

博士論文

骨格筋における A k t の役割の解明

梅 原 敏 弘

目次

1. 要旨	2
2. 序文	3
3. 方法	10
4. 結果	18
5. 考察	41
6. 参考文献	49
7. 謝辞	54

1. 要旨

骨格筋における主要な Akt アイソフォームである Akt1 と Akt2 を骨格筋特異的に欠損するマウスを作成し解析を行った。加齢と共に、単離骨格筋での糖取り込みの悪化や、全身の耐糖能の悪化、骨格筋量の増加抑制を認めた。特に糖取り込みや耐糖能に関しては弱週齢で変化を認めなかったことから、加齢に伴い生じる細胞内や全身の変化を介した二次的な変化であると考えられた。また、加齢とともに、骨格筋においてミトコンドリアの機能維持に影響を与えるような、ミトコンドリアの生合成関連遺伝子、抗酸化ストレス関連遺伝子、Mitofusion 関連遺伝子にも発現変化を認めたことから、加齢変化で一般に認められるミトコンドリア機能異常が促進された可能性が示唆された。

2. 序文

WHO の報告によると、日本は世界の中でも最長寿国と報告されている。2013 年の報告では、全体での平均寿命は 83 歳と世界第一位であり、女性は 86 歳、男性は 79 歳と非常に高い水準にある[1]。平均寿命が延びる一方で、日本の全人口に占める 65 歳以上の割合も増加しており、2013 年には 25%に達し、2025 年には 30%以上に達すると予測されている[2]。このように、平均寿命が延び、高齢者が増える中で、平均寿命と健康寿命の差が問題になってきている。健康寿命は、平均寿命は介護の必要がなく生活できる年齢のことであるが、健康寿命に影響を与える要因は様々なものが挙げられる。その中でもインスリン作用不足は、後述するような健康障害を引き起こし、健康寿命に影響を与えることが知られている。インスリン作用不足は高血糖・糖尿病を介した糖尿病の細小血管障害を引き起こし、また高血圧や高脂血症などの代謝疾患と複合的に作用し、冠動脈疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症を引き起こすことが知られている[3]。また、このような臨床的によく知られた合併症の他にも、インスリン作用不足は、様々な臓器の機能不全の原因になる可能性がヒトや動物の研究から示唆されている。たとえば、マウスの膵臓においては、膵 β 細胞の増殖を抑制することで糖尿病の進展を促進していることが実験で示されている[4]。マウスの脳においても、糖尿病モデルマウスで、記憶やシナプスの可塑性に障害を及ぼすという報告[5, 6]や、糖尿病患者での脳萎縮や、認知機能低下の促進が示唆されている[7, 8]。心筋に対しては、糖尿病モデルマウスでの心不全の促進[9, 10]や、1 型糖尿病患者での、心不全の増加などが報告されている[11]。さらに、本研究で

着目した骨格筋においては、インスリン作用不足により、筋量の低下を引き起こすという報告[12]や、ADL の低下を促進するという報告[13]がある。骨格筋は加齢において一般に量が減少するサルコペニアという現象も知られており、高齢者の健康障害との関わりは深いと考えられる。本研究においては、特に骨格筋におけるインスリン作用不足(インスリン抵抗性)に注目し、加齢変化に及ぼす影響を検討した。

そもそも生体内において膵 β 細胞で産生され分泌されるインスリンは、門脈を通り肝臓に作用し、さらに全身に運ばれ各末梢の臓器において、インスリン作用を発揮する。その中でも、インスリン依存的な末梢での糖取り込みは、約80%が骨格筋で行われており[14]、骨格筋はヒトの糖代謝やインスリン作用において重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、各組織・細胞に到達したインスリンはインスリン・IGF(インスリン様成長因子)-1 シグナルと呼ばれる細胞内シグナル伝達経路を介して細胞や組織の機能維持に必要な様々な作用を発揮する。細胞内インスリン・IGF-1 シグナルは、インスリンや IGF-1 がインスリン受容体や IGF-1 受容体に結合し受容体内で自己リン酸化が起き、引き続き、IRS(インスリン受容体基質)タンパク、PI3Kinase(ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ)のリン酸化が起き、PIP3(ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸)が作られることから始まる。PIP3 には、Akt(Protein Kinase B)の PH(プレクストリン相同)ドメインが結合し、膜に Akt がリクルートメントされることで、PDK1(ホスホイノシチド依存性蛋白質キナーゼ 1)や PDK2 から Akt が Thr308 と Ser473 にリン酸化を受け、Akt が活性化される[15]。活性化された Akt は、さら

に下流の転写因子である FoxO(フォークヘッド型転写因子)、蛋白合成やグリコーゲン合成酵素である GSK3(グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3)、糖取り込み蛋白の GLUT4(グルコース輸送体 4)の translocation に影響を及ぼす AS160(Akt 基質-160kDa)、S6Kinase や mTORC(哺乳類ラパマイシン標的蛋白質複合体)などタンパク質合成や分解を制御するタンパク質のリン酸化や活性に変化を与える。肥満や糖尿病など、インスリン抵抗性や、インスリン分泌低下の状態では、インスリンシグナルが減弱し、本来インスリンシグナルにより維持されているこれらのタンパク質の働きが阻害され、細胞や組織の機能低下を引き起こすものと考えられる。

本研究において着目した Akt は、上述のように、インスリン・IGF-1 シグナルの中で中心的な役割を持つタンパク質であるが、生理的な意義については未だに多くの不明な点が存在する。Akt には Akt1, Akt2, Akt3 という 3 つのアイソフォームが存在し、それぞれは、異なる遺伝子から翻訳されるが、アミノ酸配列で 80%以上の一致を認められる。それぞれのアイソフォームの機能を調べるために、これまでから、それぞれのノックアウトマウスが作成され、解析が進められてきた。全身の Akt1 欠損マウスは、周産期死亡や、20~30%程度の体重の減少を認め、成長に大きな役割を持っていると考えられている[16, 17]。一方、全身の Akt2 欠損マウスは、正常に発育するが、血糖値の上昇や、肝糖放出(Hepatic glucose output)の上昇や、末梢でのインスリン抵抗性といった、糖尿病様の表現型を示している[18]。全身の Akt3 欠損マウスは成長や糖代謝に影響を及ぼすことなく、脳サイズの低下を認めている[19]。このことから、Akt の 3 つのアイソ

フォームは、異なった作用を持っていると考えられる。一方で、Akt1・Akt2 のダブルノックアウトマウスは、出生間もなく致死が認められること、多くの奇形も認められること、出生時にすでに 50%程度の体重しかない点など、より重篤な表現型を呈する[20, 21]ことから、Akt のアイソフォーム間には共通の働きがあり、それぞれのアイソフォームがお互いの作用を部分的に補い合っていると考えられている。(図 1)

そのため、Akt の生理的な役割を解析するためには、時に複数のアイソフォームの機能を欠損させる必要がある。これまで、臓器特異的な Akt 遺伝子のノックアウトマウスが作成され、研究が行われてきた。肝臓においては、肝特異的な Akt2 ノックアウトでは糖代謝に及ぼす影響を認めなかったが、Akt1・Akt2 のダブルノックアウトマウスの解析で、糖代謝への影響を確認することができた[22]。本研究でも、マウスの骨格筋において Akt1,Akt2 のダブルノックアウトマウスを解析することで、Akt の骨格筋での役割や、糖代謝に及ぼす影響を解析することにした。

インスリン抵抗性を主体とした 2 型糖尿病や、肥満などインスリン抵抗性が存在する病態では、骨格筋でインスリンシグナルの減弱が認められ、Akt 活性が低下している[23, 24]。本研究以前にも、インスリン作用不足が骨格筋に与える影響を明らかにするために、様々なノックアウトマウスが作成され、研究が行われてきた。たとえば、インスリン受容体遺伝子を筋肉組織(心筋・骨格筋)で特異的にノックアウトした MIRKO マウスの報告が行われている。このマウス

では、筋量は不変であり、脂肪組織量の増加を認めたが、全身の糖代謝への影響ははっきりとは認められなかった[25]。また、その他にも、筋肉組織特異的な IRS1/2[9]や PDK1 のノックアウトマウス[26]が作成されているが、新生仔致死が認められ、糖代謝の表現型を十分に観察することができなかった。新生仔致死の原因は、骨格筋だけでなく、心筋で表現型が強く表れてしまったためと考えられている(表 1)。そのため、本研究において骨格筋特異的な Akt 欠損マウスを作成し、長期間にわたり、インスリン抵抗性を呈した骨格筋が、全身の代謝に及ぼす影響を検討することができたことは意義深いものであると考えられる。

さらに、本研究において着目した Akt はインスリンのみならず、IGF-1 の下流に存在する。インスリン・IGF-1 シグナルは、これまでから寿命や成長にも影響していると考えられている。これまでの *C.elegans* におけるインスリン・IGF-1 受容体に相当する DAF-2 変異の報告[27]により、インスリン・IGF-1 シグナルの減弱は寿命延長の効果を持つと考えられている。この現象は、IGF-1 受容体ヘテロ欠損(IGF1R+/-)マウス[28]や、GH 受容体/GH 結合タンパク欠損(GHR-KO)マウス[29]において、寿命延長を認めたことから支持されている。しかし一方で、IGF1R+/-マウスや、GHR-KO マウスにおいて低成長を認めることから、これらの遺伝子変異による IGF-1 シグナル減弱は、成長に対して負の影響を持つと考えられる。さらに、骨格筋特異的な GH 受容体や、IGF-1 受容体欠損マウス[30]においても、筋肉量の低下や、筋力の低下を認めており、骨格筋の成長に対しても負の影響を及ぼすと考えられる。実際、高齢者においては、IGF-1 作用低下が生じることが報告されており[31]、高齢者の筋萎縮の一因である可能性が報告

されている。

このように本研究において、骨格筋特異的な Akt 欠損マウスを解析したことは、上記のような骨格筋のインスリン・IGF-1 シグナルの働きを明らかにすることが可能であったと共に、その表現型を長期間にわたり検討できたことで、加齢という時間経過において、骨格筋の Akt が果たす役割に関して、新しい知見を得ることができた。

表 1 筋肉組織におけるインスリン・IGF-1 シグナルに関するノックアウトマウスの報告

ノックアウトマウス	表現型
心筋・骨格筋特異的 Insulin 受容体欠損マウス[25] (MCK プロモーター下に Cre 遺伝子発現)	骨格筋量は変わらず 全身の耐糖能異常なし
骨格筋特異的 IGF-1 受容体欠損マウス[30] (Mef2c プロモーター下に Cre 遺伝子発現)	骨格筋量減少 全身の耐糖能異常なし
心筋・骨格筋特異的 Insulin・IGF-1 受容体欠損ダブル欠損マウス[10] (MCK プロモーター下に Cre 遺伝子発現)	心筋菲薄、心機能低下 新生仔致死 (～4 週齢)
心筋・骨格筋特異的 PDK1 欠損マウス[26] (MCK プロモーター下に Cre 遺伝子発現)	心筋菲薄、心機能低下 新生仔致死 (～6 週齢)
心筋・骨格筋特異的 IRS1・IRS2 ダブル欠損マウス[9] (MCK プロモーター下に Cre 遺伝子発現)	心筋菲薄、骨格筋量減少 新生仔致死 (～3 週齢)

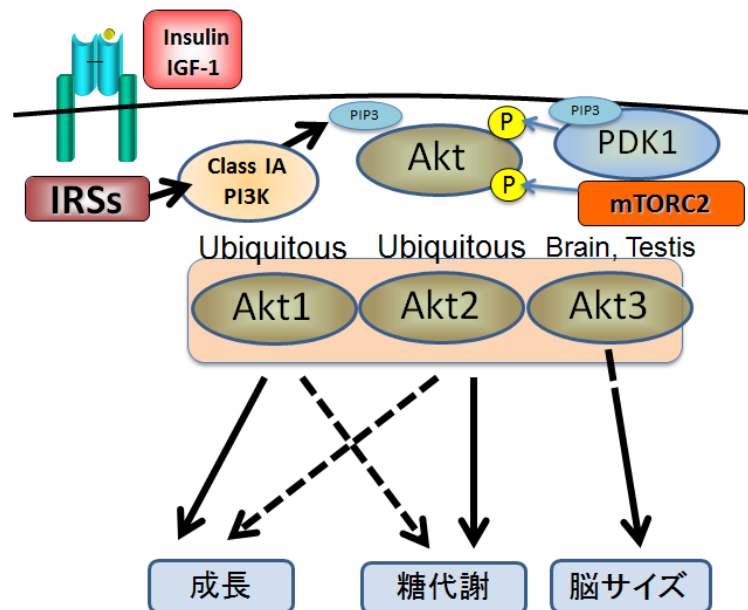


図 1. Insulin・IGF-1 シグナルにおける Akt の役割

これまでの全身のノックアウトマウスの研究で明らかにされた Akt の全身に及ぼす生理的な役割

3. 方法

骨格筋特異的 Akt1/Akt2 ダブルノックアウトマウスの作成

骨格筋特異的 Akt1/Akt2 ダブルノックアウトマウス(MLC1F-DKO)は、骨格筋特異的に発現する Mlc1f プロモーター下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を持った Mlc1f-Cre 配列[32]と、Akt1, Akt2 遺伝子のリン酸化部位を挟む形で flox 配列を持った floxed Akt1, floxed Akt2 アリルをホモ接合型で持つマウスを作成することで Cre-loxP システムにより得られた。さらに、そのコントロールとなるマウスには、Cre を発現せず、floxed Akt1, floxed Akt2 アリルをホモ接合型で持つ、ダブルフロックスマウス(Flox)を用いた。これらのマウスは、MLC1F-DKO マウスと、Flox マウスを交配することで、1:1 の割合で誕生し、同腹仔を実験群として用いることができた。Floxed Akt1 アリルを持ったマウスは当科 Dr.植木が作成したもの(C57BL/6J, 129Sv の mixed background)で、Akt1 遺伝子の Exon4 と Exon5 を挟むようにその上流と下流に lox-P 配列を挿入したアリルを持つ。Floxed Akt2 アリルを持ったマウスは Dr.Birnbaum(The Institute for Diabetes, Obesity and Metabolism, University of Pennsylvania School of Medicine)が作成したものを供与されたもの(C57BL/6J, 129Sv の mixed background)で、Akt2 遺伝子の Exon5 と Exon6 を挟むように lox-P 配列を挿入したアリルを持つ。これら Floxed Akt1 マウス、Floxed Akt2 マウス、MLC1f-Cre マウスを順に掛け合わせることで、MLC1F-DKO マウス、Flox マウスを得ることができた。

