

骨格筋の量的変化を制御する細胞内情報伝達機構

Intracellular signaling pathway regulating skeletal muscle hypertrophy

平成 30 年度

北海道医療大学大学院リハビリテーション科学研究科

リハビリテーション科学専攻

生体構造機能・病態解析学分野 15Z-002 森谷伸樹

## 要旨

### 【目的】

運動負荷による骨格筋肥大には **mechanistic target of rapamycin (mTOR)** の活性化や筋衛星細胞の関与が重要と言われている。本研究では、**mTOR** や筋衛星細胞の活性化を調整する制御機構について検討することを目的とした。

### 【方法】

**Akt1 KO** マウス (**KO**) と **wild type (WT)** に対し、共働筋切除術による足底筋への代償性過負荷を行った。各群について補正足底筋重量と筋線維横断面積、**Akt/mTOR** 経路の分子の発現量およびリン酸化、増殖した筋衛星細胞数を分析した。

### 【結果】

**KO** 群は運動負荷によって **mTOR** 経路が活性化しタンパク質合成が促進していたにもかかわらず、筋の肥大効率が一部抑制された。また、**KO** 群は筋衛星細胞の増殖効率が抑制された。

### 【考察】

運動負荷においては **Akt1** 非依存的な経路が **mTOR** の活性化に重要であること、**Akt1** はタンパク質合成系以外の要因によって骨格筋肥大を制御することが明らかとなった。また、**Akt1** は筋衛星細胞の機能活性を促進することで、骨格筋肥大を制御する可能性が示唆された。

## 英文要旨

### 【Purpose】

**Mechanistic target of rapamycin (mTOR)** and satellite cells play an important role in the promotion of protein synthesis and subsequent skeletal muscle hypertrophy. The present study aimed to investigate the regulatory mechanism that regulates **mTOR** and muscle satellite cells activation.

### 【Methods】

**Akt 1 knockout (KO)** and **wild type (WT)** mice were included in this study. **Plantaris** muscle hypertrophy was induced in the mice using a bilateral synergist ablation model. The weight and cross-sectional area of the muscle, the level of expression and phosphorylation of the **Akt/mTOR** pathway, and the number of proliferated satellite cells in each group were analyzed.

### 【Results】

Following mechanical overload, the **Akt1 KO** mice showed a blunted hypertrophic response of the **plantaris** muscle, with a diminished rate of satellite cells proliferation. The proliferation efficiency of muscle satellite cells was found to be suppressed.

### 【Discussion】

The results show that the **Akt1**-independent pathway is important for **mTOR** activation in exercise load. **Akt1** regulates skeletal muscle hypertrophy through factors other than protein synthesis.

Moreover, the results suggest that Akt1 regulates skeletal muscle hypertrophy by promoting the functional activity of muscle satellite cells.

キーワード

mTOR Akt 骨格筋肥大 タンパク質合成 筋衛星細胞

## 目次

### I 略語

II 本文	1
II-1 先行研究と研究背景	1
II-1-1) 骨格筋と理学療法に関わり	1
II-1-1)-1) 理学療法場面における骨格筋への介入	1
II-1-2) 骨格筋の解剖生理	1
II-1-2)-1) 骨格筋の発生と構造	1
II-1-2)-2) 骨格筋の収縮機構	1
II-1-3) タンパク質の合成と分解のバランスによる骨格筋の肥大	2
II-1-3)-1) 骨格筋の肥大と萎縮を起こす刺激と細胞内情報伝達	2
II-1-3)-2) 骨格筋におけるタンパク質合成	3
II-1-3)-3) 骨格筋肥大における mTOR の役割	3
II-1-3)-4) 骨格筋肥大における IGF-1/Akt の役割	4
II-1-3)-5) 骨格筋肥大における機械的刺激の役割	5
II-1-3)-6) mTOR 活性化における IGF-1 と Akt の役割	5
II-1-3)-7) 骨格筋におけるタンパク質分解	6
II-1-3)-8) 骨格筋におけるアポトーシス	7
II-1-3)-9) Akt1 KO マウス	7
II-1-3)-10) 共働筋切除	8
II-1-4) 筋衛星細胞の機能による骨格筋の肥大	8
II-1-4)-1) 筋衛星細胞の概要	8
II-1-4)-2) 骨格筋肥大における筋衛星細胞の役割	8
II-2 運動負荷による骨格筋の肥大適応におけるタンパク質合成促進に関する研究	9
II-2-1) 序論	9
II-2-1)-1) 研究目的	9
II-2-1)-2) 研究仮説	9
II-2-2) 方法	10
II-2-2)-1) 実験動物	10
II-2-2)-2) 手術及び筋サンプル採取	10
II-2-2)-3) RNA およびタンパク質の抽出	10

II-2-2)-(4)	ウエスタンブロッティング	11
II-2-2)-(5)	タンパク質合成量の測定	11
II-2-2)-(6)	免疫組織化学染色	11
II-2-2)-(7)	群分けと統計処理	12
II-2-3)	結果	12
II-2-3)-(1)	Akt1 の欠損で運動負荷による骨格筋の肥大適応は抑制される	12
II-2-3)-(2)	Akt1 の欠損で Akt2 および Akt3 の代償的増加は起こらない	13
II-2-3)-(3)	運動負荷による mTOR 系のシグナル伝達の促進および筋タンパク合成は Akt1 非依存的に起こる	13
II-2-3)-(4)	運動負荷によるタンパク質分解系の変化は Akt1 非依存的に起こる	14
II-2-4)	考察	15
II-2-5)	結論	16
II-3	運動負荷による骨格筋の肥大適応における筋衛星細胞の増殖機構に関する研究	16
II-3-1)	序論	16
II-3-1)-(1)	研究目的	16
II-3-1)-(2)	研究仮説	17
II-3-2)	方法	17
II-3-2)-(1)	実験動物	17
II-3-2)-(2)	手術及び筋サンプル採取	17
II-3-2)-(3)	免疫組織化学染色	17
II-3-2)-(4)	中心核を持つ筋線維数と筋線維あたりの筋核数の計測	18
II-3-2)-(5)	新たに増殖した筋衛星細胞数の計測	18
II-3-3)	結果	18
II-3-3)-(1)	Akt1 欠損は骨格筋線維の筋核数増加を抑制する	18
II-3-3)-(2)	Akt1 欠損は筋衛星細胞の増殖を抑制する	18
II-3-4)	考察	19
II-3-5)	結論	20
II-4	総合考察	20
III	謝辞	22
IV	引用文献	26

図表目次

- 図 1 骨格筋の概要図
- 図 2 オートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系の模式図
- 図 3 mTOR に関する細胞内シグナル伝達カスケード
- 図 4 共働筋切除による代償性筋肥大モデル
- 図 5 体重
- 図 6 足底筋湿重量
- 図 7 補正足底筋湿重量
- 図 8 筋線維横断面
- 図 9 筋線維横断面積度数分布
- 図 10 筋線維横断面積
- 図 11 各 Akt アイソフォームのウエスタンブロッティング典型例
- 図 12 Akt1 発現量
- 図 13 Akt2 発現量
- 図 14 Akt3 発現量
- 図 15 pan-Akt 発現量
- 図 16 総 RNA 発現量
- 図 17 SUnSET 法によるウエスタンブロッティング典型例
- 図 18 タンパク質合成量
- 図 19 mTOR の下流因子のウエスタンブロッティング典型例
- 図 20 phos-S6K1 (Thr389) 発現量
- 図 21 phos-S6K1 (Thr421/Ser424) 発現量
- 図 22 phos-rpS6 (Ser235/236) 発現量
- 図 23 phos-rpS6 (Ser240/244) 発現量
- 図 24 phos-4E-BP1 (Thr37/46) 発現量
- 図 25 phos-NDRG1 (Thr346) 発現量
- 図 26 Akt/mTOR 系下流因子のウエスタンブロッティング典型例
- 図 27 phos-GSK3B (Ser9) 発現量
- 図 28 phos-PRAS40 (Thr246) 発現量
- 図 29 phos-MEK1/2 (Ser217/221) 発現量

