示唆している。LTCCの主サブユニットであるCa_v1.1、アクセサリーサブユニットである $\alpha_2\delta$ 、 β 、 γ など複数のタンパク質から構成されている。Ca_v1ファミリーに属するタンパク質の細胞内C末端は、翻訳後途中で切断され、近位側C末端(PCT)と遠位側C末端(DCT)に分かれる。近年の研究により、この切断されたDCTはPCTに非共有的に再結合して、Ca_v1を透過するCa²⁺電流を自己抑制するが明らかになっている。この抑制機構が、老化による興奮収縮連関の異常に関連している可能性も考えられる。

そこで研究者らは、LTCCなどのカルシウム代謝関連分子の機能や発現量が、加齢によってどのように変化するかを検討することとした。また、本実験では、広く用いられているマウス系統であるC57BL/6の他に、平均寿命は通常のマウスの半分程度しかない、早老モデルマウスSAMP1を用いた解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢によって骨格筋の興奮収縮連関に異常が起こるメカニズムを、LTCCなどのカルシウム代謝分子の解析を通じて明らかにすることである。これまでの研究で、加齢により骨格筋型LTCCの機能や発現量に異常が生じるという報告があるが、筋力低下との関係については未だ不明な点が多い。本研究では老化マウスを用いて、これらを明らかにしていく。本研究により老化に伴う骨格筋力低下の分子機構が明らかになれば、サルコペニアに対する新しい治療法、創薬に結びつく可能性がある。

3. 研究の方法

(1) マウスモデル

C57BL/6マウスの寿命は約30ヶ月であり、本研究では5ヶ月齢を若年、26ヶ月齢を老年マウスとした。老化促進モデルマウス(SAMP-1)は寿命が約18ヶ月のため、4ヶ月齢を若年、14ヶ月齢を老年マウスとした。また、筋萎縮のモデルとして除神経モデルマウス

を作製した。C57BL/6マウスの右坐骨神経を切除し、2週間後に無処置の左側をコントロールとして比較検討を行った。

(2) マウス骨格筋の収縮力測定

麻酔下のC57BL/6およびSAMP1マウスの前脛骨筋(TA)もしくは長趾伸筋(EDL)を露出させ、遠位の腱を糸で結紮し、糸をFDピックアップTB611T(日本光電)に固定した。針型電極を筋線維に穿刺した後、電気刺激装置(日本光電)を用いてtwitch刺激(1 ms duration, 10 V)、tetanus刺激(1 msec duration, 100 Hz, 100 train, 10 V)を行い、筋力を測定した。張力の解析にはPowerLabシステム(バイオリサーチセンター)を用いた。測定後の筋肉はHE染色を行い、断面積を測定した。

(3) ウェスタンブロッティング

各マウスよりTAおよびEDLを単離し、液体窒素で急速凍結した。凍結した組織はプロテアーゼインヒビターカクテル(ナカライテスク)を加えたホモジネーションバッファー(20 mM HEPES, 320 mM Sucrose, pH 7.4)中でホモジナイズした後、2000 gで15分遠心し、沈殿したデブリスを取り除いた。得られた上清を100,000 gで1時間遠心し、上清を取り除いた。沈殿をリシスバッファー(10 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10%グリセロール, 1% Triton X100, pH 7.5)に懸濁し、10,000 gで30分間遠心し、得られた上清をミクロソーム分画とした。得られたミクロソーム分画7 μ gを常法に従いSDS-PAGEで電気泳動した後、PVDF膜に転写した。非特異的吸着を防ぐためにメンブレンをブロッキングワシ(ナカライテスク)で処理した後、抗Ca_v1.1抗体(1:1000, Abcam)、抗Cacnb1抗体(1:1000, Stressmarq)、抗RyR抗体(1:1000, Affinity Bioreagents)、抗JP1抗体(Invitrogen)で一晩反応を行った。翌日、洗浄バッファー(1% Triton X100 含有PBS)で洗浄した後、HRP標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch)を反応させ、洗浄を行った。Immobilon Western Chemiluminescent HRP(Merck Millipore)を用いて発光反応を行い、my ECL Imager(Life Technologies)によって発光を検出した。得られたバンドはImageJを用いて解析・定量した。

(4) 定量PCR

5ヶ月齢および26ヶ月齢のC57BL/6マウスよりEDLを単離し、液体窒素で急速凍結した。凍結した組織からIsogenを用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA(3 μ g)を鋳型にSuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(インビトロジェン)を用いてcDNAを合成した。PCR反応試薬としてFastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(ロシュ)を用い、測定機器は