マウス遺伝子型の判定は、尾から抽出したゲノム DNA の PCR により行った。それぞれの順方向・逆方向のプライマーは以下のものを用いた。MLC1F-Cre 順

方向プライマー :5'-ACATGTTTCAGGGATCGCCAGG-3' 逆方向プライマー :5'-CGCCGCATAACCAGTGAAAC-3'、Floxed Akt1 順方向プライマー :5'-ATATGAAGATGCCCCGCTGAC-3' 逆方向プライマー :5'-AGCCTTTGCTCACCACAAC-3'、Floxed Akt2 順方向プライマー :5'-TGGACAATCTGTCTTCATGCCAC-3' 逆方向プライマー :5'-AACAACCCCCTTTCAGCACTTG-3'

動物実験

全ての実験は、東京大学動物実験実施規則、及び東京大学動物実験実施マニュアルに沿って行った。マウスは SPF(Specific Pathogen Free)施設で、12 時間毎の明暗期の下で、自由に摂餌と飲水が可能な状態で飼育した。

普通食としては、CLEA Rodent Diet CE-2(水分 9.3% 粗タンパク質 25.1% 粗脂肪 4.8% 粗繊維 4.2% 粗灰分 4.0% 可溶性無窒素物 29.4% 100g あたりのエネルギー 507kcal)を使用した。

RNA 定量・解析

MLC1F-DKO マウスと、そのコントロールとなる同週齢・同腹仔の Flox マウスの長趾伸筋を骨格筋のサンプルとして使用した。8 週齢、16 週齢、24 週齢、32 週齢のオスを使用し、随時摂食下で頸椎脱臼により屠殺し脱血後に骨格筋を採取し液体窒素中に凍結し回収した。RNA の精製には、RNeasy fibrous tissue mini kit(QIAGEN) を用いておこなった。RNA の定量は、0.2 μ g の mRNA を、オリゴ dT プライマー及び逆転写酵素(Applied Biosystems)を用いて cDNA に逆転写し、

次に、試薬に TaqMan Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems)または、SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)を用い、プライマーとプローブ (TaqMan の場合)には後述のセットを用いて定量的 RT-PCR 法により解析した。内因性のコントロールとしては、サイクロフィリン mRNA に対する比として値を示し、コントロールマウスの発現量を 1 とした時の、MLC1F-DKO マウスの発現量を比で表した。

なお、弱週齢(8 週齢)と高週齢(55 週齢)の比較には、C57BL/J マウスを使用することで、同じ遺伝的背景となるようにした。また、定量的 RT-PCR 法の結果の解釈の際に、複数の内因性コントロール(β -Actin、サイクロフィリン、GAPDH)を用いて検証を行った。

使用したプライマー及びプローブの配列を示す。サイクロフィリン順方向プライマー：5'-GGTCCTGGCATCTTGTCAT-3' 逆方向プライマー：5'-CAGTCTTGGCAGTGCAGATAAAA-3' プローブ：5'-CTGGACCAAACACAAACGGTTCCCA-3'、Akt2 順方向プライマー：5'-TCGAGAGGACCTTCCATGTAGAC-3' 逆方向プライマー：5'-TGGATAGCCCGCATCCA-3' プローブ：5'-TCCAGATGAGAGGGAAGA-3'

以下のものは Applied Biosystems より購入した既製品を用いた。

Akt1(Mm00437443_m1), Akt3(Mm00887343_m1), PPARgc1(Mm001208835_m1), mtTFA(Mm00447485_m1), NRF1(Mm01135606_m1), Mfn1(Mm00612599_m1), Mfn2(Mm00500120_m1), PARL(Mm01343688), PPARa(Mm00440939_m1), CPT1b(Mm01308158_m1), CPT2(Mm00487205_m1), SOD2(Mm00449726_m1), GAPDH(Mm99999915_g1), Beta-actin(Mm00607939_s1)

さらに、SYBR Green を用いた場合のプライマーセットは以下のものを設計し
用いた。

インスリン負荷試験・腹腔内ブドウ糖負荷試験

MLC1F-DKO マウスと、そのコントロールとなる同週齢・同腹仔の Flox マウスに対して、耐糖能、インスリン分泌、インスリン感受性を比較するために、8 週齢、16 週齢、24 週齢、32 週齢のオスにおいてインスリン負荷試験、腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。インスリン負荷試験では、8 週齢では、体重 1kg あたり 0.75 単位、16 週齢以降では、体重 1kg あたり 1.0 単位のヒューマリン R を腹腔内投与し、投与前、投与 15, 30, 60, 120 分後に血糖値を測定した。腹腔内ブドウ糖負荷試験では、前日から 16 時間の絶食を行い、体重 1kg あたり 1.5g のブドウ糖を腹腔内に投与し、投与前、投与 15, 30, 60, 120 分後に血糖値を測定した。測定前、15 分、30 分にはインスリン測定のために血清を採取した。血糖値はグルテストセンサー(三和化学)で測定し、インスリン値は AlphaLISA Insulin Assay Kit(PerkinElmer)を用いて測定した。

インスリン静脈注射による組織インスリンシグナルの観察

前日より 16 時間絶食の元で行った。ネンブタールの腹腔内投与により十分に麻酔が効いた状態で腹膜を切開し下大静脈を露出。下大静脈に穿刺を行い、1 個体あたり 5 単位のインスリン(ノボリン R)の静脈注射を行った。未投与、投与 10 分、20 分、30 分の時点で骨格筋を採取し、液体窒素で凍結保存した。その後、タンパク質リン酸化をウエスタンブロッティングにより確認した。なお、弱週

齢(8 週齢)と高週齢(55 週齢)の比較には、20mU / g 体重 、未投与と投与後 15 分の時点での骨格筋におけるタンパク質リン酸化の評価を行った。

ウェスタンブロット

液体窒素で凍結した骨格筋、肝臓、心臓は 200mg 程度ずつ、2ml の LiverBuffer に入れて(肝臓のみ 5ml)、ポリトロン R(Pro Scientific Inc.)でホモジナイズし、3000rpm, 10 分間遠心分離した。その上清を 55000rpm、60 分間超遠心分離を行い、脂肪層の下層にタンパク抽出液を得た。Bradford 法にてタンパク抽出液のタンパク濃度測定を行い、レムリバッファーと合わせて1mg/ml にタンパク濃度調整を行い、100℃にて 5 分加熱した。得られたサンプルは、50ul を 6-9%のポリアクリルアミドゲルで泳動し、100V2 時間で Westran S (Schleicher & Schuell)に転写した。その後以下の抗体・試薬によりブロットと検出を行った。一次抗体には、抗 total-Akt 抗体(CST 9272)、抗 β -actin 抗体、抗 Akt1 抗体(CST 2967)、抗 Akt2 抗体(CST 2964)、抗 phospho-Akt(Ser473)抗体(CST 9271)、抗 phospho-FoxO1 抗体(CST 9461)、抗 phospho-S6Kinase 抗体(CST 9206)、抗 phospho-GSK3 α/β 抗体(CST 9331)、抗 AS160 抗体(CST 2447)、抗 phospho-AS160 抗体(CST 4288)、抗 phospho-TBC1D1(Thr590)抗体(CST 6927) を用いた。二次抗体には、5000 倍のヒツジ抗マウス抗体、ロバ抗ヤギ抗体、ロバ抗ウサギ抗体を一次抗体の種類に応じて使用した。化学発光は、BM Chemiluminescence Blotting Substrate(Roche)を用いて検出を行った。なお、Liver Buffer として組成が、25mM Tris-HCL, 10mM Na₃VO₄, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 100mM NaF, 50mM Na₄P₂O₇, 10mM EGTA, 10mM EDTA, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin 1% Nonident-P 40,

pH 7.4 を用いた。

中性脂肪含量測定

マウスの骨格筋を単離し、その一部を 10 倍量の Liver Buffer 中で、ポリトロンによりホモジナイズを行った。等量のクロロホルム・メタノール混合液(クロロホルム：メタノール比 2:1)を加え、毎分 12000 回転で 10 分間遠心後にクロロホルム層を回収した。この操作を計 3 回繰り返した。得られた溶液は、55℃・1 時間加温することでクロロホルムを揮発させ、沈殿を TritonX-100・エタノール混合液(TritonX-100:エタノール 1:99)で溶解した。その吸光度をトリグリセライド E-ワコー(和光純薬)にて測定し、定量を行った。さらに、組織量で補正を行い比較した。

ATP の定量

随時摂食下において骨格筋を採取後、液体窒素で凍結保存したサンプルを、ATPlite Luminescence Assay System(Perkin Elmer)により ATP 含有量の定量を行った。得られた ATP 含有量を、測定に用いた組織重量で補正し、さらに、コントロールである Flox の値を 1 とした場合の MLC1F-DKO の値を計算し比較を行った。

DEXA・CT スキャン

8,16,24,32 週齢において、DEXA スキャンにより脂肪組織量の検討を行った。なお、各週齢のマウスは異なる群のマウスを使用している。CT スキャンは 8 週

齢において実施し、骨格筋量の測定のために用いた。付属のソフトウェアを用いて、下腿の筋肉量の測定を行った。

マウス運動量の計測

通常の床のケージと、回転カゴの組み合わせだった、マウス呼吸代謝測定用回転ケージ(バイオリサーチセンター株式会社)を用いて、回転車の回転カウント数と、床動作のカウント数の計測を行い、運動量の変化を観察した。

組織染色

採取した骨格筋サンプルを 4%パラホルムアルデヒド(和光純薬)で一晩固定後、パラフィン包埋し、4 μ m の厚さで切片を作成し、ヘマトキシリン/エオジン染色、マッソントリクローム染色を行った。

骨格筋糖取り込み量の測定

MLC1F-DKO、Flox マウスの両下肢から一本ずつの Muscle Strip を単離し Pre-incubate の後に、一方を insulin(-)、他方を insulin(+)の 2-DG(deoxyglucose)入りの PBS 中で Incubate を行った。その後、Muscle Strip 中へ取り込まれた 2-DG を測定することで、それぞれのマウスで、Insulin 依存的な糖取り込み(2-DG 取り込み)の変化を測定した。

統計処理

対応のない独立した 2 群間の検定にはスチューデントの t 検定を用い、帰無仮説は p 値が 0.05 未満の場合に、棄却されるものとし、統計学的有意差が存在すると処理した。

4. 結果

○野生型 B6 マウスの高週齢において Akt 活性の低下

これまでから、加齢に伴いインスリン抵抗性が増すことが報告されているが、マウスの骨格筋において加齢に伴いインスリンシグナルが変化することを、C57BL/6 マウスの若週齢マウス(8 週齢)と高週齢マウス(55 週齢)の骨格筋で比較を行った。下大静脈よりインスリンの静脈注射の後、15 分の時点で骨格筋(Gastrocnemius)のタンパク質リン酸化をウエスタンブロットにより観察した。リン酸化 Akt(Ser473)は、8 週齢に比較して、55 週齢では、60%に低下していた。さらに、その下流の、FoxO1 や、S6K についてもリン酸化を確認したところ、それぞれ 52%, 27% への低下を認め、加齢により骨格筋の Akt 活性が減弱し、インスリンシグナルが減弱することを確認した(図 2)。序論に述べたような、これまでの報告を踏まえて考えると、このような加齢に伴う Akt 活性の低下はインスリン・IGF-1 シグナルの減弱により、骨格筋自身や全身に影響を与えている可能性が考えられる。本研究では、Akt 活性の低下が加齢変化に及ぼす影響を、遺伝子改変マウスを用いて検討することにした。