- 図 30 phos-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 発現量
  - 図 31 total-REDD1 発現量
  - 図 32 LC3, p62 のウエスタンブロッティング典型例
  - 図 33 LC3-II/I の発現量の比率
  - 図 34 p62 発現量
  - 図 35 ユビキチン化されたタンパク質のウエスタンブロッティング典型例
  - 図 36 ユビキチン化されたタンパク質量
  - 図 37 Caspase3, PARP1 のウエスタンブロッティング典型例
  - 図 38 Caspase3 発現量
  - 図 39 ジストロフィンと DAPI の共染色画像
  - 図 40 中心核を持つ筋線維数
  - 図 41 筋線維あたりの筋核数
  - 図 42 Pax7, BrdU, DAPI の共染色画像
  - 図 43 新たに増殖した筋衛星細胞数
- 表 1 使用した抗体

## I 略語

ATP: Adenosine triphosphate  
ACL: ATP citrate lyase  
BCA: Bicinchoninic acid  
BSA: Bovine serum albumin  
BrdU: Bromodeoxyuridine  
DNA: Deoxyribonucleic acid  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
ERK: Extracellular signal-regulated kinase  
eIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E  
eIF4G: Eukaryotic translation initiation factor 4G  
GSK3- $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3  $\beta$   
HCl: Hydrochloric acid  
IGF-1: Insulin-like growth factor 1  
KO: Knock out  
LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3  
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase  
mRNA: Messenger ribonucleic acid  
mSin1: Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1  
mTOR: Mechanistic target of rapamycin  
NaCl: Sodium chloride  
NaF: Sodium fluoride  
OV: Overload  
PA: Phosphatidic acid  
PARP1: Poly (ADP-Ribose) polymerase 1  
PBS: Phosphate buffered saline  
PE: Phosphatidylethanolamine  
PRAS40: Proline rich Akt substrate of 40kDa  
PFA: Paraformaldehyde  
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase  
PKB: Protein kinase b  
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride  
Protor-1: Protein observed with Rictor-1  
Protor-2: Protein observed with Rictor-2  
REDD1: Regulated in DNA damage and development 1  
Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mTOR  
RIPA: Radio-immunoprecipitation assay  
rpS6: Ribosomal protein S6  
Raptor: Regulatory associated protein of mTOR  
SDS: Sodium dodecyl sulfate  
STS: Staurosporine  
SUnSET: Surface sensing of translation  
S6K1: S6 kinase 1  
WT: Wild type  
4E-BP1: 4E-binding protein 1



## II 本文

### II-1 先行研究と研究背景

#### II-1-1) 骨格筋と理学療法に関わり

##### II-1-1)-(1) 理学療法場面における骨格筋への介入

理学療法士及び作業療法士法において、理学療法は「身体に障害のある者に対し、主としてその基本的動作能力の回復を図るため、治療体操その他の運動を行わせ、及び電気刺激、マッサージ、温熱その他の物理的手段を加えることをいう。」と定義されており、理学療法の主目的は基本的動作能力の回復であると明記されている<sup>1)</sup>。ヒトは生活を営む上で体を動かすことが必要不可欠であり、その能力を改善することが理学療法には求められている。体は骨によって四肢・体幹が形作られ、その骨は骨格筋によって動かされる。つまり、人体の動作は骨格筋収縮による関節運動なしには成り立たない。そのため、理学療法によって患者に介入するにあたり、骨格筋量の維持・増加は疾患を問わず課題となることが多い。そのため、骨格筋量を効率良く維持、増加させる方法の探求は理学療法の発展に直結し、基礎・臨床を問わず大いに望まれている研究分野である。

#### II-1-2) 骨格筋の解剖生理

##### II-1-2)-(1) 骨格筋の発生と構造

脊椎動物の受精卵は、発生過程で内胚葉、中胚葉、外胚葉を形成する。その中で中胚葉は脊索、体節、腎節、側板に分かれ、体節は皮節、筋節、硬節に分かれる。この筋節から筋が発生する。胎生第6週頃から筋節は単核の筋芽細胞に分化し、筋芽細胞は分裂・融合を繰り返し多核の筋管細胞となる。これが成熟し収縮機能を持つことで、最終的に筋細胞、すなわち筋線維へと分化する<sup>2)</sup>。また、複数の筋線維が結合組織で包まれ筋束となり、筋束が束ねられて骨格筋を形成する(図1)。

##### II-1-2)-(2) 骨格筋の収縮機構

骨格筋は平均的なヒトの全体重の約40%を占め、アクチン、ミオシンといった収縮タンパク質と、アクチニン、タイチン、ジストロフィン、ネブリンといった構造タンパク質を中心に構成される。収縮タンパク質のアクチン、ミオシンはそれぞれアクチンフィラメント、ミオシンフィラメントと呼ばれる2種類の線維を構成し、これらが交互に配列することで筋原線維となる。筋原線維は明るく見える明帯、暗く見える暗帯が交互に並んで縞状

の模様となっており、この模様は横紋と呼ばれる。明帯の中心には僅かに暗く見える線があり、これはZ線と呼ばれ、Z線とZ線の間を筋節と定め筋原線維の機能的、構造的な単位としている。随意運動における筋収縮の際は、大脳皮質運動野から脊髄前角運動ニューロン、神経筋接合部と活動電位が伝わっていき、神経から筋へ伝達物質であるアセチルコリンが放出される。それによって筋小胞体からカルシウムイオンが放出され、トロポニンによる両フィラメント結合の阻害を解除する。それを受け、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントはクロスブリッジで結合し、ATPを消費してミオシンフィラメントがアクチンフィラメントを引き込んでいく。この一連の活動によって筋は収縮する<sup>2)</sup>。このように、骨格筋は主にタンパク質によって構成され、タンパク質の相互作用によって収縮する。そのため、骨格筋の大きさや収縮力の変化はタンパク質量の変化によってもたらされる。

### II-1-3) タンパク質の合成と分解のバランスによる骨格筋の肥大

#### II-1-3)-(1) 骨格筋の肥大と萎縮を起こす刺激と細胞内情報伝達

骨格筋の量的変化を引き起す因子としては、機械的負荷、栄養、神経活動、局所の成長因子や内分泌などがある。

骨格筋線維は終末分化しているため分裂能を持たず、骨格筋の水分以外の主な構成成分はタンパク質であり、骨格筋湿重量の20%を占める<sup>3)</sup>。これらのことから、タンパク質の量的変化によって骨格筋量の変化が起こる。また、タンパク質量の変化はタンパク質の合成と分解のバランスによって規定される。すなわち、タンパク質合成の促進やタンパク質分解の抑制によって、合成が分解を上回った状態が続くと骨格筋が肥大する<sup>4,5)</sup>。

生体内では刺激となる生化学的情報が別な刺激を誘導し、それらの刺激は定まった経路を次々と伝達していくが、それをシグナル伝達と呼ぶ。シグナル伝達は他の分子に伝わっていき、最終的には生体内の機能を制御する。このような反応の連鎖をカスケードと呼ぶ。