StepOnePlus (アプライドバイオシステムズ) を使用した。

4. 研究成果

(1) 加齢マウスを用いた検討

加齢によるマウス筋力の変化

4ヶ月齢と14ヶ月齢のSAMP1マウスの前脛骨筋を測定した。その結果、筋の断面積は加齢によって有意に減少していたが、張力への有意な影響は認められなかった。また、SAMP1マウスの各筋肉組織をHE染色し鏡検した結果、高い頻度で白血球の浸潤が認められた。これらの組織の遺伝子等を解析した場合、炎症由来の変化を捉えてしまう可能性が高いことから、以降の検討はC57BL/6マウスを用いることとした。

5ヶ月齢および26ヶ月齢のC57BL/6マウス由来のTAを用いて検討を行った。その結果、筋の断面積には加齢による変化は認められなかったが、電気刺激による特異張力は有意に減少していた(図1)。次に、EDLでも同様の検討を行った結果、加齢による筋断面積の減少と筋力の低下が観察された。

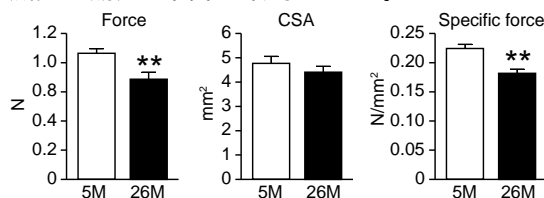


図1: C57BL/6マウスの筋力に対する加齢の影響。マウスのTAを電気刺激し、張力を測定した。測定後に筋束を単離し、HE染色を行い、断面積(CSA)を計測した。n=10, mean ± SE, **: p<0.01。

カルシウム代謝に関わるタンパク質の発現量の変化

次に骨格筋の収縮およびカルシウム代謝に関わる代表的な分子について、ウェスタンブロッティングによる解析を行った。5, 10, および26ヶ月齢のC57BL/6マウスからEDLを摘出した後、ミクロソーム画分を抽出し、ウェスタンブロッティングを行った(図2)。その結果、LTCCのCa_v1.1サブユニットの発現量が、加齢によって有意に減少していた。しかし、どの月齢でもサイズの異なるバンドが検出出来なかったことから、C末端のプロセッシングについては、加齢による変化は無いことが示唆された。一方、LTCCのCa_v1サブユニットは加齢によって有意な増加が認められた。また統計的な有意差は観察されなかったが、RyR受容体の発現量も減少傾向が見られた。ジャンクトフィリン1の発現量には変化が認められなかった。

(2) 除神経モデルマウスを用いた検討

除神経によるマウス筋力の変化

次に、老化以外の筋萎縮モデルでの検討を行い、遺伝子発現などの変化を比較することとした。筋萎縮のモデルとして12週齢の

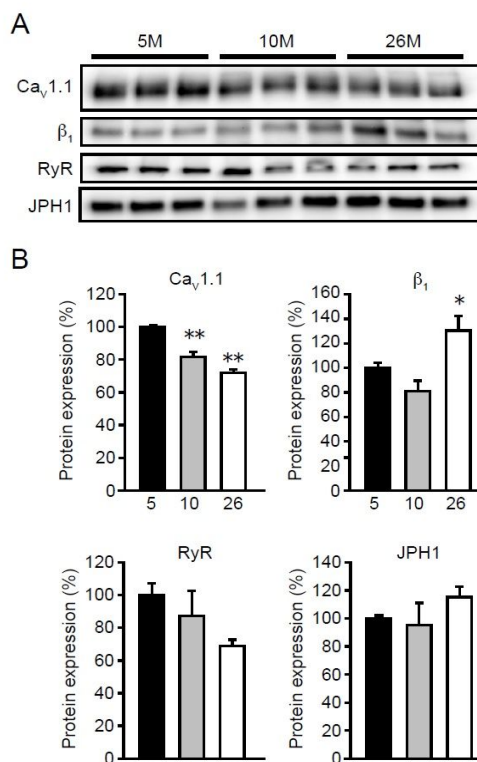


図2: カルシウム代謝関連分子の発現量の加齢による変化。A. ウェスタンブロッティングの結果。B. (A)の結果をデンストメトリーにより定量し、グラフ化した。発現量は5ヶ月齢を100%として表した。n=3, mean ± SE, *: p<0.05, **: p<0.01。