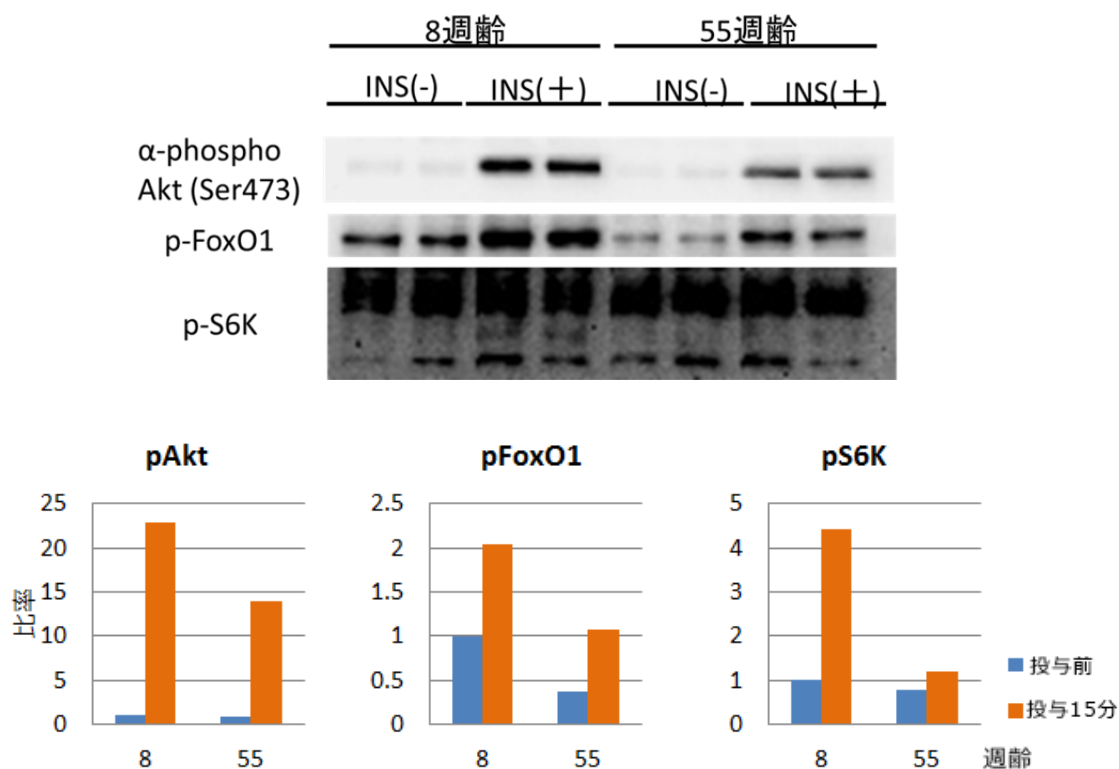


図 2. 8 週齢・55 週齢の C57BL/6 マウスにおける骨格筋インスリンシグナルの比較

8 週齢と 55 週齢の C57BL/6 マウスに対して、12 時間絶食状態で下大静脈よりインスリンを 1 個体あたり 20mU/g インスリンを静注。投与前と投与 15 分で腓腹筋(Gastrocnemius)のタンパク質リン酸化をウエスタンブロットにより確認した。さらにブロットの濃度を定量、8 週齢におけるインスリン投与前の濃度を 1 として、比率を計算しグラフにプロットした。

○骨格筋特異的に Akt1・Akt2 を欠損させた MLC1F-DKO マウス

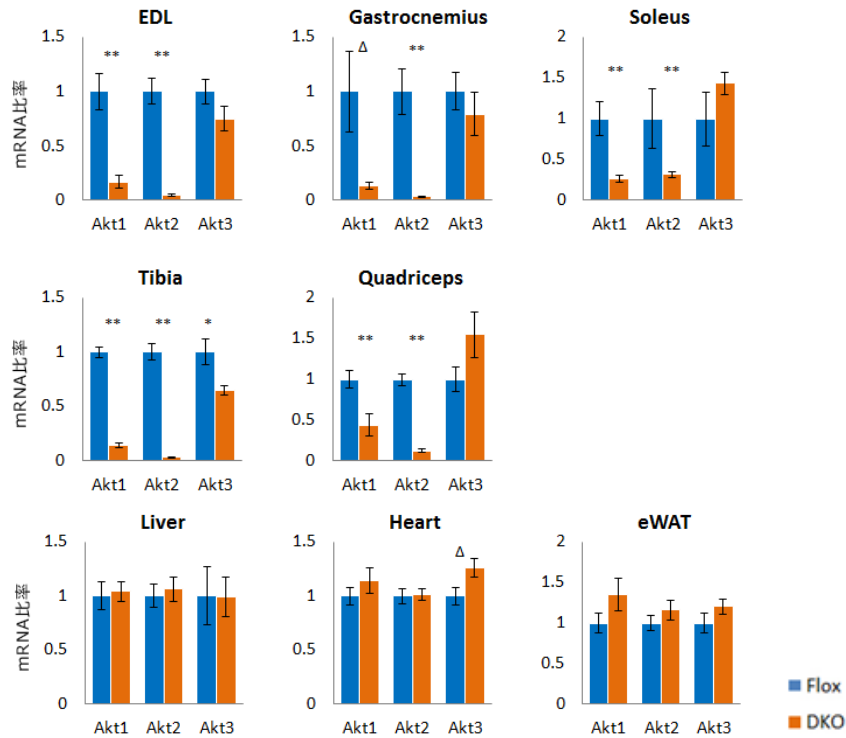
高週齢マウスに認められたような Akt 活性の低下した骨格筋の影響を検討するために、骨格筋特異的に Akt1・Akt2 を欠損させた Mlc1f-Cre(+/-) Akt1(loxP/loxP) Akt2(loxP/loxP) マウス (MLC1F-DKO) を作成した。この MLC1F-DKO マウスにおいて、骨格筋の Akt 発現が抑えられていることを確認するため、mRNA・タンパクの測定を行った。

8 週齢の時点で、下腿の様々な筋肉を用いて Akt の mRNA レベルでの発現量の変化を確認した(図 3a)。骨格筋は様々な Fiber Type の筋線維から構成されているが、それらの Fiber type は主に Type 1 と呼ばれる遅筋線維と、Type2 と呼ばれる速筋線維に大別することができる。Type 2 fiber が多く含まれる長趾伸筋に関しては、MLC1F-DKO マウスは Control と比較して Akt1、Akt2 の mRNA の発現がそれぞれ 15.8 %, 6.0 % に抑制されていることを確認した。また、Type1 fiber が多く含まれるヒラメ筋にてにおいても同様に、MLC1F-DKO マウスは Control と比較して Akt1、Akt2 の mRNA の発現が、26.7%、31.6%に抑制されていることを確認した。Type1 fiber や Type2 fiber の混合するその他の骨格筋に関しても同様に Akt1、Akt2 の mRNA 発現量は低下しており、Fiber type に関わらず、Akt1、Akt2 の発現量が低下しているものと考えられた。

また、Akt1、Akt2 の発現抑制がその後の週齢でも維持されていることを確認するために、16 週齢、24 週齢、32 週齢の長趾伸筋に関しても同様の測定を行った (図 3b)。Akt1、Akt2 の発現量は 8 週齢以降持続的に抑制されており、また、Akt1、Akt2 以外の Akt のアイソフォームである Akt3 には発現量にも若干の変化

は認めているが、全週齢を通して、59%(24 週)~128%(8 週齢)の発現変化であった。

(a)



(b)

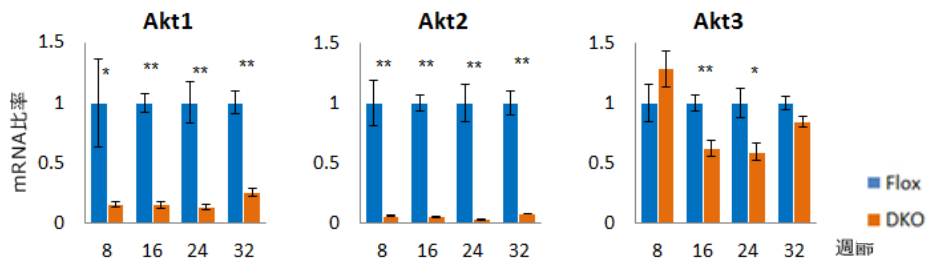


図 3. Flox, MLC1F-DKO マウスの各組織における Akt1・Akt2・Akt3 の mRNA 発現量

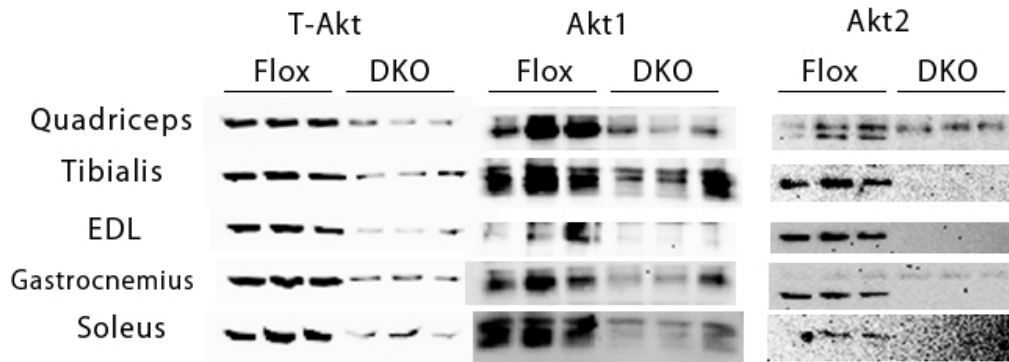
(a) Flox, MLC1F-DKO マウスの 8 週齢の下腿の 5 種類の骨格筋における Akt1, Akt2, Akt3 の mRNA レベルの発現量を測定。Flox マウスにおける発現量を 1 として、MLC1F-DKO の発現量の比をプロットした。8 週齢の肝臓、心筋、精巣上体脂肪体に対しても同様のグラフを作成した。(n=6vs6) (Quadriceps : 大腿四頭筋、Tibialis : 前脛骨筋、EDL : 長趾伸筋、Gastrocnemius : 腓腹筋、Soleus : ヒラメ筋、Liver : 肝臓、Heart : 心筋、eWAT : 精巣上体脂肪体) ** p < 0.01, * p < 0.05, Δ p < 0.1

(b) Flox, MLC1F-DKO マウスの各週齢の長趾伸筋(EDL)における、Akt1, Akt2, Akt3 の mRNA レベルの発現量の測定。各週齢の Flox マウスにおける発現量を 1 として、MLC1F-DKO の発現量の比をプロットした。(8 週齢 n=6vs6, 16 週齢 n=6vs5, 24 週齢 n=6vs6, 32 週齢 n=7vs5) ** p < 0.01, * p < 0.05, Δ p < 0.1

さらに Akt の総発現量を、タンパク質レベルでウェスタンブロットにより確認した。骨格筋においては、線維の種類に関わらず、コントロールマウスに比較して Akt 発現量は抑制されており、Type 2 線維を中心とした長趾伸筋(EDL)では 13.3%、Type 1 線維を中心としたヒラメ筋(Soleus) では 22.8 %、両方の筋線維の混在する腓腹筋(Gastrocnemius)では 23.5% に発現が抑制されていた。また、Akt1、Akt2 のそれぞれのアイソフォームにおいても同様に、筋線維の種類に関係なく、著明に抑制されていることが確認された(図 4a)。骨格筋以外の臓器についても、Akt 発現量の検討を行っているが、肝臓や、心筋などでは、総 Akt 量に変化は認めなかった(図 4b)。骨格筋においては、Akt3 はほとんど発現されていないと報告されており、MLC1F-DKO マウスにおいては、Akt1、Akt2 の低下により、総 Akt 量の低下を骨格筋組織で特異的に認めていると考えられた。

以上のように、MLC1F-DKO マウスにおいては、Akt1、Akt2 の発現量が Fiber Type の種類によらず、mRNA、タンパク質レベルで抑制されていることが確認された。

(a)



(b)

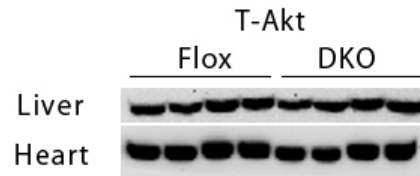


図 4. Flox, MLC1F-DKO マウスの各組織における総 Akt・Akt1・Akt2 タンパク質発現量

(a) Flox、MLC1F-DKO マウス(8 週齢)の骨格筋における総 Akt(T-Akt), Akt1, Akt2 の蛋白レベルの発現量の測定。ウエスタンブロットにより、各組織における総 Akt(T-Akt)、Akt1、Akt2 の発現量の検討をおこなった。(Quadriceps：大腿四頭筋、Tibialis：前脛骨筋、EDL：長趾伸筋、Gastrocnemius：腓腹筋、Soleus：ヒラメ筋)

(b) Flox、MLC1F-DKO マウス(8 週齢)の肝臓、心筋における総 Akt(T-Akt)の蛋白レベルの発現量の測定。ウエスタンブロットにより、各組織における総 Akt(T-Akt)の発現量の検討をおこなった。(Liver：肝臓、Heart：心筋)