タンパク質リン酸化酵素はプロテインキナーゼ、タンパク質のアミノ酸残基はサイトとも呼ばれ、プロテインキナーゼは特定のサイトをリン酸化することでシグナルを伝達する。リン酸化を受けるアミノ酸残基をリン酸化サイトと呼び、リン酸化されるサイトによって、プロテインキナーゼはチロシンキナーゼやセリン/スレオニンキナーゼと名付けられる。プロテインキナーゼによるシグナル伝達は生体内で様々なシステムを制御するが、細胞内におけるタンパク質合成も制御を受ける。

### II-1-3)-(2) 骨格筋におけるタンパク質合成

タンパク質は多数のアミノ酸が結合してできた分子である。アミノ酸は、分子内にアミノ基とカルボキシル基を持つ化合物の総称であるが、自然界にある多数のアミノ酸のうち、タンパク質合成に使用されるのは 20 種類である。複数のアミノ酸がペプチド結合によって繋がった分子をペプチド、ペプチドに組み込まれたアミノ酸を残基と呼ぶ。残基が 2 個のものはジペプチド、3 個のものはトリペプチドと呼ばれ、一般に 20 個を超えるとポリペプチドと呼ばれる。アミノ酸が結合してポリペプチドとなり、それがフォールディングと呼ばれる立体構造への変化を経て様々な修飾を受けることによってタンパク質となるが、タンパク質毎にそれを構成するポリペプチド内のアミノ酸配列は全て決まっている。

細胞核内の染色体の主要な構成要素である DNA には、塩基配列によって遺伝子と呼ばれる情報が組み込まれている。その情報の一部はタンパク質を構成するアミノ酸配列を規定したもので、それを元にタンパク質合成が行われる。まず、RNA ポリメラーゼが DNA に結合し、4 種類の塩基を識別して相補的な塩基配列のリボヌクレオチドを結合させ、mRNA を合成する。この過程は転写と呼ばれる。その後、mRNA は細胞質中に移動して細胞小器官であるリボソームと結合し、リボソームは mRNA の塩基配列に相補的なアミノ酸を結合させ、ポリペプチドを合成する。この過程は翻訳と呼ばれる。このように、転写と翻訳で遺伝情報からタンパク質が合成される原則はセントラルドグマと呼ばれる<sup>6)</sup>。

### II-1-3)-(3) 骨格筋肥大における mTOR の役割

タンパク質合成を促進する重要な因子として mTOR がある<sup>5)</sup>。1965 年、イースター島の土壌から、*Streptomyces hygroscopicus* と呼ばれる微生物が生成する抗生物質であるラパマイシンが発見された。その後、ラパマイシンはセリン/スレオニンキナーゼの機能を抑制することが明らかとなり、ラパマイシンに抑制されるキナーゼは target of rapamycin と命名された。target of rapamycin の哺乳類におけるホモログは mTOR と呼ばれるようになった。

mTOR は哺乳類の体内で標的タンパク質のセリン基、スレオニン基のリン酸化を促し、最終的にタンパク質合成を促進する。通常は mTORC1 および mTORC2 といった複合体を形成しており、mTORC1 は mTOR, Raptor, PRAS40, DEPTOR, mLST8, Tti1, Tel2 で構成され、ラパマイシン感受性である。それに対し、mTORC2 は mTOR, Rictor, mSin1, Protor-1, Protor-2, Deptor, mLST8, Tti1, Tel2 で構成され、ラパマイシン非感受性である。このうち、タンパク質合成の促進については mTORC1 が重要な役割を果たし、mTORC2

は細胞骨格の形成や糖代謝を制御する<sup>7,8)</sup>。以下本文では、mTORC1 活性を mTOR 活性とみなす。

mTOR は主に 4E-BP1 と S6K1 のリン酸化によってタンパク質合成を促進する。eIF4E はタンパク質合成を促進する分子であるが、4E-BP1 によって抑制される。mTOR は 4E-BP1 をリン酸化することでその機能を抑制する。また、S6K1 はリボソーム内の rpS6 をリン酸化することでタンパク質合成を促すが、mTOR は S6K1 のリン酸化によってその機能を促進する。このように、mTOR はキナーゼとして他の分子をリン酸化してタンパク質合成を促進することによって、骨格筋肥大を促す<sup>9)</sup>。なお、S6K1 および 4E-BP1 はキナーゼである mTOR によって直接的にリン酸化制御を受けるため、S6K1 のリン酸化は mTOR の機能活性の指標となる。

mTOR を活性化する上流因子は、主に機械的刺激、ホルモン刺激、栄養状態が重要であると言われている。mTOR はこれらの刺激入力を統合して、生体内の状況に応じて必要な時にタンパク質合成を促進するというセンサーのような機能を果たす。

#### II-1-3)-(4) 骨格筋肥大における IGF-1/Akt の役割

臨床の理学療法場面では、運動負荷によって患者の筋肥大を目指すことが多い。運動負荷をかけた際に mTOR を刺激しタンパク質合成を促進する重要な因子として、IGF-1 がある<sup>9)</sup>。これは mTOR の上流因子の中でホルモン刺激にあたるものであり、インスリンとアミノ酸配列が類似したペプチドホルモンでソマトメジンとも呼ばれる。IGF-1 は対象となる細胞の IGF-1 受容体に結合してシグナル伝達を引き起こし、未成熟な筋における筋芽細胞の増殖と分化<sup>10)</sup>、成熟した筋における筋肥大を誘導する<sup>11)</sup>。また、IGF-1 は PI3K 及びその下流因子である Akt のリン酸化を介して mTOR を活性化し、最終的に筋肥大を誘導することが動物実験及び細胞培養で確認されている<sup>9,11-15)</sup>。Akt は mTOR と同じくセリン/スレオニンキナーゼで、PKB とも呼ばれる。mTOR のリン酸化を促進すると共に、mTORC2 から正のフィードバックを受けてその機能が促進される<sup>9)</sup>。骨格筋特異的に Akt の発現を増加させると、筋肥大が促進されることも確認されている<sup>16,17)</sup>。

なお、Akt/mTOR 系を制御したり、Akt/mTOR 系からの制御を受ける分子が数多く存在する。例として、Akt は GSK3 $\beta$  をリン酸化することによって不活性化するが、この GSK3 $\beta$  は eIF4E を抑制する<sup>18)</sup>。PRAS40 もリン酸化によって抑制するが、この PRAS40 は mTOR を抑制する<sup>19)</sup>。eIF4E, mTOR は共にタンパク質合成を促進するため、Akt は eIF4E と mTOR

を抑制する分子を制御することで、タンパク質合成を促進している。REDD1 は Akt を抑制する分子である<sup>20)</sup>。NDRG1 は Akt を抑制すると共に、この分子のリン酸化状態は mTORC2 の機能活性を示す。このように、GSK3 $\beta$ , PRAS40, REDD1, NDRG1 は Akt/mTOR 系の制御をしたり、Akt/mTOR 系からの制御を受ける分子であり、いずれもタンパク質合成を抑制する。

また、Akt の機能として、アポトーシスの制御があると言われている。Chen ら<sup>21)</sup>は Akt のアイソフォームである Akt 1 が欠損したマウスの胸腺ではアポトーシスが增加していることを示し、Akt1 がアポトーシスを抑制することを示唆している。Liao ら<sup>22)</sup>は Akt 発現量が多いガン細胞内ではアポトーシスマーカーが減少していることを示し、こちらも同様に Akt がアポトーシスを抑制することを示唆している。