C57BL/6マウスの右坐骨神経を切除した除神経マウスを作成し、無処置の左側をコントロールとして検討を行った。その結果、右前脛骨筋では、対側と比べて術後14日目の筋力、断面積、特異張力が低下していた(図3)。

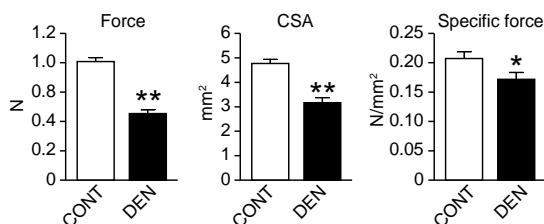


図3: C57BL/6マウスの筋力に対する除神経の影響。マウスのTAを電気刺激し、張力を求めた。測定後に筋束を単離し、HE染色を行い、断面積を計測した。CONT: 健側, DEN: 除神経側, n=10, mean ± SE, *: p<0.05, **: p<0.01。

カルシウム代謝に関わるタンパク質の発現量の変化

ウェスタンブロットの結果、LTCCのCa_v1.1サブユニットとRyRの発現量には変化が無かったが、LTCCのCa_v1サブユニットの発現量が10倍以上に増加していた(図4)。また、同様の増加がEDL、ヒラメ筋でも認められた。Ca_v1については、定量PCRによる検討も行ったが、TAでもヒラメ筋でも、除神経による

Ca_v1 mRNA 量の有意な増加は認められなかった。

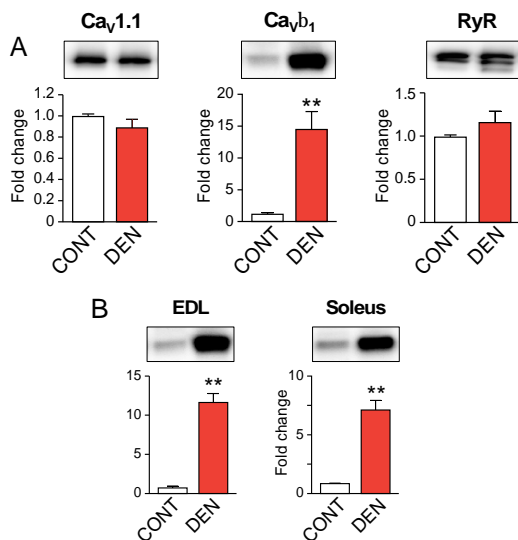


図4：カルシウム代謝関連分子の発現量の除神経加齢による変化。EDLを単離し、ウェスタンブロッティングを行った。A.TAにおける各遺伝子の発現量。上のバンドは典型例、下のグラフは定量化した結果を示す。B.EDL、SoleusにおけるCa_v1の発現量。発現量はコントロールを100%として表した。n=3, mean ± SE, **: p<0.05。

(3) 考察

本研究では、加齢による筋力低下と、LTCCの関係について検討を行った。今回の実験では、加齢によってCa_v1.1サブユニットの発現量の有意な減少が認められた。しかしC末端の修飾については、加齢による変化は認められなかった。一方、LTCCのアクセサリーサブユニットの一つであるCa_v1の有意な増加が認められた。さらに急性の筋萎縮が引き起こされる除神経モデルにおいても、Ca_v1の増加がみられた。同様の現象が多く筋萎縮病態時に起きている可能性があり、今後の検討が必要である。また、mRNA量での増加が認められなかったことから、Ca_v1の増加はタンパク質分解系の異常などによって起こっている可能性が示唆された。過剰なCa_v1は興奮収縮連関を阻害することが報告されており、これが筋の特異張力低下に寄与している可能性がある。また、Ca_v1が転写因子として働くことも明らかにされており、この作用がサルコペニア等の筋萎縮病態に関与している可能性も考えられる。現在、筋萎縮や興奮収縮連関の低下におけるCa_v1の役割について検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者 小松雅俊、中田勉、山本竜星、柏原英俊、山田充彦

演題名 除神経骨格筋におけるL型カルシウムチャンネルサブユニットの発現増加

第89回 日本薬理学会年会

パシフィコ横浜 平成28年3月10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 博之 (KATO, Hiroyuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：40204490

(2) 研究分担者

内山 茂晴 (UCHIYAMA, Shigeharu)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：10242679

山田 充彦 (YAMADE, Mitsuhiro)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10263237

樋口 京一 (HIGUCHI, Keiichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20173156

中田 勉 (NAKADA, Tsutomu)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70452141