○MLC1F-DKO マウスにおいて Akt 下流のインスリンシグナルの抑制

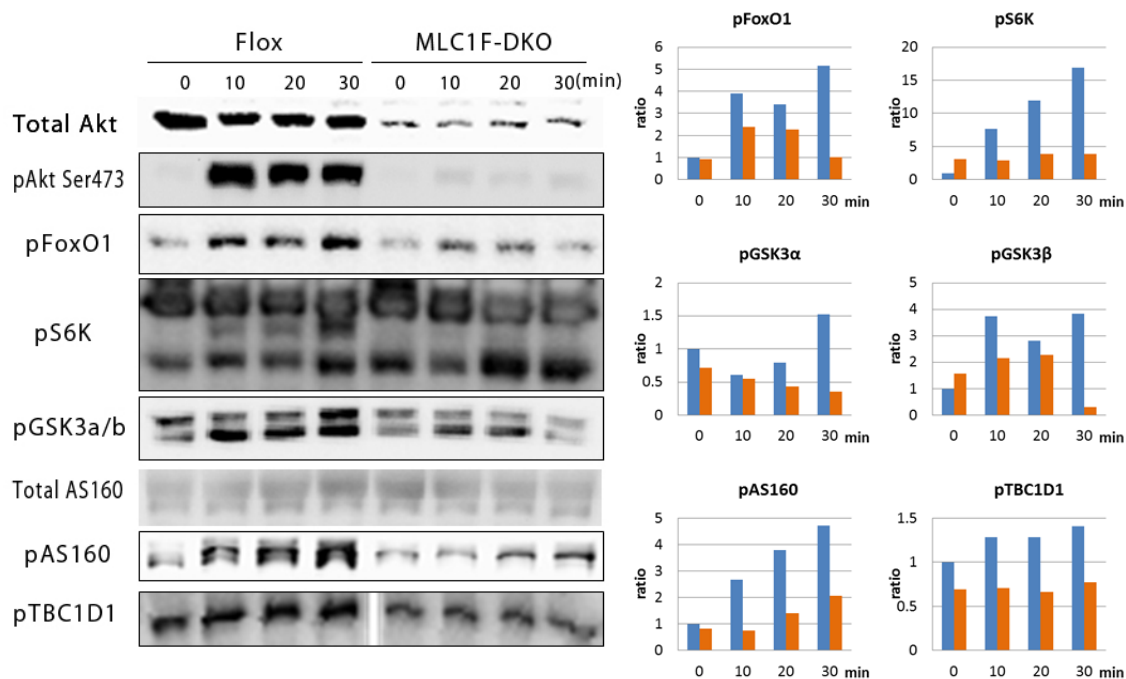
次に MLC1F-DKO マウスにおいて、Akt より下流のタンパク質へのインスリンシグナルの伝達が抑制されることを確認するために、下大静脈からインスリンを静注し投与直前、投与後 10 分 20 分 30 分の時点での骨格筋のタンパク質のリン酸化を、ウェスタンブロットを用いて測定し、8 週齢と 32 週齢において、インスリンシグナルの検討を行った。MLC1F-DKO では、8 週齢の時点で、コントロールに比較して、すでにインスリンシグナルの著明な減弱を認めた(図 5a)。8 週齢で既に、MLC1F-DKO マウスの Akt のリン酸化(Ser473)は、Control マウスと比較して、4%程度に非常に強く抑制されていた。その下流に位置する細胞や組織寿命に関与すると言われる転写因子の FoxO1 のリン酸化は、最も強くリン酸化を受ける 10 分後の時点で、約 61%に抑制されていた。さらに、タンパク質合成を促進する S6Kinase のリン酸化に関しても、30 分後の時点で約 23%に抑制され、GSK3 に関しても、30 分後の時点では、8~23%程度に強く抑制されていた。

AS160 のリン酸化は GLUT4 のトランスロケーションと、糖取り込みが起こるために重要な役割を果たすが、8 週齢の段階で、MLC1F-DKO では、Flox に比べて、30~40%程度への抑制を認めた。さらに、AS160 と同様に Akt による活性化部位を持ち、GLUT4 のトランスロケーションを引き起こすことが知られている、TBC1D1 に関してもリン酸化は 50~60%程度に抑制されていた。

さらに、32 週齢においても、このインスリンシグナルは、同様に低下していることを確認した(図 5b)。この結果より MLC1F-DKO では、若週齢~高週齢まで引き続きインスリンシグナルが Akt レベルで減弱していることが確認され、意

図したノックアウトマウスであることが確認された。

(a)



(b)

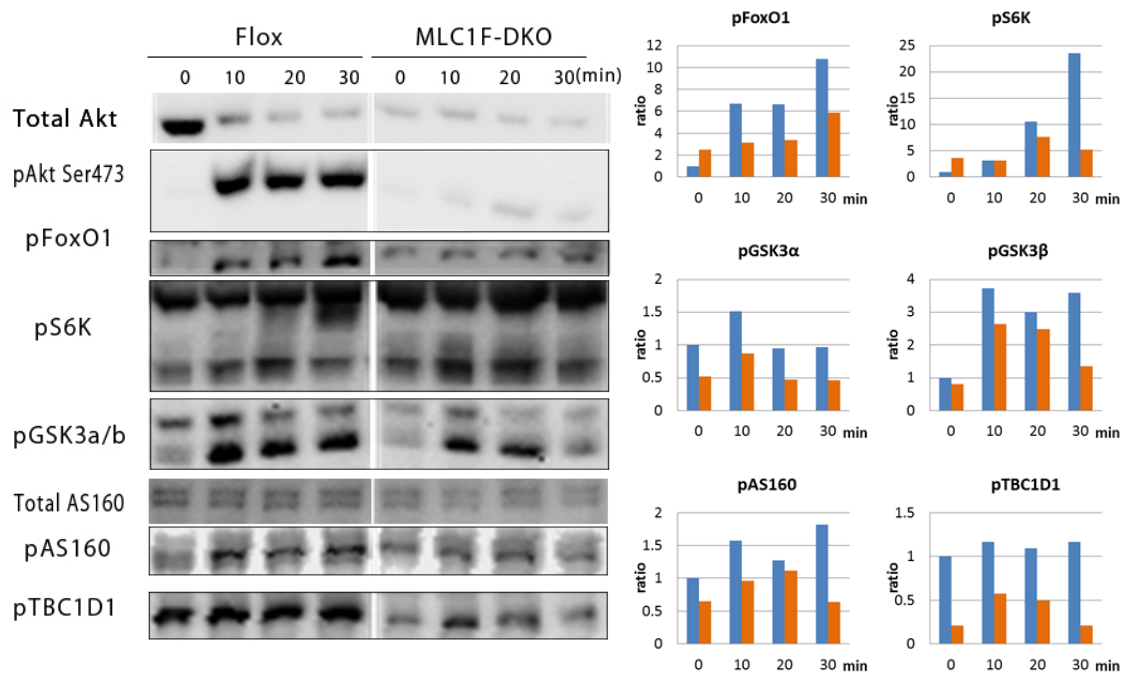


図5. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋(Gastrocnemius)のインスリンシグナル比較 (a) 8週齢 (b) 32週齢

前日夕より 12 時間絶食状態のマウスの下大静脈より、インスリンを 1 個体あたり 5 単位静脈注射。投与直前、10 分、20 分、30 分時点での、骨格筋 (Gastrocnemius) のタンパク質リン酸化をウェスタンブロッティングにより確認した。対象としたタンパク質はインスリンシグナルに存在する Akt, FoxO1, S6K, GSK3a/b, AS160, TBC1D1 である。(青: Flox、橙: MLC1F-DKO)

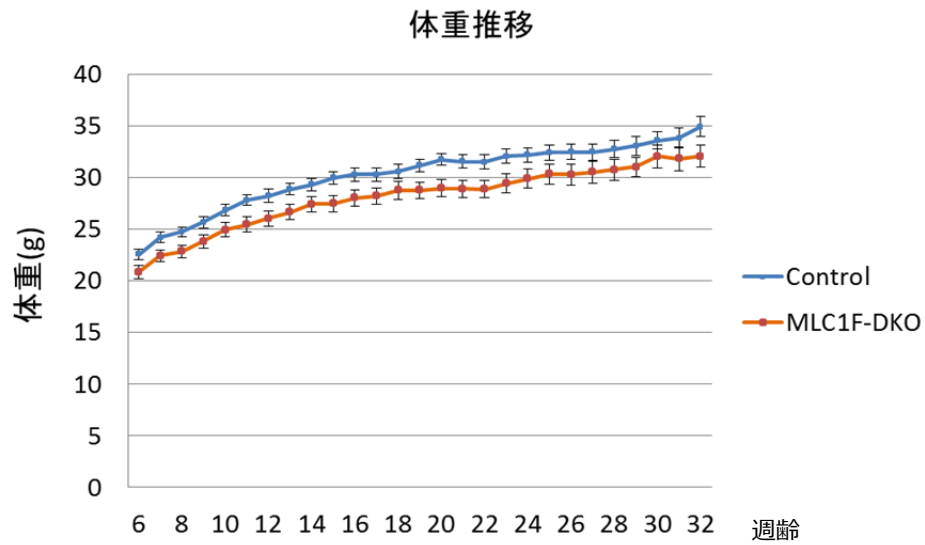
○**MLC1F-DKO** マウスにおいて体重の増加抑制や、筋肉量の増加抑制

次に MLC1F-DKO マウスとコントロールの Flox マウスの表現型の比較を行った。MLC1F-DKO マウスの成長を、体重や、筋肉量、脂肪量を測定することで、継続的に観察を行った。体重に関しては 6 週齢より測定を開始し、32 週齢まで観察を行った。全経過中、MLC1F-DKO マウスでは、Flox マウスに比べて 1.7～2.9g 程度の体重増加不良を認めた。観察開始の 6 週齢の時点で、すでに 1.7g 程度の体重差を認め (Flox 22.5 ± 0.50 , DKO 20.8 ± 0.60 (g))、その後、その傾向は持続し、32 週齢の時点でも体重差は 2.9g であった。(Flox 34.9 ± 0.96 , DKO 32.0 ± 1.0 (g)) (図 6a)

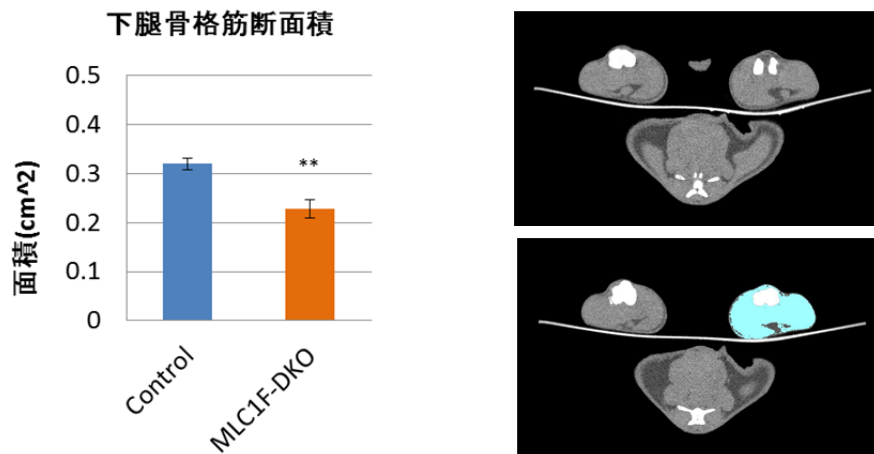
体重増加不良の原因組織を確認するために、CT により下腿の筋肉量の評価を行った(図 6b)。8 週齢の時点ですでに、MLC1F-DKO マウスでは、Flox マウスに比べて 29%の低下を認めていた。(Flox 0.32 ± 0.011 , DKO 0.22 ± 0.017 (cm²))

一方、脂肪組織量に関しては DEXA により評価を行い、全週齢にわたり MLC1F-DKO は Flox より多いことが確認された。特に 24 週齢より統計学的に有意な差を認め、その差は週齢が経つに従って増大する傾向にあった。(図 6c)

(a)



(b)



(c)

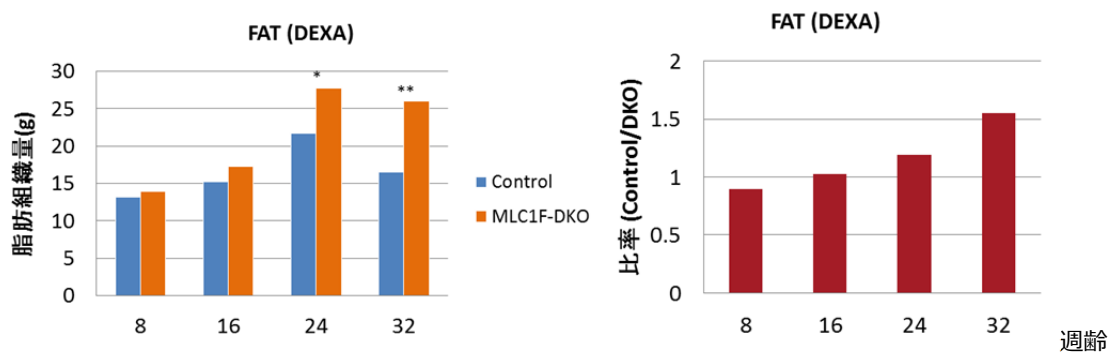


図 6. Flox, MLC1F-DKO マウスの成長の比較 (a)体重 (b)骨格筋 (c)脂肪組織

(a) 体重推移 週に1度の体重測定を、生後6週齢より、32週齢まで継続して測定した。(n=9vs9) (b) CTにより筋肉量の計測(8週齢) 下腿における断面積を比較した。(n=5vs5) (c) DEXAにより脂肪組織量を計測し比較した。(8, 16, 24, 32週)。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

○MLC1F-DKO マウスにおいて 32 週齢で筋細胞サイズの縮小

骨格筋量の減少の要因を検討するために、骨格筋の組織観察を行った。32 週齢の MLC1F-DKO マウス、Flox マウスの骨格筋を HE 染色(図 7a 上段)し、それぞれの筋線維のサイズを測定し分布を図示した(図 7b)。32 週齢において、Flox マウスに比べて、断面積は、平均で 37%にまで縮小していた(図 7a 上段)。このような一つ一つの、筋細胞サイズの縮小が、筋量の低下に寄与していると考えられた。さらに、マッソントリクローム染色では、MLC1F-DKO において、線維化が進んでいることが確認された(図 7b 下段)。

○MLC1F-DKO マウスにおいて運動量の低下

回転踏車と、床を備えたケージで、22 時間にわたってマウスの運動量を計測した。8 週齢の時点ですでに、MLC1F-DKO マウスでは、Flox マウスに比べて、回転車での運動量は 74.4%に抑制されていた (Flox 24317±4283, DKO 13090±4196 (カウント))。さらに、加齢とともに、全体的な運動量は低下するが、MLC1F-DKO の方がその傾向が強く、24 週齢においては、Flox に比べて 53.8%にまで低下していた(Flox 24317±4283, DKO 13090±4196 (カウント)) (図 8)。