#### II-1-3)-(5) 骨格筋肥大における機械的刺激の役割

運動負荷によって筋に機械的刺激が加わると、PA と呼ばれるリン脂質の一種が増加し、mTOR と結合することで機能を促進する<sup>23, 24)</sup>。Hornberger ら<sup>25)</sup>は、Akt 非存在下で筋に伸長刺激を加えることで、PA が Akt 非依存的に mTOR を刺激することを示している。他にも、MEK は機械的刺激を含む様々なストレス刺激によって活性化され、その下流因子である ERK を通じて mTOR のリン酸化を促す。このように、機械的刺激による mTOR の活性化も骨格筋の肥大適応において重要な経路となっている。ここまで解説した mTOR に関するシグナル伝達系の分子の一部を図 3 に示す。

#### II-1-3)-(6) mTOR 活性化における IGF-1 と Akt の役割

IGF-1 は Akt 依存的に mTOR を活性化し、タンパク質合成を促進することで筋肥大を促すが、PA や MEK/ERK のように、IGF-1/Akt 非依存的に mTOR を活性化する経路も存在する。そのため、IGF-1/Akt 系が運動負荷によるタンパク質合成に重要な役割を果たすのかは明らかになっていない。また、運動負荷によって mTOR が活性化する際には、カスケードの上流因子の中でどれが重要なのかは明らかになっていない。

Spangenburg ら<sup>26)</sup>は、骨格筋特異的に不活性型の IGF-1 受容体を過剰発現させたマウスも、WT マウスと同様に運動負荷によって mTOR が活性化し筋が肥大適応することを示した。つまり、IGF-1 の機能が抑制されても運動負荷による mTOR 活性化と筋の肥大適応が起こることが示唆されている。また、Miyazaki ら<sup>27)</sup>は、マウスに継続して運動負荷を加え

ると、mTORは運動負荷をかけた直後から機能活性が上昇するが、mTORの上流因子であるはずのAktのリン酸化は、mTORよりも遅れて上昇することを示した。つまり、運動負荷をかけた直後については、Akt非依存的にmTORが活性化することが示唆されている。これらのことから、運動負荷によるmTORの活性化や筋肥大について、IGF-1/Akt系は必ずしも必要ないとの仮説が導かれる。この仮説を検証するには、長期的かつ厳密にIGF-1/AktによるmTORへの刺激入力を途絶させた状況で運動負荷を加え、mTORの活性化やタンパク質合成、筋肥大が起こるかどうかを調べる必要がある。

#### II-1-3)-(7) 骨格筋におけるタンパク質分解

細胞内における不要なタンパク質の分解機構には、オートファジー系、ユビキチン-プロテアソーム系、カルパイン系などがある。筋萎縮の際にはタンパク質分解が亢進する<sup>28,29)</sup>。オートファジーとユビキチン-プロテアソーム系の模式図を図2に示す。

細胞が飢餓などの条件下におかれると、細胞質の一部は膜で囲まれ取り込まれる。この膜で囲まれた小胞はオートファゴソームと呼ばれる。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の加水分解酵素によってオートファゴソーム内のタンパク質は分解される。このようなタンパク質分解の仕組みはオートファジーと呼ばれる。オートファゴソームは非選択的にタンパク質を取り囲むため、オートファジー系では基本的に非選択的にタンパク質が分解される。オートファジーのマーカーとして知られているタンパク質にLC3がある。LC3は翻訳された後にC末端が切断されLC3-Iとなり、LC3-Iにリン脂質の一種であるPEが共有結合したものはLC3-IIとなる。LC3-IIはオートファゴソーム膜と結合するため、LC3-II発現量はオートファゴソーム膜の形成と正の相関を示す。また、LC3-IIはLC3-Iより分子量が大きい疎水性が高いため、電気泳動においてLC3-Iよりもバンドの移動度は大きくなる。オートファジーのマーカーとしてはLC3-II/LC3-Iの比が用いられ、この比率の増加はオートファジー活性の上昇を示す。

また、タンパク質が分解される際には、鎖状に連なったユビキチンと呼ばれるタンパク質が結合される。ユビキチンはプロテアソームと呼ばれる筒状のタンパク質複合体と親和性を持つため、ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソーム内の空洞に取り込まれる。その後、プロテアソーム内のタンパク質はプロテアーゼによって分解される。このようなタンパク質分解の仕組みはユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれる。ユビキチンは分解の対象のみに結合されるため、ユビキチン-プロテアソーム系は選択的にタンパク質

を分解する。ユビキチンはユビキチン-プロテアソーム系のマーカーとして機能するが、あらゆる分子量のタンパク質に結合するため、ユビキチンを検出するバンドは複数の分子量において出現する。なお、p62 はユビキチン化されたタンパク質やオートファゴソームに結合し、オートファジーの際に分解されるタンパク質である。そのため、p62 はオートファジーが亢進すると減少し、オートファジーが抑制されると蓄積される特徴を持ち、オートファジー系やユビキチン-プロテアソーム系のマーカーとなる。

カルパインはタンパク質分解酵素の一種であり、カルシウム依存的に活性化される特徴を持つ。カルパインは筋萎縮の際には機能が亢進し、筋肥大の際には機能が抑制されるが<sup>30)</sup>、タンパク質を特定の部位で切断することで生体機能を調節する機能を持ち、カルパイン系の機能不全は筋ジストロフィーを引き起こすことも確認されている<sup>31)</sup>。そのため、同じタンパク質分解機構であっても、不要となったタンパク質をアミノ酸に分解するオートファジーやユビキチン-プロテアソーム系とは異なる特徴を持っている。

#### II-1-3)-(8) 骨格筋におけるアポトーシス

細胞は損傷すると、能動的にアポトーシスと呼ばれる細胞死を起こすことがあり<sup>32)</sup>、骨格筋線維に大量のアポトーシスが引き起こされれば筋量は低下する。カスパーゼは、細胞にアポトーシスを引き起こす一群のタンパク質である。定常状態のカスパーゼは不活性型であるが、切断されることによって活性型となりアポトーシスを引き起こす。カスパーゼにはアポトーシスを引き起こす実行型カスパーゼと、カスパーゼを切断して活性化する誘導型カスパーゼがあり、実行型カスパーゼとして Caspase3 が知られている。また、PARP1 は遺伝子修復に関わるタンパク質であり、アポトーシスの際には分解される。上記のことから、アポトーシスの活性が高まれば活性型の Caspase3 や分解された PARP1 の量が増加するため、これらはアポトーシスのマーカーとなる。

#### II-1-3)-(9) Akt1 KO マウス

長期的かつ厳密に IGF-1/Akt による mTOR への刺激入力を途絶させるモデルを作成する方法としては KO マウスがある。Akt には Akt1, Akt2, Akt3 の 3 種類のアイソフォームがあり、構造は類似しているが生体内でそれぞれ異なる機能を持つ。また、Akt1 及び Akt2 は成熟骨格筋で多く発現する。Akt1 は筋芽細胞分化やタンパク質合成<sup>33, 34)</sup>、Akt2 はグルコース代謝<sup>33, 35-37)</sup>、Akt3 は脳の発達<sup>33)</sup>に関わることが分かっている。Akt1 KO マウスは研

究用途で使用可能となっており，出生時で平均 20%程度の体重減少が見られ，その後生涯に渡って発育不良となることが分かっている<sup>34)</sup>。

#### II-1-3)-(10) 共働筋切除

動物実験における運動負荷のモデルとしては，共働筋切除による代償性筋肥大がある。これは共働筋を切除することで，残された筋に強い運動負荷をかけ筋肥大を起こすものである。げっ歯類においては，下腿三頭筋を切除することで残された足底筋に運動負荷をかける手法が先行研究で用いられている<sup>32, 38, 39)</sup>。本研究で用いた共働筋切除の模式図を図 4 に示す。