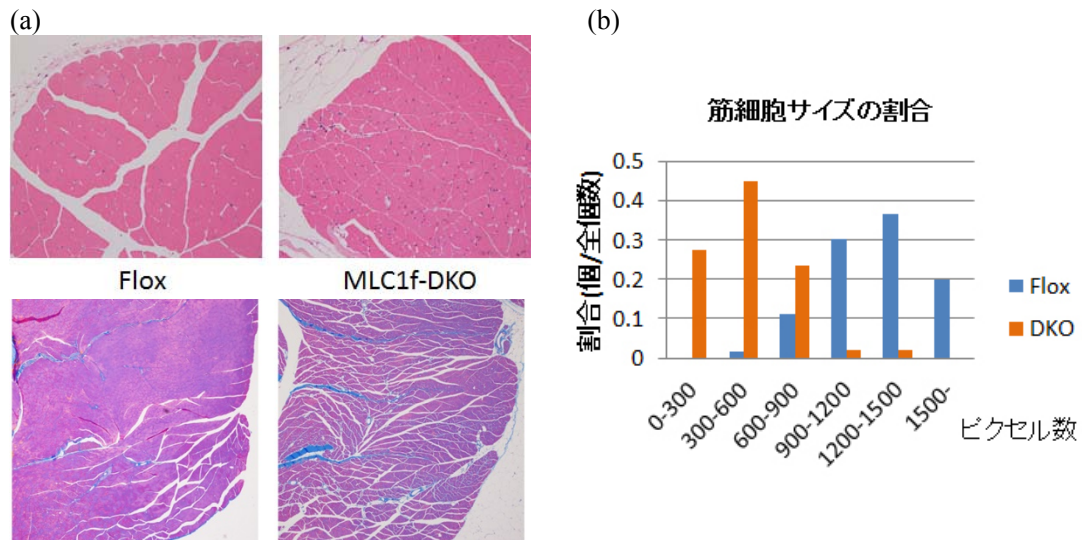


図 7. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋組織像比較と、筋細胞サイズの比較 (32 週齢)
 (a). 32 週齢における骨格筋組織 HE 染色(上)と、Masson trichrome 染色 (下) (Quadriceps)
 (b). 32 週齢における Flox と MLC1F-DKO の筋細胞の大きさを、それぞれの細胞を構成するピクセル数をカウントすることで計測。その分布を表した。

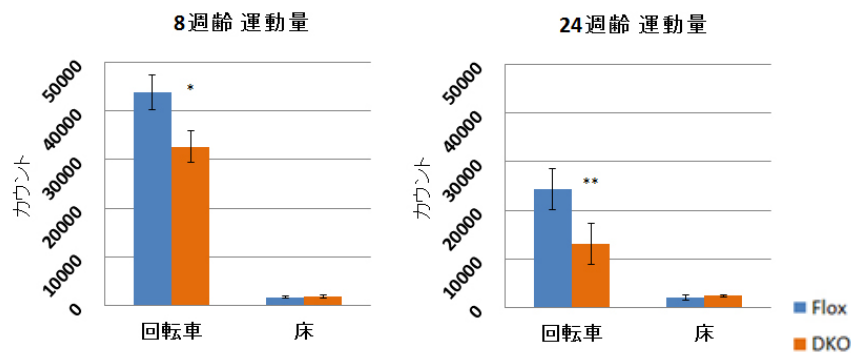


図 8. Flox, MLC1F-DKO マウスの運動量の比較
 8 週齢と 24 週齢において、マウスの運動量を計測した。AM10 時から AM8 時まで 22 時間 (Light cycle 11 時間、Dark cycle 11 時間を測定) のケージ内での動きをカウントした(n= 6vs6)
 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

○MLC1F-DKO マウスにおいて耐糖能異常の加齢に伴う増悪

次に、MLC1F-DKO マウスの耐糖能を、継時的に 8・16・24・32 週齢において、インスリン負荷試験(ITT)と 腹腔内ブドウ糖負荷試験(IpGTT)により解析を行った。(図 9) 前述のように骨格筋におけるインスリンシグナルが減弱しているにも関わらず、8 週齢の時点では ITT・IpGTT 共に、Flox マウスと MLC1F-DKO マウスの間に耐糖能の差を認めなかった。しかし 24 週齢以降において、ITT で投与 15 分以降の血糖降下に有意な差を認め、投与 30 分後では Flox マウスでは投与前の 52%にまで血糖値が低下する一方で、MLC1F-DKO マウスでは投与前の 73%までにしか低下せずインスリン抵抗性を認めた。また、インスリン投与後 60 分の時点での回復にも有意な差が認められた。

32 週齢の MLC1F-DKO マウスにおいては、ITT のみならず、IpGTT でも Flox マウスに比した耐糖能の悪化を認めた。32 週齢の IpGTT のインスリン分泌量は両者の間に差を認めないことから、インスリン感受性の低下、つまりインスリン抵抗性により MLC1F-DKO において耐糖能の悪化を生じていると考えられた。

このように、MLC1F-DKO マウスにおいては、24 週齢以降で加齢に伴うインスリン抵抗性の増悪を認める結果になった。

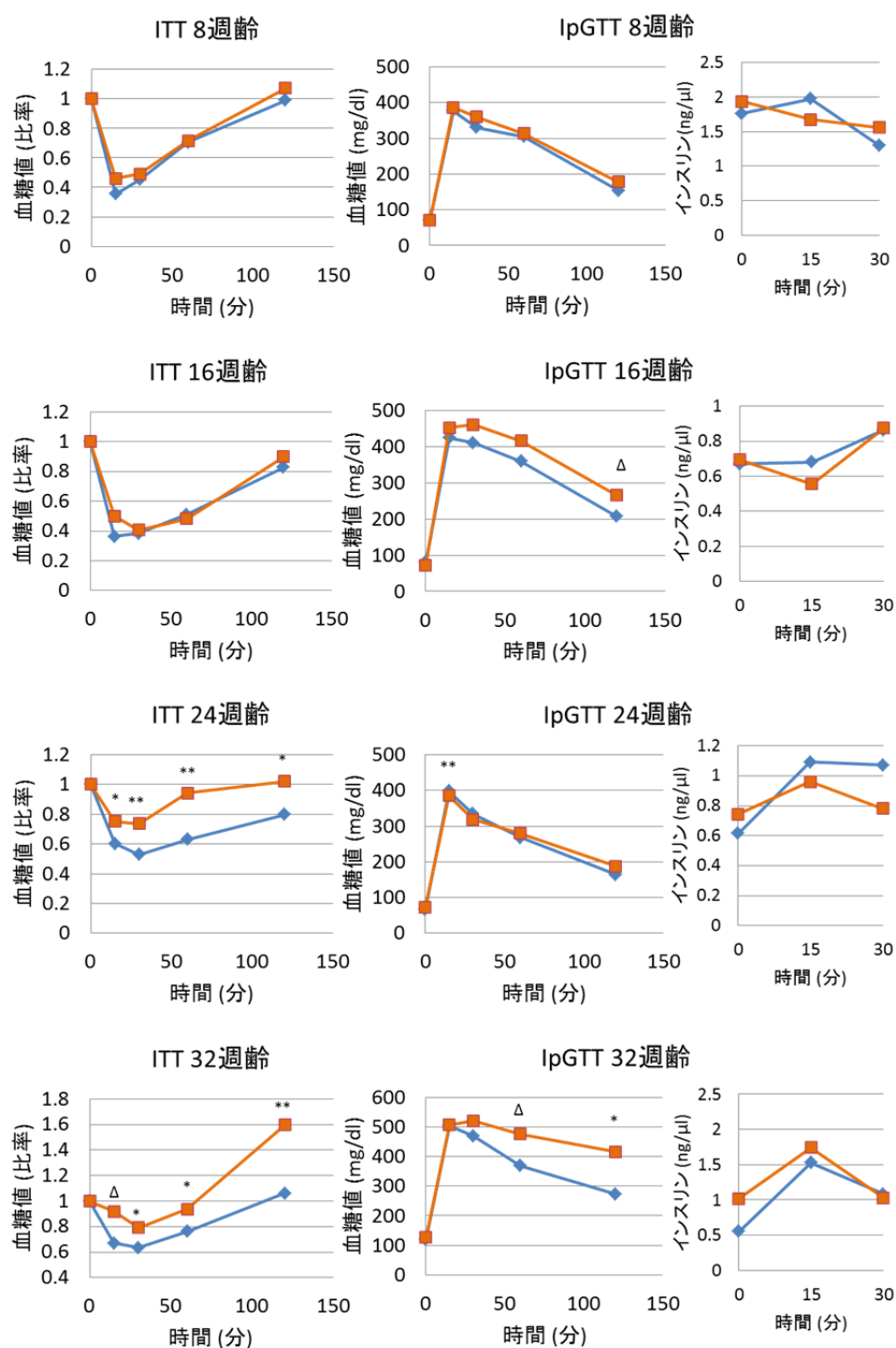


図 9. Flox, MLC1F-DKO マウスの耐糖能の 8~32 週齢の比較

Flox マウス、MLC1F-DKO マウスの 8 週齢、16 週齢、24 週齢、32 週齢において、インスリン負荷試験、グルコース負荷試験を施行し、各週齢で Flox と MLC1F-DKO マウスの耐糖能の比較を行った。ITT に関しては、開始前(0 分値)を 1 とし、各時間の血糖値をその比率で表した。IpGTT に関しては、血糖値に加え、インスリン値をプロットした。(8,16,24,32 週齢 n=5vs5) ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $\Delta p < 0.1$

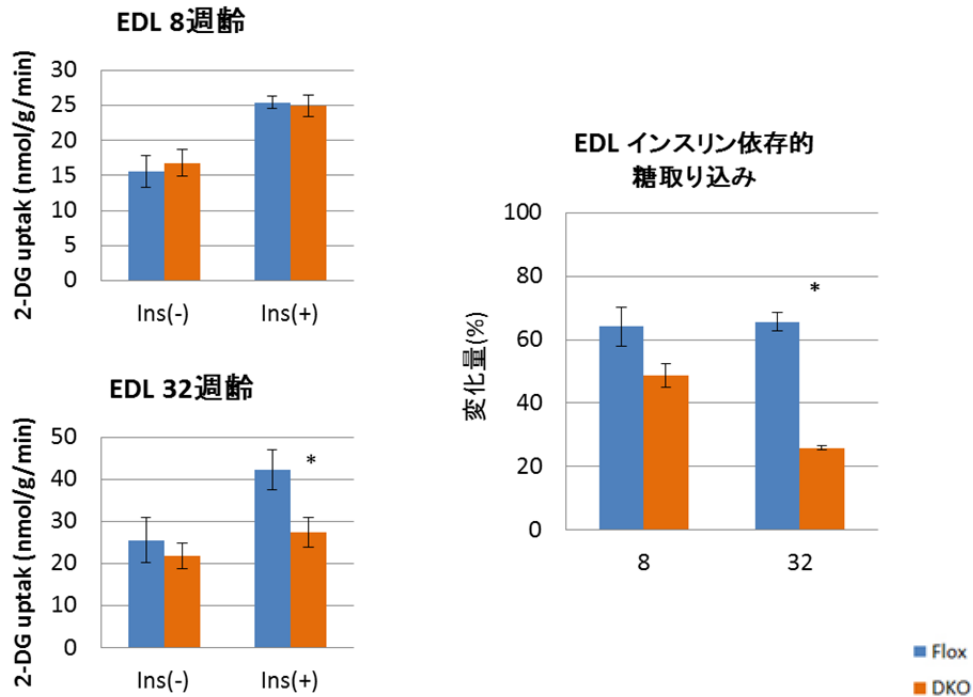
○MLC1F-DKO マウスにおいて高週齢で筋肉への糖取り込みの低下

次に、末梢での耐糖能異常の原因が骨格筋にあることを確かめるために、単離した骨格筋線維への 2-デオキシグルコースの取込み量を測定し、インスリン依存的な糖取り込みの能力を確認した。(図 10) 8 週齢の時点では、長趾伸筋(EDL)において、Flox、MLC1F-DKO マウスともに、インスリン依存的な糖取り込みは良好であり、インスリン刺激に伴う変化量は 64%と 48%であったが、32 週齢においては 65%と 25%であり、MLC1F-DKO マウスで低下を認めた(図 10a)。また、32 週齢においては統計学的な有意差も認めている。

ヒラメ筋(Soleus)においても同様の変化を認めており(図 10b)、8 週齢の時点では、Flox、MLC1F-DKO マウスともにインスリン依存的な糖取り込みは良好であり、インスリン刺激に伴う変化量は 65%と 85%であったが、32 週齢においては 55%と 34%であり、MLC1F-DKO マウスで低下を認めた。また、32 週齢においては統計学的な有意差も認めている。

この結果は、ITT や IpGTT の耐糖能試験において、24 週齢以降で耐糖能異常が顕著になってきたことと矛盾しない結果であり、MLC1F-DKO マウスにおいて、加齢に伴うインスリン依存的な骨格筋の糖取り込みの悪化が、通常よりも進行していると考えられた。

(a)



(b)

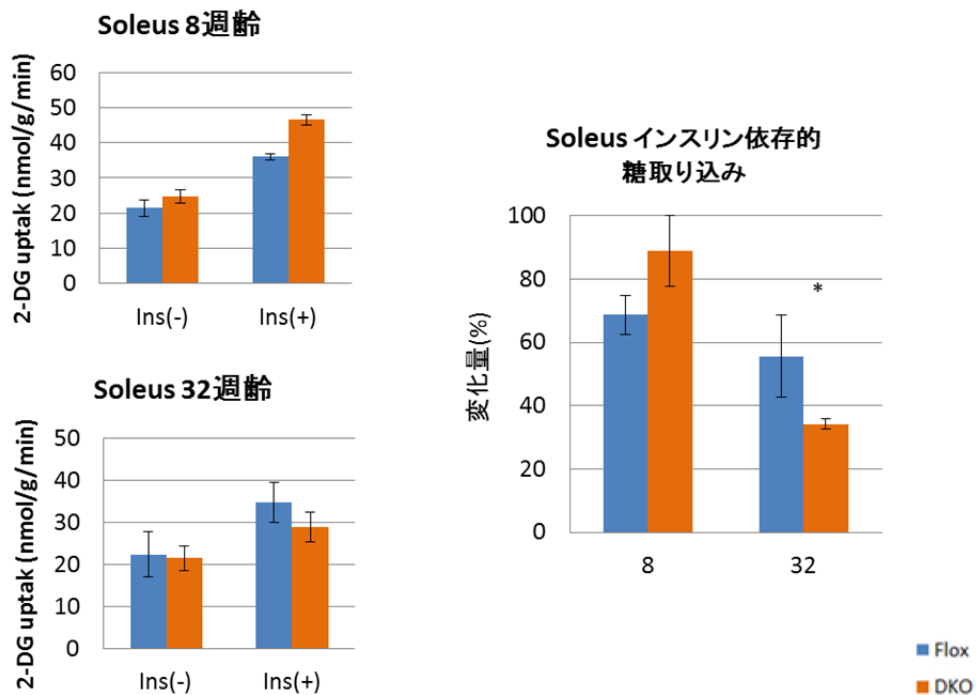


図 10. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋糖取り込みの比較

Flox と MLC1F-DKO の単離骨格筋線維にたしてインスリン刺激なしと、インスリン刺激ありの状態での 2-DG の取込み量を測定した。さらに、インスリン刺激なしの状態の 2-DG 取込み量を 1 とし、両者の差の比率を計算し、それをインスリン依存的な 2-DG 取り込み量として比較を行った。同様の実験を、(a)EDL(長趾伸筋)と(b)Soleus(ヒラメ筋)に対して施行した。(INS(-) : INS(+) : n=5vs5) ** p < 0.01, * p < 0.05

○MLC1F-DKO マウスにおけるミトコンドリア機能

ここまでの結果において、MLC1F-DKO マウスという Akt レベルで骨格筋のインスリン抵抗性を惹起したマウスにおいて、骨格筋量の変化や、加齢に伴う筋線維の糖取り込み量低下や、加齢に伴う全身の耐糖能の悪化を認めた。今回は、その変化の原因の一つとしてミトコンドリアの機能に着目した。というのも、ミトコンドリアは加齢に伴い異常が蓄積するオルガネラであるといわれており[33]、また、ミトコンドリア機能異常と耐糖能には関連があると報告されているためである[34]。

ミトコンドリアは細胞内において主に電子伝達系により ATP の産生を行うオルガネラである。細胞内に取り込まれた脂肪酸は、ミトコンドリア外膜において、アシル CoA シンテターゼ (acyl-CoA synthetase)の働きにより、脂肪酸アシル CoA となり、さらに、ミトコンドリア膜内に移行するために、CPT(carnitine acyltransferase)の働きにより、一旦、脂肪酸アシルカルニチンに変換され、その後再び、脂肪酸アシル CoA に戻るという反応を行い膜を通過する。その後、 β 酸化、TCA サイクル、電子伝達系を介して、ATP 産生が行われる[35]。そのため、ミトコンドリア機能の低下は、ATP 産生量の減少や、ミトコンドリア酸化能低下による筋細胞内脂質の増加を引き起こしうる[36]。

MLC1F-DKO マウスにおいては、骨格筋内 ATP 量に関して、8 週齢の段階では、Flox マウスに比較して含有量が多いが、その後継時的な減少をみとめ、32 週齢においては、Flox マウスの約 67%にまで抑制されていた(図 11)。

また、8 週齢・32 週齢において組織重量あたりの中性脂肪含量を測定したところ、MLC1F-DKO マウスでは Flox マウスに比較して、8 週齢では有意な差は認めないものの、32 週齢では筋肉組織内の中性脂肪含量の増加を認めた(図 12)。

さらにミトコンドリアにおいて行われる β 酸化を促進する因子の発現を調節する PPAR α [34]の発現量は、8 週齢より約 50~60%に低下を認めた。上記で述べたような β 酸化のための脂肪酸輸送に関わる酵素の発現量に関しても、ACS は 27%、CPT1b は 60~70%は、CPT2 は 35~45%に抑制されており、 β 酸化関連遺伝子の発現量が低下していることを確認した(図 13)。

これらの骨格筋 ATP 量の低下、中性脂肪含量の増加、 β 酸化関連遺伝子の発現低下はミトコンドリア機能の低下を示唆する所見であると考えられる。また ATP 量と中性脂肪含量の変化に関しては、8 週齢では顕著でなく、その後加齢に伴い顕在化しており、MLC1F-DKO マウスのミトコンドリア機能の低下が加齢に伴い顕在化している可能性が考えられた。

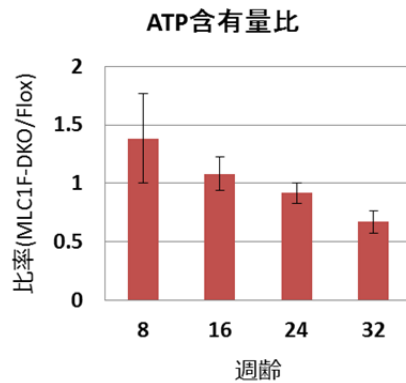


図 11. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋における ATP 含有量の比較

8・16・24・32 週齢の骨格筋(Quadriceps)において、単位重量あたりの ATP 含量を測定し、その比率を計算しプロットした。(n=6vs6)

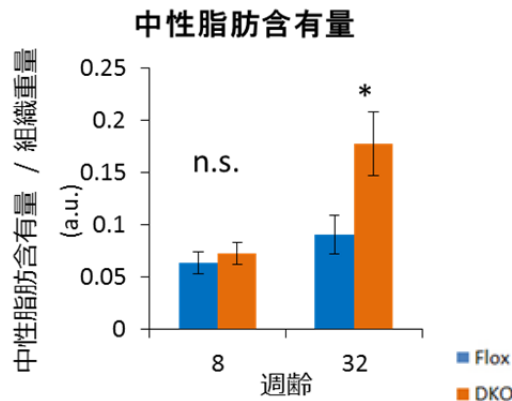


図 12. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋内中性脂肪含量の比較

8 週齢と 32 週齢における、骨格筋内(Quadriceps)中性脂肪含量の測定。(n= 6vs6) ** p < 0.01, * p < 0.05

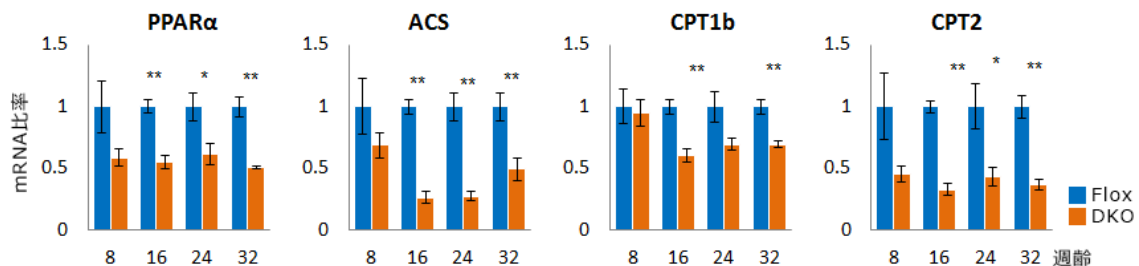


図 13. Flox, MLC1F-DKO マウスの β 酸化関連遺伝子の発現比較

8・16・24・32 週齢の骨格筋(EDL)において、 β 酸化に関連する遺伝子群の mRNA レベルでの発現量を測定、Flox マウスにおける発現量を 1 として、MLC1F-DKO の発現量の比をプロットした。(8 週齢 n=6vs6, 16 週齢 n=6vs5, 24 週齢 n=6vs6, 32 週齢 n=7vs5) ** p < 0.01, * p < 0.05

○骨格筋におけるミトコンドリア関連遺伝子発現の変化

次に、ミトコンドリア機能の低下を引き起こしうる遺伝子変化について検討を行った。ミトコンドリアは生合成された後、ミトコンドリア自身の電子伝達系から生じる酸化ストレスにより徐々に傷害を受けているとされている。また、ミトコンドリアはその機能やネットワークの維持のために、融合(Mitofusion)・分裂(Mitofission)を繰り返していると考えられている[37]。

ミトコンドリアの生合成に大きな影響を及ぼす PGC1 α に関しては、有意な変化は認められなかったが、PGC1 α により発現調整を受けるミトコンドリア DNA の複製や翻訳に関わる Nrf1[38]や、mtTFA[39]といった遺伝子の発現量の低下を認めた。これらの変化は、特に 16 週齢以降で顕著になり、共に 50%程度に発現が抑制されていた。

一方で、ミトコンドリアの傷害につながる酸化ストレスを除去する働きをする、catalase や sod2 に関しては、8 週齢の段階よりそれぞれ、64%、60%へ発現低下を認めていた。MLC1F-DKO マウスにおいては、酸化ストレスが増加し、ミトコンドリア傷害が増大している可能性が考えられた。

ミトコンドリアの融合(Mitofusion)には、ミトコンドリア外膜に存在する Mfn1/2 や、内膜に存在する Opa1 や PARL が機能する必要があるとされているが、MLC1F-DKO マウスにおいては、コントロールに比較して、16 週齢以降では Mfn1 で 40%程度、Mfn2 で 35%程度、PARL で 60~70%程度、OPA1 では 35%程度に発現が抑制されていた。

このように、骨格筋のミトコンドリア機能維持に関わる様々な遺伝子の発現低下を認めており、MLC1F-DKO マウスにおいては、これらの遺伝子変化がミトコンドリアの機能低下につながっている可能性が考えられた。

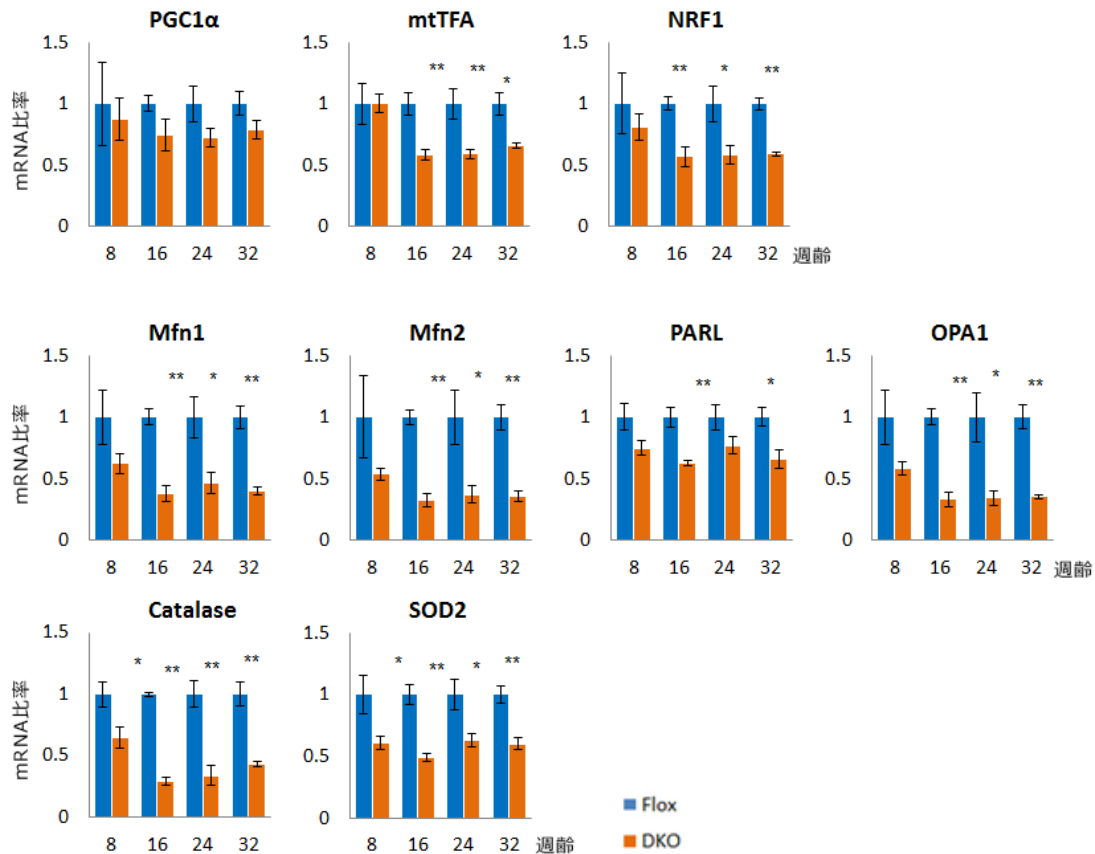


図 14. Flox, MLC1F-DKO マウスの骨格筋における遺伝子発現の変化
8・16・24・32 週齢の骨格筋(EDL)において、ミトコンドリアに関連する遺伝子群や、酸化ストレス遺伝子の mRNA レベルでの発現を測定し比較した。(8 週齢 n=6vs6, 16 週齢 n=6vs5, 24 週齢 n=6vs6, 32 週齢 n=7vs5) ** p < 0.01, * p < 0.05