#### II-1-4) 筋衛星細胞の機能による骨格筋の肥大

##### II-1-4)-(1) 筋衛星細胞の概要

筋衛星細胞は，1961 年に Mauro<sup>40)</sup>がカエル骨格筋において発見した，筋線維に分化せず筋芽細胞として残された前駆細胞である。細胞質をほとんど持たない単核の細胞であり，通常状態では休止期となり，形質膜と基底膜の間に存在している。しかし，筋線維が損傷や運動負荷などを受けると活性化し，細胞分裂によって増殖し筋芽細胞へ分化する。その後，既存の筋線維と融合して損傷によって失われた筋核を補給し，筋線維の再生を促す<sup>2, 41-43)</sup>。なお，Pax7 は休止期および活性化された筋衛星細胞に特異的に発現する転写因子であり，筋衛星細胞が筋芽細胞への分化を起こすと Pax7 の発現は減少する<sup>41)</sup>。そのため，筋衛星細胞のマーカーとして利用されている。損傷から再生した筋線維は筋核が細胞中央に存在しており，これを中心核と称する。その後，再生の完了に伴って筋核は筋線維周辺部に移動していく。そのため，筋線維が損傷から回復過程にある際は，中心核を持つ筋線維が散見される<sup>2)</sup>。また，筋衛星細胞は損傷した骨格筋細胞と融合して筋核を補給する機能を持つため，筋衛星細胞の機能活性が高まることに伴って筋線維の筋核数は増加していく。

##### II-1-4)-(2) 骨格筋肥大における筋衛星細胞の役割

骨格筋線維の体積をその線維内の筋核数で除した値，すなわち筋核 1 つあたりの細胞容積は筋核ドメインと呼ばれる。骨格筋の肥大や萎縮が起こっても筋核ドメインは一定になるよう制御されているため<sup>44)</sup>，骨格筋が肥大するには筋核数の増加が必要となる。



筋衛星細胞は、筋核数を増加させることによって骨格筋肥大に重要な役割を果たすと考えられており、様々な検証実験がなされている。Rosenblatt ら<sup>45)</sup>は、ガンマ線によって筋衛星細胞を不活性化したところ、骨格筋肥大が抑制されたことを示している。Fleckman ら<sup>46)</sup>は、DNA 合成阻害によって筋衛星細胞の増殖を妨げたところ、同様に運動負荷による骨格筋肥大が抑制されたことを示した。また、Goh ら<sup>47)</sup>は前駆細胞の融合不全によって筋衛星細胞の機能を阻害、運動負荷による骨格筋肥大が抑制されることを示した。このように、筋衛星細胞は筋線維と融合して筋核数を増やすことで、運動負荷による骨格筋肥大を促すことが示唆されている。しかし、McCarthy ら<sup>48)</sup>は骨格筋特異的に筋衛星細胞を死滅させたマウスも、運動負荷によって骨格筋の肥大適応が起こることを示した。Jackson ら<sup>42)</sup>は McCarthy ら<sup>48)</sup>と同様のマウスを用いて、筋衛星細胞の機能不全があっても運動負荷による廃用性筋萎縮からの回復に変化がないことを確認している。また、Fry ら<sup>49)</sup>も筋衛星細胞を除去したマウスにおいて、サルコペニアの発生に変化はないことを示した。Lowe ら<sup>50)</sup>はガンマ線によって筋衛星細胞を不活性化しても、機械的負荷による筋肥大に影響を及ぼさないことを示した。ただし興味深いことに、Egner ら<sup>51)</sup>も McCarthy ら<sup>48)</sup>と類似したマウスを用いて骨格筋特異的に筋衛星細胞の機能不全を起こしたモデルを作成し運動負荷をかけたところ、筋の肥大適応が抑制されることを示し、McCarthy らの説を否定している。このように、骨格筋肥大において筋衛星細胞が必須か否かは議論が続いている。

## II-2 運動負荷による骨格筋の肥大適応におけるタンパク質合成促進に関する研究

### II-2-1) 序論

#### II-2-1)-(1) 研究目的

本研究は、運動負荷によって mTOR 活性化や骨格筋の肥大適応が起こる際に、Akt1 から mTOR への刺激入力が必要か、すなわち Akt1 欠損によって運動負荷による mTOR 活性化や骨格筋の肥大適応が抑制されるかを検証することを目的とした。

#### II-2-1)-(2) 研究仮説

Akt1 が欠損している状況で運動負荷による mTOR の活性化や骨格筋の肥大適応が起こらなければ、Akt 依存的な経路が重要な役割を果たすとの示唆が得られる。

## II-2-2) 方法

### II-2-2)-(1) 実験動物

本研究は北海道医療大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号第 095 号，承認年月日平成 28 年 3 月 1 日および承認番号第 018 号，承認年月日平成 29 年 3 月 6 日）。実験動物は第 1 世代として，Jackson Laboratory より Akt1 KO/WT のヘテロ接合体マウス (B6.129P2-Akt1<sup>tm1Mbb</sup>/J) を購入し，第 2 世代の Akt1 KO/WT ヘテロ接合体マウス同士を掛け合わせることで，Akt1 KO のホモ接合体マウスを作成した。対照群として，Akt1 KO ホモ接合体マウスの同腹仔となる WT ホモ接合体マウスを使用した。実験に使用したマウスは全て 14 週齢から 16 週齢の雌であり，温度は 24 °C から 26 °C，湿度は 40% から 60% に制御され 12 時間毎の明暗サイクルを持つ動物実験センターで飼育した。食物及び水は自由に摂取できるよう維持した。

### II-2-2)-(2) 手術及び筋サンプル採取

マウスは 2.0% イソフルラン吸入麻酔下で，両側の腓腹筋およびヒラメ筋を外科的に切除した。Sham 群は麻酔下で下腿を切開し，腓腹筋およびヒラメ筋を切除することなく再縫合した。14 日後，2.0% イソフルラン吸入麻酔下で両側の足底筋を摘出し，液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し，-80 °C で保存した。処置の完了後，マウスは頸椎脱臼により安楽死させた。摘出した足底筋は一方をタンパク質合成量の測定に，他方を免疫組織化学染色に用いた。

### II-2-2)-(3) RNA およびタンパク質の抽出

Total RNA は RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出した Total RNA は分光光度法 ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) を用いて定量した。なお，260nm と 280nm の吸光度の比を求め，2.02 から 2.04 の間であることを確認した。また，タンパク質抽出のために筋サンプルを氷冷した RIPA buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH, 7.6], 1 mM PMSF, 5 mM benzamide, 1 mM EDTA, 5 mM N-ethylmaleimide, 50 mM NaF, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1x protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque]) でホモジナイズし，4 °C で 16,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した上清を実験に用いた。タンパク質濃度は，BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

#### II-2-2)-(4) ウェスタンブロッティング

抽出したタンパク質サンプルは、ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL; ATTO) を用いて SDS 電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンはブロッキング buffer (LI-COR Biosciences) でブロッキングし、各 1 次抗体の希釈液と共に 4 °C で一晩反応させた後、2 次抗体希釈液と共に室温で 2 時間反応させた。抗体複合体は Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) を用いて定量した。なお、使用した抗体は別表に示した (表 1)。