○野生型 B6 マウスの高週齢において、ミトコンドリア・ β 酸化関連遺伝子の発現低下

最後に、これまで評価を行ってきた MLC1F-DKO マウスと老化との間の関係を調べるために、C57BL/6J マウスの弱週齢(8 週齢)と高週齢(55 週齢)骨格筋のミトコンドリア関連遺伝子・ β 酸化関連遺伝子の発現変化を測定した(図 15)。

骨格筋(EDL)における、ミトコンドリア関連遺伝子や、 β 酸化に関連する遺伝子の発現変化を mRNA レベルで確認した。8 週齢のマウスと比較して、55 週齢では、PPAR α や PGC1 α はそれぞれ 34%, 36%への低下を認めた。また、mitofusion に関わる Mfn2 は 46%に低下していた。さらに、 β 酸化に関わる、CPT1b は 65%, CPT2 は 70%, CD36 は 44%といずれの遺伝子も発現低下を認めた。

これらの遺伝子発現変化は、MLC1F-DKO マウスで認めた変化と同様の変化であり、MLC1F-DKO マウスの遺伝子発現変化との間には関連がある可能性が考えられた。

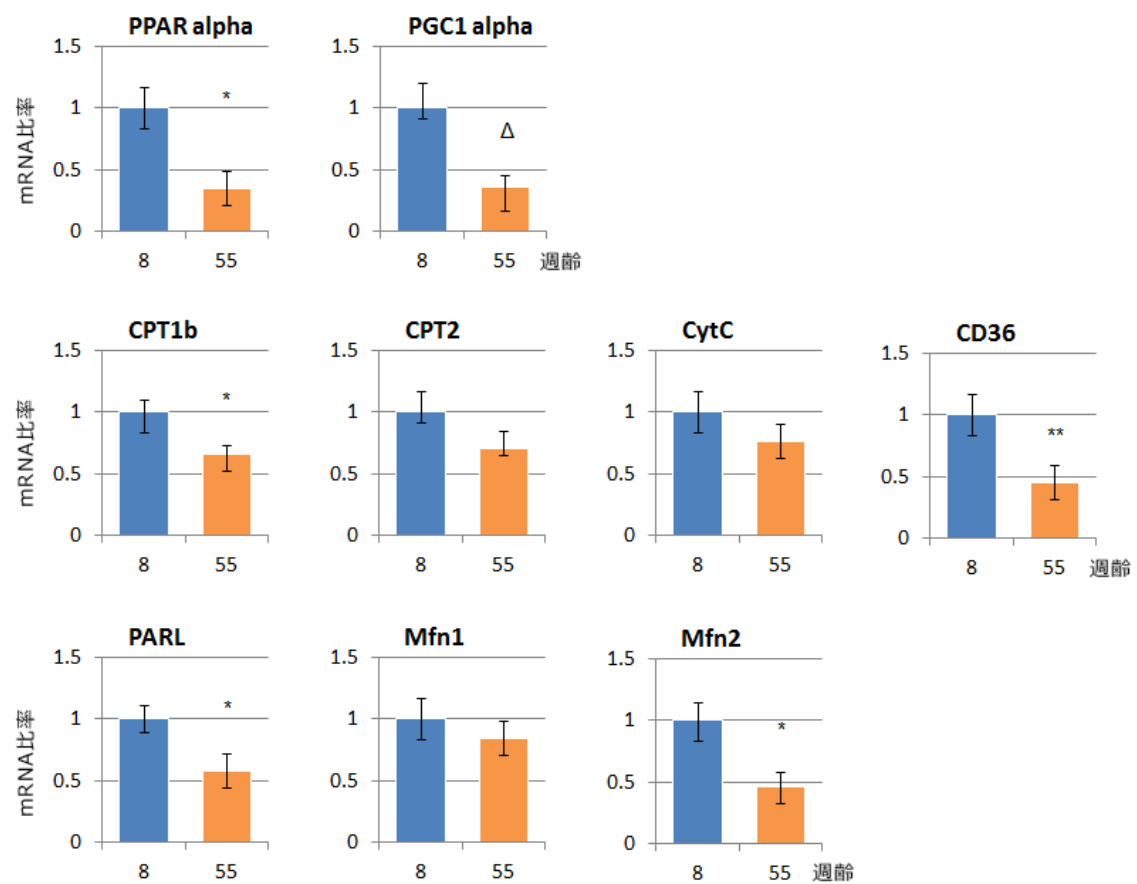


図 15. 弱週齢と高週齢マウスの骨格筋における遺伝子発現の比較

野生型 B6 マウスの骨格筋(EDL)におけるミトコンドリア・ β 酸化関連遺伝子の mRNA レベルでの発現量を測定。8 週齢(弱週齢)と 55 週齢(高週齢)の比較を行った。 β -actin の発現量により補正を行ったうえで、8 週齢の値を 1 としてその比率をプロットした。(n=8vs4)

** p < 0.01, * p < 0.05, Δ p < 0.1

5. 考察

本研究では、骨格筋における Akt が、全身の耐糖能や骨格筋量の維持に重要な役割を果たしていることが確認された。さらに弱週齢(8 週齢)では顕著でなかった耐糖能変化や、単離骨格筋における糖取り込みが、高週齢(32 週齢)で障害され悪化を認めたことからわかるように、骨格筋の Akt の生理的な役割は、直接的な糖取り込みの調節というよりも、加齢に伴い生じる細胞内や全身の変化に影響を与えており、結果として全身の耐糖能や骨格筋機能に影響を与えたものと考えられた。

本研究以前にも、骨格筋のインスリンシグナルの作用に関しては、筋肉特異的なインスリンシグナルや、糖取り込みに作用する遺伝子のノックアウトマウスが作成され研究が行われている。骨格筋特異的な GLUT4 のノックアウトマウス(MG4KO マウス)では、早い段階(8 週齢)で、糖取り込みの悪化と、全身の耐糖能悪化を認め、糖尿病状態になることが報告されており、骨格筋における GLUT4 による糖取り込みが全身の耐糖能に強い影響を及ぼすことが確認されている[40, 41]。一方で、筋肉特異的なインスリン受容体ノックアウトマウス(MIRKO)の研究においては、骨格筋のインスリンシグナルが、直接的に全身の糖代謝に影響を与えるわけではないという報告[25]が行われており、本研究結果と近いものであった。MIRKO マウスでは、インスリン受容体が通常の 5%程度まで低下しており、インスリンシグナルの減弱や、単離骨格筋におけるインスリン依存的な 2-DG の取込みの 75%程度の悪化を認めたが、4 か月の時点で全身の耐糖能への

影響は認められなかった。このようなMG4KOとMIRKOマウスの結果の違いは、骨格筋の糖取り込みは全身の耐糖能に大きな影響を与える一方で、骨格筋のインスリンシグナルのみでは全身の耐糖能にはあまり影響を与えることができないことを意味する。本研究のMLC1F-DKOマウスの結果も、これまでの報告を支持する結果であり、弱週齢において糖代謝異常を認めなかったのは、インスリンシグナル以外の糖取り込みシグナルもまた、全身の糖代謝に重要な影響を持っているためであると考えられる。このようなシグナルの例としては、筋収縮に伴う糖取り込みシグナルや、エネルギー状態を感知して糖取り込みを引き起こすシグナルなどが考えられる。

一方で、MLC1F-DKOマウスにおいては、ITTやIpGTTの結果より加齢に伴って全身の耐糖能の悪化を認めるという特徴的な変化を認めた。この現象は弱週齢では認められないため、骨格筋自身や全身に二次的な変化を引き起こすことにより生じる変化と考えられた。本研究ではこのような変化にミトコンドリアが関わっているのではないかと考えた。というのも、ミトコンドリアは加齢に伴い異常が蓄積するオルガネラであるといわれており[33]、また、ミトコンドリア機能異常と耐糖能には関連があると報告されているためである[34]。

ミトコンドリアの機能低下がインスリン抵抗性に影響を与えるという報告はこれまでから数多く行われてきている。Simoneauら[42]はインスリン非依存糖尿病患者を対象とした研究で、ミトコンドリアに依存する骨格筋における酸化能(oxidative capacity)はインスリン感受性と相関しているという報告を行っている。

Petersen ら[34]はまた、肥満のない健康な若年者から、2 型糖尿病患者の子供でありインスリン抵抗性のある群(BMI:23±2, Age:26±7)と、インスリン感受性のよい群(BMI:21±2, Age:28±7)を作り、両群に対して耐糖能やミトコンドリア機能の評価を行った。糖取り込みに関しては、Hyperinsulinemic-euglycemic clamp 試験を用い、酸化的リン酸化能や、筋細胞内脂質に関しては MRS(magnetic resonance spectroscopy)を用いて測定を行った。結果、酸化的リン酸化能は 30%の低下を認め、インスリン依存的な筋の糖取り込みは 60%低下、筋細胞内脂質含量(IMCL)は 80%の増加を認めた。若年を対象とした研究であり、加齢や環境因子といったミトコンドリア量を調整しうる因子の影響を極力排除しており、インスリン抵抗性と、筋肉内脂肪酸代謝の異常や、ミトコンドリア酸化的リン酸化能の異常の間には強い関連があることを示す研究であると考えられる。

さらに、高齢者における耐糖能の悪化に関しても、それらがミトコンドリア機能と関わりがあることについても報告が行われている。Petersen ら[43]は、体重・BMI(23.8±1.1, 25.1±0.5)や脂肪量(28±3, 29±2(%FAT))を揃えた、若年者(27±2 才)と高齢者(70±2 才)に対して、経口糖負荷試験と Hyperinsulinemic-euglycemic clamp 試験による耐糖能、インスリン抵抗性の評価、NMR spectroscopy による筋細胞内脂質含量(IMCL)、ミトコンドリア酸化能(TCA flux rate)、リン酸化能(ATP synthesis rate)の評価を行った。結果、高齢者においてはインスリン分泌量が増加する一方で、負荷後血糖値は AUC で 17%程度の有意な悪化を認め、さらに、高齢者において約 40%の末梢での糖取り込み悪化を認めた。ヒラメ筋を用いた MRS による検討では、高齢者では、筋細胞内脂質含量は 45%程度の増加を認め、

ミトコンドリア酸化能、リン酸化能に関しても、40%程度の低下を認めた。この結果は、加齢における耐糖能異常にミトコンドリア機能異常が関連していることを示唆すると考えられる。また、この結果は、様々な年齢の被験者から採取した骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能を評価した研究において、加齢に伴いミトコンドリア呼吸鎖を構成する酵素活性の低下を確認した報告[44]にも合致した結果であった。今回の MLC1F-DKO マウスにおいて、加齢に伴いミトコンドリア機能異常を示唆する ATP 産生量低下・筋内脂肪量増加と、インスリン抵抗性が悪化したことは、このような加齢変化に似た現象が起きているのではないかと考えられた。

このような加齢に伴う骨格筋ミトコンドリアの機能の低下の原因は、一つに酸化ストレスによるミトコンドリア DNA 傷害の蓄積によるものと考えられている[45]。そもそもミトコンドリア内膜は細胞内で最も活性酸素(ROS)を生じる場所である。ミトコンドリア DNA はミトコンドリア膜の近くに存在することや、ヒストンタンパクに保護されていないこと、さらに修復機構が核 DNA と異なることなどから、ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べて変異が多く蓄積されていると報告されている[46, 47]。経年的にミトコンドリア DNA 傷害が蓄積されることにより、ミトコンドリア機能低下が起こり、それに伴う細胞内脂質蓄積や、インスリン抵抗性が引き起こされることが考えられている。実際、酸化ストレスが軽減されれば、加齢によるミトコンドリア機能の悪化は防がれるという報告が行われている。例えば、酸化ストレスを軽減する catalase 遺伝子を骨格筋において特異的に過剰発現させた MCAT マウス[48]においては、加齢に伴う ATP 産生

能低下は 30%減弱しており、さらに筋内脂質含量の増加の抑制や、ミトコンドリアの形態維持を認めた。逆に、MnSOD を骨格筋において特異的に欠損させたマウス[33]において、ミトコンドリアの機能低下を認めたことが報告されている。本研究において、MLC1F-DKO マウスにおいて、catalase や MnSOD(SOD2)の発現低下を認めたことは、酸化ストレスの増加を引き起こし、加齢に伴うミトコンドリア機能低下を引き起こした可能性が考えられる。

さらに、近年ミトコンドリアにおいては Mitofusion や Mitofission といったミトコンドリア間での融合や分裂を起こすことで、その機能維持を行っていることが知られるようになっている[49, 50]。哺乳類においてはミトコンドリアの融合には 3 つの膜貫通型 GTPase タンパク質が重要であると考えられている。そのうち Mfn1, Mfn2 は外膜に存在、OPA1 は内膜に存在しており、これらの機能異常は、発生異常や神経疾患の原因になっていることが知られている[51-54]。さらに、骨格筋における Mitofusion 遺伝子は、骨格筋特異的な Mfn1・Mfn2 ダブル欠損マウス(MLC-Cre/dm)の報告[55]により、ミトコンドリア機能の維持に重要であることが、明らかになっている。MLC-Cre/dm マウスは著明な筋萎縮を呈し生後 6~8 週での致死を認めている。ミトコンドリアの形態に関しても、野生型に比べ大きく球形に変形する異常を認め、細胞中の mtDNA/nDNA 比の加齢に伴う低下を認め、7 週齢頃には野生型の 10 分の 1 以下(Control:3500, MLC-Cre/dm:250 (copies of mtDNA per nuclear genome))に低下していた。さらに、ミトコンドリア DNA のシーケンシングを行うことにより mtDNA 変異数を捉えた実験では、MLC-Cre/dm において Control に比較して有意な変異の増加を認めた。