#### II-2-2)-(5) タンパク質合成量の測定

足底筋内のタンパク質合成量は、抗生物質の一種であるピューロマイシンを用いた SUnSET 法によって測定した<sup>39,52</sup>。体内に投与されたピューロマイシンは、細胞内で新たに合成されたタンパク質に取り込まれるため、足底筋内のピューロマイシン量はピューロマイシン投与後のタンパク質合成量と正比例する。本研究では体重 1g あたり 0.04 $\mu$ mol のピューロマイシンを 100 $\mu$ l の PBS に溶解させてマウスに腹腔内注射し、その 30 分後に足底筋を摘出して液体窒素中で急速凍結させた。その後、抗ピューロマイシン抗体を用いたウェスタンブロッティングによって足底筋内のピューロマイシン量を測定した。なお、ピューロマイシンはあらゆる分子量のタンパク質に取り込まれるため、ピューロマイシンを検出するバンドは複数の分子量において出現する。

#### II-2-2)-(6) 免疫組織化学染色

抽出した足底筋は、免疫組織化学染色のために筋腹最大膨隆部を厚さ 10 $\mu$ m の凍結切片とした。切片は 4.0% PFA で固定した後、0.1% TritonX-100 で透過処理し、1.0% BSA でブロッキングした。その後、抗ラミニン抗体を用いてラミニンを染色し、蛍光染料を含む 2 次抗体 Alexa Fluor 568 で反応させた。その後、OlympusIV73 システム及び顕微鏡操作ソフトウェア cellSens (Olympus Corporation) を用いてラミニン染色画像を撮影した。画像分析ソフトウェア WinROOF (三谷商事) を用いて、この画像のラミニン染色部位を基底膜、すなわち筋線維の輪郭とみなし、筋線維横断面積を測定した。その際は各群 3 匹ずつ、1 サンプルあたり 300~400 本程度の線維を分析した。その際には複数の画像から重複しない線維を無作為に選択すると共に、形状が崩れた筋線維や細胞間質を除外した。

## II-2-2)-(7) 群分けと統計処理

マウスは WT マウスと Akt1 KO マウスのそれぞれにおいて、外科的手術で足底筋に負荷をかけた Overload (OV) 群と Sham 群を設定した。これによりマウスは WT/Sham, WT/OV, KO/Sham, KO/OV の 4 群に分けられた。マウスの死亡などに備え WT/Sham 群は 10 匹, WT/OV 群は 8 匹, KO/Sham 群は 9 匹, KO/OV 群は 7 匹確保し、その中から無作為に各群 6 匹を分析に用いた。ただし体重比較に関してのみ、WT/Sham 群の 10 匹と KO/Sham 群の 9 匹を比較した。全ての結果は平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較には対応の無い t 検定を用いた。4 群間の比較には WT マウスか Akt1 KO マウスか、OV 群か Sham 群かの 2 要因で二元配置分散分析を実施し、事後検定として Tukey の多重比較検定を用いた。全ての検定において有意水準は 5% とした。

## II-2-3) 結果

### II-2-3)-(1) Akt1 の欠損で運動負荷による骨格筋の肥大適応は抑制される

体重を図 5 に示す。体重は WT マウスで  $22.93 \pm 0.34\text{g}$ , KO マウスで  $20.98 \pm 0.48\text{g}$  となっており、Akt1 の欠損により体重の減少が認められた。そのため、足底筋重量を分析する際には体重で除することで補正した。足底筋重量を図 6 に、補正足底筋重量を図 7 に示す。補正足底筋重量は WT/Sham 群で  $0.62 \pm 0.01\text{mg/g}$ , WT/OV 群で  $1.37 \pm 0.06 \text{ mg/g}$ , KO/Sham 群で  $0.58 \pm 0.02 \text{ mg/g}$ , KO/OV 群で  $1.11 \pm 0.03 \text{ mg/g}$  となっており、WT 群, KO 群共に運動負荷によって補正足底筋重量が増加している。つまり、Akt1 の欠損があっても運動負荷の増大によって筋肥大が起きることが確認できる。ただし、WT 群では運動負荷による増加が 2.20 倍、KO 群では運動負荷による増加が 1.91 倍であり、Akt1 の欠損によって肥大応答が抑制されていることが分かる。

足底筋線維横断面の免疫染色像を図 8 に、足底筋線維横断面積の度数分布図を図 9 に、足底筋線維横断面積平均値を図 10 に示す。図 8 で示すように、WT 群, KO 群共に、運動負荷によって足底筋線維横断面積が増加している。図 9 で示すように、筋線維横断面積の度数分布を示す折れ線グラフは運動負荷によって右の方へ動いており、これは面積の大きな足底筋線維が増え、面積の小さな足底筋線維が減っていること、すなわち肥大適応していることを表す。また、Akt1 欠損により折れ線グラフは左の方へ動いており、肥大適応が抑制されていることが分かる。筋線維横断面積平均値についても、WT/Sham 群で  $1078.9 \pm 66.3\mu\text{m}^2$ , WT/OV 群で  $1813.4 \pm 113.5\mu\text{m}^2$ , KO/Sham 群で  $837.1 \pm 52.3\mu\text{m}^2$ , KO/OV 群で

1236.4 ± 65.6 $\mu\text{m}^2$ となっており，WT 群，KO 群共に運動負荷によって筋線維横断面積が増加している．また，運動負荷による筋線維横断面積の増加は WT 群で 1.68 倍，KO 群で 1.48 倍となっており，Akt1 の欠損により肥大応答が抑制されていることを示している．

#### II-2-3)-(2) Akt1 の欠損で Akt2 および Akt3 の機能的代償は起こらない

各 Akt アイソフォームのウエスタンブロッティングの典型像を図 11 に，Akt1 の定量結果を図 12，Akt2 の定量結果を図 13，Akt3 の定量結果を図 14，pan-Akt の定量結果を図 15 に示す．WT 群では，運動負荷によって各 Akt アイソフォームのタンパク質発現量がいずれも有意に増加した．KO 群では，Akt1 の発現は認められず，Akt2 の発現は運動負荷をかけても変化がなく，Akt3 の発現は WT マウスと同程度に有意に増加した．つまり，いずれの Akt アイソフォームにおいても，Akt1 の欠損によって発現量が増加することはないと確認できた．また，全ての Akt アイソフォームを同時に検出する pan-Akt においても，Akt1 の欠損によって発現量が有意に減少していた．これらのことから，Akt1 の欠損によって，Akt2 及び Akt3 の発現量が代償的に増大しないと確認された．

#### II-2-3)-(3) 運動負荷による mTOR 系の活性化および筋タンパク合成は Akt1 非依存的に起こる

総 RNA 発現量を図 16 に，SUnSET 法によるウエスタンブロッティングの典型像を図 17 に，定量化した結果を図 18 に示す．WT 群，KO 群共に，運動負荷によって転写された RNA 量及び翻訳によるピューロマイシンの筋への取り込み量が増加している．つまり，Akt1 が欠損していても運動負荷によってタンパク質合成が増加することが確認された．

また，シグナル伝達で mTOR の下流因子である分子のウエスタンブロッティングの典型像を図 19 に，phos-S6K1 (Thr389) の定量結果を図 20，phos-S6K1 (Thr421/Ser424) の定量結果を図 21，phos-rpS6 (Ser235/236) の定量結果を図 22，phos-rpS6 (Ser240/244) の定量結果を図 23，phos-4E-BP1 (Thr37/46) の定量結果を図 24，phos-NDRG1 (Thr346) の定量結果を図 25 に示した．phos-S6K1 (Thr389)，phos-S6K1 (Thr421/Ser424)，phos-rpS6 (Ser235/236)，phos-rpS6 (Ser240/244)，phos-4E-BP1 (Thr37/46) は mTORC1 の下流因子であり，特に phos-S6K1 (Thr389) の発現量は mTORC1 の活性を直接的に示す指標となる．同様に，phos-NDRG1 (Thr346) は mTORC2 の下流因子であり，phos-NDRG1 (Thr346) の発現量は mTORC2 の活性を表す．WT 群，KO 群共に運動負荷によってこれらの発現量は増加して

おり, Akt1 が存在しなくとも, 運動負荷により mTOR 系は活性化することが確認できた.