MLC1F-DKO マウスにおいても、Mitofusion 遺伝子の発現低下を認めており、ミトコンドリアの形態異常、ミトコンドリア遺伝子傷害の蓄積とそれに伴うミトコンドリア機能の低下が引き起こされた可能性がある。

また、Mitofusion の低下は、耐糖能の悪化だけでなく筋萎縮の原因になっていると報告されている。このことは、前述の Mitofusion を阻害した Mfn1・Mfn2 ダブル欠損マウスにおいて著明な筋萎縮を認めたことから明らかである。加えて、MLC1F-DKO マウスの場合、筋萎縮は Akt レベルで IGF-1 シグナルが障害されていることも一因であると考えられる。このことは、序論で述べた骨格筋特異的な IGF1 受容体欠損マウスや GH 受容体欠損マウスのような IGF-1 シグナルが障害されているマウスで筋量の低下を認めたことから支持される。

以上をまとめると、骨格筋特異的に Akt の発現を低下させた MLC1F-DKO マウスにおいては、抗酸化ストレス関連遺伝子の低下や、Mitofusion 関連遺伝子の低下を認め、それらと関連したミトコンドリア機能低下を生じている可能性が考えられた。同時に、加齢に伴う糖取り込みの悪化や、骨格筋量の低下、運動量の低下、脂肪組織量の増加などを認めたため、これらの変化と骨格筋の Akt やミトコンドリア機能の間には関連があるのではないかと考えられた。また、これらの表現型は、加齢において一般に認められる変化に共通することから、骨格筋の Akt がそのような加齢変化の調整に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

このような考察から、骨格筋の Akt 活性を正常に維持することが、高齢者における耐糖能や筋力維持に重要であると考えられる。特に近年、サルコペニア肥満と呼ばれる、肥満・インスリン抵抗性に、筋萎縮(サルコペニア)が合併した病態が提唱されている。この病態においては、通常、高齢者に認められる筋萎縮よりも、ADL の低下につながりやすいという報告がある[13]。また、握力の低下とインスリン抵抗性の間に相関を見た研究[56]、糖尿病患者において下肢筋力の低下が進みやすいという報告[12] もこの結果を支持するものである。さらには、この筋萎縮(サルコペニア)と肥満が相互に影響し、インスリン抵抗性や、心血管障害などの重要なリスクとなっている可能性が示されている[57, 58]。今回の結果や考察を踏まえて考えると、サルコペニア肥満においては、肥満により惹起される骨格筋のインスリン抵抗性が骨格筋のミトコンドリア機能低下、筋萎縮、全身の肥満や糖代謝悪化を促進している可能性が考えられる。このような肥満・インスリン抵抗性と、筋萎縮の相互作用を断つ、あるいは予防するためには、Akt 活性を適度に維持することが非常に重要であると考えられる。Akt 活性を維持するためには、インスリン抵抗性が生じないようにすることが必要であり、肥満予防、過剰な脂肪摂取を避け、身体活動度を維持することが必要である。

今後の研究においては、今回の結果では不明瞭なミトコンドリアの機能や形態そのものを確認し、骨格筋の Akt がミトコンドリアに及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。また、Akt の下流でミトコンドリアに変化を与える経路を明らかにする必要がある。その経路を明らかにし正常化できれば、高齢者

の耐糖能改善や筋力維持に結び付けることができる可能性がある。Akt の下流でミトコンドリア機能を調節しうる経路としては、これまでの報告より mTOR や FoxO を介した経路が挙げられる。mTOR は YY1-PGC-1 α の転写調節を介してミトコンドリア機能を調節することが報告されている[59]。また、FoxO は、FoxO1 を骨格筋で特異的に過剰発現した FOXO1 トランスジェニックマウスにおいて、ミトコンドリアを多く含む TypeI fiber 量が減少することが報告されている[60]。また、肝臓において、FoxO1 のノックアウトがインスリンシグナルの減弱により低下していたミトコンドリア機能を改善したという報告もある[61]。今後、これらの経路の可能性を検討するために、mTOR と Akt の間に位置する TSC1/2(tuberous sclerosis1/2)の発現抑制や、FoxO の発現抑制をしたマウスで、今回観察された表現型が改善されるかどうか確認する必要があると考える。

6. 参考文献

- [1] WHO. (2013). *Global Health Observatory*. Available: <http://www.who.int/gho/en/>
- [2] 総務省統計局. (2013). 人口推計. Available: <http://www.stat.go.jp/data/jinsui/index.htm>
- [3] 門脇孝, *et al.*, 糖尿病学-基礎と臨床, 2007.
- [4] N. Kubota, *et al.*, "Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus," *J Clin Invest*, vol. 114, pp. 917-27, Oct 2004.
- [5] G. J. Biessels and W. H. Gispen, "The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models?," *Neurobiol Aging*, vol. 26 Suppl 1, pp. 36-41, Dec 2005.
- [6] P. Das, *et al.*, "Electrophysiological and behavioral phenotype of insulin receptor defective mice," *Physiol Behav*, vol. 86, pp. 287-96, Oct 15 2005.
- [7] R. Stewart and D. Liolitsa, "Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia," *Diabet Med*, vol. 16, pp. 93-112, Feb 1999.
- [8] C. Moran, *et al.*, "Brain Atrophy in Type 2 Diabetes: Regional distribution and influence on cognition," *Diabetes Care*, vol. 36, pp. 4036-42, Dec 2013.
- [9] Y. C. Long, *et al.*, "Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways," *Mol Cell Biol*, vol. 31, pp. 430-41, Feb 2011.
- [10] P. G. Laustsen, *et al.*, "Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function," *Mol Cell Biol*, vol. 27, pp. 1649-64, Mar 2007.
- [11] M. Lind, *et al.*, "Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study," *Lancet*, vol. 378, pp. 140-6, Jul 9 2011.
- [12] S. W. Park, *et al.*, "Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study," *Diabetes Care*, vol. 30, pp. 1507-12, Jun 2007.
- [13] Y. Rolland, *et al.*, "Difficulties with physical function associated with obesity, sarcopenia, and sarcopenic-obesity in community-dwelling elderly women: the EPIDOS (EPIDemiologie de l'OSteoporose) Study," *Am J Clin Nutr*, vol. 89, pp. 1895-900, Jun 2009.
- [14] M. A. Abdul-Ghani and R. A. DeFronzo, "Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2010, p. 476279, 2010.
- [15] M. Hanada, *et al.*, "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1697, pp. 3-16, Mar 11 2004.
- [16] H. Cho, *et al.*, "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 38349-52,

Oct 19 2001.

- [17] Z. Z. Yang, *et al.*, "Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 32124-31, Aug 22 2003.
- [18] H. Cho, *et al.*, "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)," *Science*, vol. 292, pp. 1728-31, Jun 1 2001.
- [19] R. M. Easton, *et al.*, "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size," *Mol Cell Biol*, vol. 25, pp. 1869-78, Mar 2005.
- [20] X. D. Peng, *et al.*, "Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2," *Genes Dev*, vol. 17, pp. 1352-65, Jun 1 2003.
- [21] B. Dummler, *et al.*, "Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies," *Mol Cell Biol*, vol. 26, pp. 8042-51, Nov 2006.
- [22] M. Lu, *et al.*, "Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1," *Nat Med*, vol. 18, pp. 388-95, Mar 2012.
- [23] C. M. Rondinone, *et al.*, "Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus," *Diabetologia*, vol. 42, pp. 819-25, Jul 1999.
- [24] A. Krook, *et al.*, "Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects," *Diabetes*, vol. 47, pp. 1281-6, Aug 1998.
- [25] J. C. Bruning, *et al.*, "A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance," *Mol Cell*, vol. 2, pp. 559-69, Nov 1998.
- [26] A. Mora, *et al.*, "Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia," *EMBO J*, vol. 22, pp. 4666-76, Sep 15 2003.
- [27] K. D. Kimura, *et al.*, "daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*," *Science*, vol. 277, pp. 942-6, Aug 15 1997.
- [28] M. Holzenberger, *et al.*, "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice," *Nature*, vol. 421, pp. 182-7, Jan 9 2003.
- [29] Y. Zhou, *et al.*, "A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse)," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 13215-20, Nov 25 1997.
- [30] M. D. Mavalli, *et al.*, "Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice," *J Clin Invest*, vol. 120, pp. 4007-20, Nov 2010.
- [31] H. Yamamoto, *et al.*, "Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor I

- (IGF-I) levels in normal adults," *Acta Endocrinol (Copenh)*, vol. 124, pp. 497-500, May 1991.
- [32] G. W. Bothe, *et al.*, "Selective expression of Cre recombinase in skeletal muscle fibers," *Genesis*, vol. 26, pp. 165-6, Feb 2000.
 - [33] M. S. Lustgarten, *et al.*, "MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging," *Aging Cell*, vol. 10, pp. 493-505, Jun 2011.
 - [34] K. F. Petersen, *et al.*, "Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes," *N Engl J Med*, vol. 350, pp. 664-71, Feb 12 2004.
 - [35] A. Szewczyk and L. Wojtczak, "Mitochondria as a pharmacological target," *Pharmacol Rev*, vol. 54, pp. 101-27, Mar 2002.
 - [36] D. E. Kelley, *et al.*, "Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 51, pp. 2944-50, Oct 2002.
 - [37] D. C. Chan, "Mitochondrial fusion and fission in mammals," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 22, pp. 79-99, 2006.
 - [38] N. Gleyzer, *et al.*, "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators," *Mol Cell Biol*, vol. 25, pp. 1354-66, Feb 2005.
 - [39] M. I. Ekstrand, *et al.*, "Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals," *Hum Mol Genet*, vol. 13, pp. 935-44, May 1 2004.
 - [40] A. Zisman, *et al.*, "Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance," *Nat Med*, vol. 6, pp. 924-8, Aug 2000.
 - [41] J. K. Kim, *et al.*, "Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4," *J Clin Invest*, vol. 108, pp. 153-60, Jul 2001.
 - [42] J. A. Simoneau and D. E. Kelley, "Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 83, pp. 166-71, Jul 1997.
 - [43] K. F. Petersen, *et al.*, "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance," *Science*, vol. 300, pp. 1140-2, May 16 2003.
 - [44] I. Trownc, *et al.*, "Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing," *Lancet*, vol. 1, pp. 637-9, Mar 25 1989.
 - [45] D. Harman, "The biologic clock: the mitochondria?," *J Am Geriatr Soc*, vol. 20, pp. 145-7, Apr 1972.
 - [46] C. Richter, *et al.*, "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 85, pp. 6465-7, Sep 1988.

- [47] M. H. Chung, *et al.*, "Protection of DNA damage by dietary restriction," *Free Radic Biol Med*, vol. 12, pp. 523-5, 1992.
- [48] H. Y. Lee, *et al.*, "Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance," *Cell Metab*, vol. 12, pp. 668-74, Dec 1 2010.
- [49] T. Ono, *et al.*, "Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria," *Nat Genet*, vol. 28, pp. 272-5, Jul 2001.
- [50] S. A. Detmer and D. C. Chan, "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, pp. 870-9, Nov 2007.
- [51] H. Chen, *et al.*, "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development," *J Cell Biol*, vol. 160, pp. 189-200, Jan 20 2003.
- [52] S. Zuchner, *et al.*, "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A," *Nat Genet*, vol. 36, pp. 449-51, May 2004.
- [53] C. Alexander, *et al.*, "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28," *Nat Genet*, vol. 26, pp. 211-5, Oct 2000.
- [54] C. Delettre, *et al.*, "Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy," *Nat Genet*, vol. 26, pp. 207-10, Oct 2000.
- [55] H. Chen, *et al.*, "Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations," *Cell*, vol. 141, pp. 280-9, Apr 16 2010.
- [56] A. M. Abbatecola, *et al.*, "Insulin resistance and muscle strength in older persons," *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, vol. 60, pp. 1278-82, Oct 2005.
- [57] P. Srikanthan, *et al.*, "Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III," *PLoS One*, vol. 5, p. e10805, May 26 2010.
- [58] W. C. Stephen and I. Janssen, "Sarcopenic-obesity and cardiovascular disease risk in the elderly," *J Nutr Health Aging*, vol. 13, pp. 460-6, May 2009.
- [59] J. T. Cunningham, *et al.*, "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex," *Nature*, vol. 450, pp. 736-40, Nov 29 2007.
- [60] Y. Kamei, *et al.*, "Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 41114-23, Sep 24 2004.
- [61] Z. Cheng, *et al.*, "Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in

the liver," *Nat Med*, vol. 15, pp. 1307-11, Nov 2009.

7. 謝辞

本研究を行う上で、東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科教授の門脇孝先生ならびに准教授の植木浩二郎先生に研究全般にわたりご指導を賜りました。さらに、東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科の笹子敬洋先生、金子和真先生にはご指導、多大なるご助言・ご助力を賜りました。実地面においては、キョーリン製薬 小林直樹先生に骨格筋 **Muscle Strip** の糖取り込み実験に関してご助力賜りました。また、大杉満先生、岡崎由紀子先生、栗澤元晴先生、小林正稔先生、実験助手として高橋文弥さん、星野利津子さんにも多くのご助力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。