次に, Akt/mTOR 系の関連因子のウエスタンブロッティングの典型像を図 26 に, phos-GSK3 $\beta$  (Ser9) の定量結果を図 27, phos-PRAS40 (Thr246) の定量結果を図 28, phos-MEK1/2 (Ser217/221) の定量結果を図 29, phos-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の定量結果を図 30, total-REDD1 の定量結果を図 31 に示す. これらの分子は Akt1 からの刺激入力を受けたり, タンパク質合成を制御するものである. WT 群, KO 群共に運動負荷によってこれらの分子が活性化していることから, 運動負荷による Akt/mTOR 系の活性化やタンパク質合成量の変化は, Akt1 の欠損によって影響を受けないことが分かる.

これらの結果から, 運動負荷による mTOR 系の活性化およびタンパク質合成の促進は, Akt1 非依存的であることが示された.

II-2-3)-(4) 運動負荷によるタンパク質分解系の変化は Akt1 非依存的に起こるタンパク質分解のオートファジー系に関わる分子として, LC3 と p62 のウエスタンブロッティングの典型像を図 32 に, LC3 の定量結果を図 33, p62 の定量結果を図 34 に示す. WT 群, KO 群共に, 運動負荷によって LC3II/I の比率が低下し, p62 の発現量が増加している. LC3II/I の比率と p62 の発現量はオートファジー系の活性を示すマーカーとなっており, LC3II/I の比率が上がることや p62 の発現量が減少することは, オートファジー活性が上昇していることを示す. このことから, WT 群, KO 群共に運動負荷によってオートファジー系の活性が抑制されていることが確認できる.

タンパク質分解のユビキチン-プロテアソーム系に関わる分子として, ユビキチン化されたタンパク質のウエスタンブロッティングの典型像を図 35 に, ユビキチン化されたタンパク質の定量結果を図 36 に示す. ユビキチン化されたタンパク質量の増加は, ユビキチン-プロテアソーム系の活性が上昇していることを示す. WT 群, KO 群共に, 運動負荷によってユビキチン-プロテアソーム系が賦活されており, Akt1 の欠損によりユビキチン-プロテアソーム系の賦活に影響は出ていない.

次に, 細胞のアポトーシスに関わる分子として, Caspase3 および PARP1 のウエスタンブロッティングの典型像を図 37 に, Caspase3 の定量結果を図 38 に示す. なお, WT 群, KO 群のサンプルに加え, プロテインキナーゼ阻害薬である STS1 $\mu$ l でインキュベーションしたマウス筋芽細胞 (C2C12) をアポトーシスのポジティブコントロールとして示している. STS は Caspase3 の活性化を起こすためアポトーシスの誘導に利用されている. 活性化型

Caspase3 の増加はアポトーシスの活性が高まっていることを示す。WT 群, KO 群共に, 運動負荷によって不活性型の Caspase3 は増加しているものの, 活性型の Caspase3 は検出されなかった。このことから, 本実験においてマウス骨格筋にアポトーシスの顕著な発生は認められないことが分かる。

これらの結果をまとめると, WT 群, KO 群共に運動負荷によってオートファジー系は抑制されていた。また, WT 群, KO 群共にユビキチン-プロテアソーム系は運動負荷によって活性が高まっていた。また, 運動負荷によって不活性型の Caspase3 は発現が増大したものの, 活性型の Caspase3 は発現が認められず, アポトーシスの顕著な発生はないことが確認された。つまり, Akt1 の欠損によってタンパク質分解系が Akt1 存在下よりも賦活することはなかった。

#### II-2-4) 考察

Akt1 の欠損によって, 補正足底筋重量と足底筋線維横断面積は増加が抑制され, 足底筋線維断面積の度数分布は面積の小さな筋線維の数が多くなっている。これらの結果から, Akt1 が欠損している状況においては, 運動負荷による骨格筋の肥大適応が抑制される, つまり, 運動負荷による骨格筋の肥大適応は Akt1 が重要な役割を果たすことが分かった。

また, Akt2 および Akt3 の発現量について, Akt1 の欠損による代償的な増加は認められない。これについて, Akt1, Akt2, Akt3 の 3 種類のアイソフォームがある。これらは非常に類似した構造を持つが, Akt1 は筋芽細胞分化やタンパク質合成<sup>33, 34)</sup>, Akt2 はグルコース代謝<sup>33, 35-37)</sup>, Akt3 は脳の発達<sup>33)</sup>に関わるため, 生体内で異なる働きを担っている。また, Akt1 及び Akt2 は成熟骨格筋で多く発現することが分かっている。このように, 機能や発現部位は異なること, Akt1 の KO によって Akt2 および Akt3 が代償的な増加をしていないことが確認できた。ただし, Akt2 および Akt3 による Akt1 の機能的代償を確実に防ぐには, これらのアイソフォームを同時に KO したマウスを使用する必要がある。しかし, Akt1/2 の KO マウスは出産直後に死亡してしまう<sup>53)</sup>。また, Akt1/3 の KO マウスは胚性致死となってしまう<sup>54, 55)</sup>。このため, 全身ではなく骨格筋特異的に複数の Akt アイソフォームを KO したマウスなどで mTOR の活性化およびタンパク質合成と骨格筋肥大を確認することが今後の課題と言える。

加えて, Akt1 の欠損はオートファジー系やユビキチン-プロテアソーム系の変化と無関係であって, また, 本研究では Akt1 の有無に関わらずアポトーシスの顕著な発生は起き

ていない。これらのことから、Akt1 の欠損によって骨格筋の肥大適応が抑制されたのは、タンパク質分解系やアポトーシスが活性化したためではないことが分かる。

これまで IGF-1/Akt は、mTOR 系の活性化を介したタンパク質合成の促進によって、骨格筋肥大を調節すると考えられてきた<sup>14, 16-20)</sup>。しかし、本研究では Akt1 が欠損している状況においても、運動負荷によって mTOR 系が活性化され、タンパク質合成が促進されている。つまり、今回観察された Akt1 の欠損による骨格筋の肥大適応の抑制は、mTOR 系の活性化やタンパク質合成量が原因ではないことが分かる。

運動負荷による骨格筋肥大には、mTOR 系の活性化によるタンパク質合成の促進が重要である<sup>5)</sup>。そして、タンパク質合成により筋線維の体積が増加するにあたり、筋核ドメインが一定になるよう筋核数が増加することも骨格筋肥大には重要である<sup>44)</sup>。筋核数の増加をもたらす要因として筋衛星細胞があり、運動負荷による骨格筋の肥大適応に重要な役割を果たすと言われている<sup>45-47, 51)</sup>。これらのことから、今回観察された Akt1 の欠損による骨格筋の肥大適応の抑制は、筋衛星細胞の機能不全によって筋核数の増加が抑えられたことが原因となっている可能性がある。

本研究では Akt1 が欠損している状況においても、運動負荷によって mTOR 系が活性化することが明らかになった。mTOR 系の活性化には IGF-1/Akt が重要な役割を担うと考えられてきたが<sup>14, 16-20)</sup>、近年では運動負荷による mTOR 系の活性化に、IGF-1/Akt 非依存的な経路が重要な役割を果たすとする説が出されており<sup>31, 32)</sup>、コンセンサスは得られていない。それを明らかにするため、Akt1 が欠損している状況において運動負荷による mTOR 系の活性化を検証したが、本研究は mTOR 系の活性化に IGF-1/Akt 非依存的な経路が重要な役割を果たすとする説を支持している。ただし、運動負荷において IGF-1/Akt 非依存的に mTOR を活性化する経路の特定には至っていない。運動負荷において Akt 非依存的に mTOR 系を活性化させる因子の一例としては PA があるが<sup>28, 29)</sup>、本研究では PA を介した経路の活性化は検討していない。今後は PA の機能を抑制したモデルを作り出し運動負荷によって mTOR 系が活性化するかを検討するなどし、mTOR の上流因子のどれが重要な役割を果たすかを明らかにしていく研究が望まれる。

## II-2-5) 結論

Akt1 が欠損しても、運動負荷による mTOR 系の活性化と骨格筋の肥大適応は起こることが明らかになった。つまり、運動負荷による mTOR 系の活性化は Akt 非依存的な経路が



重要な役割を持つことが示唆された。

また、Akt1 が欠損すると、タンパク質合成系以外の要因で骨格筋肥大が一部抑制されることが分かった。mTOR 系によるタンパク質合成促進以外で筋肥大を制御する因子としては筋衛星細胞による筋核数の増加がある。そこで、Akt1 の欠損によって筋衛星細胞が機能不全となるかを検証することを次の研究課題とする。

## II-3 運動負荷による骨格筋の肥大適応における筋衛星細胞の増殖機構に関する研究

### II-3-1) 序論

#### II-3-1)-(1) 研究目的

本研究は、Akt1 が筋衛星細胞の機能制御によって骨格筋肥大を調節するかを検証することを目的とした。

#### II-3-1)-(2) 研究仮説

Akt1 がタンパク質合成系非依存的に骨格筋肥大を調節する経路として、筋衛星細胞による筋核数の増加が関与している。すなわち、Akt1 の欠損によって、筋衛星細胞に機能不全が起こり、運動負荷による骨格筋の筋核数の増大や肥大適応が抑制されると予測される。その場合、Akt1 は筋衛星細胞の機能調節によって骨格筋肥大を制御していることが明らかになる。

### II-3-2) 方法

#### II-3-2)-(1) 実験動物

実験動物については前章の I と同様とする。

#### II-3-2)-(2) 手術及び筋サンプル採取

マウスは 2.0% イソフルラン吸入麻酔下で、両側の腓腹筋およびヒラメ筋を外科的に切除した。Sham 群は麻酔下で下腿を切開し、腓腹筋およびヒラメ筋を切除することなく再縫合した。新生した細胞の検出は、BrdU を用いて行った。BrdU は新たに DNA が合成される際にチミジンアナログとして取り込まれる特徴を持ち、BrdU 投与後に DNA 合成が盛んとなっている細胞核は BrdU 陽性となる。BrdU の投与は術直後から筋サンプル摘出までの間、0.8 mg/ml の濃度で飲料水に混入する方法を用いた<sup>42,55)</sup>。術直後から 14 日後、2.0%

イソフルラン吸入麻酔下で足底筋を摘出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。処置の完了後、マウスは頸椎脱臼により安楽死させた。

#### II-3-2)-(3) 免疫組織化学染色

摘出した足底筋は、免疫組織化学分析のために厚さ  $10\mu\text{m}$  の凍結切片とした。切片は 4.0% PFA で固定した後、0.1% TritonX-100 で透過処理し、クエン酸ナトリウム (10mM, pH,6.5) を用いて  $92^{\circ}\text{C}$  で 20 分間加熱し抗原賦活を実施した。その後、2N HCl で 20 分間 DNA を加水分解し、ホウ酸ナトリウム緩衝液 (100mM, pH,8.5) で中和した。次いで、内在性マウス免疫グロブリンをマウスオンマウスブロッキング試薬 (VECTOR) でブロッキングした。その後、抗ジストロフィン抗体、抗 Pax7 抗体、抗 BrdU 抗体で反応させた後、蛍光染料を含む 2 次抗体 Alexa Fluor 568 および Alexa Fluor 488 で反応させたによる共染色を行った。画像撮影については前章の I と同様とする。

#### II-3-2)-(4) 中心核を持つ筋線維数と筋線維あたりの筋核数の計測

画像分析ソフトウェア WinROOF (三谷商事) を用いて、全サンプルの筋全体の筋線維横断面画像において、ジストロフィンの局在を筋線維の細胞膜と見なし、筋線維の中に含まれる筋核数を計測した。また、中心核を持つ細胞として、核が細胞膜近辺から離れ細胞の中心に位置する筋線維数を計測した。

#### II-3-2)-(5) 新たに増殖した筋衛星細胞数の計測

画像分析ソフトウェア WinROOF (三谷商事) を用いて、全サンプルの筋全体の筋線維横断面画像において、Pax7, BrdU, DAPI 全てが陽性である核を新たに増殖した筋衛星細胞の核とみなし、その数を計測した。

### II-3-3) 結果

#### II-3-3)-(1) Akt1 欠損は骨格筋線維の筋核数増加を抑制する

ジストロフィンと DAPI の共染色画像を図 39 に、中心核を持つ筋線維の割合を図 40 に示す。WT 群, KO 群共に通常状態では中心核を持つ筋線維は認められないが、運動負荷によって中心核の発生が確認できた。中心核を持つ筋線維の割合は、WT/OV 群で  $6.75 \pm 2.95\%$  , KO/OV 群で  $2.25 \pm 0.79\%$  となっており有意差は無かった。

筋線維あたりの筋核数を図 41 に示す。筋細胞あたりの筋核数は WT/Sham 群で  $1.14 \pm 0.04$  個, WT/OV 群で  $3.87 \pm 0.20$  個, KO/Sham 群で  $1.01 \pm 0.05$  個, KO/OV 群で  $2.33 \pm 0.12$  個となっており, WT 群, KO 群共に運動負荷によって増加している。ただし, WT 群では運動負荷によって 3.39 倍, KO 群では運動負荷によって 2.30 倍の増加となっており, Akt1 の欠損によって筋細胞あたりの筋核数の増加が鈍化している。このことから, Akt1 の欠損は筋衛星細胞の筋核数の増加を抑える可能性がある。

#### II-3-3)-(2) Akt1 欠損は筋衛星細胞の増殖を抑制する

Pax7, BrdU, DAPI の共染色画像を図 42 に, Pax7, BrdU, DAPI 全てが陽性である核の数, すなわち新たに増殖した筋衛星細胞の数を図 43 に示す。WT 群, KO 群共に, 定常状態では筋衛星細胞の増殖がほぼ起こっていないが, 運動負荷によって筋衛星細胞が活発に増殖している。また, Akt1 の欠損によって, 運動負荷による筋衛星細胞の増殖が抑制されていることが分かる。筋衛星細胞は, 筋の損傷や運動負荷などの刺激によって活性化し, 増殖, 分化して筋線維と融合することでその機能を果たす。Akt1 の欠損によって筋衛星細胞の増殖が抑えられていることは, Akt1 がなければ筋衛星細胞の機能不全が起こることを示している。

#### II-3-4) 考察

骨格筋に運動負荷をかけた際に, Akt1 が欠損していると中心核を持つ筋線維が減少する, つまり筋線維の損傷からの回復過程あるいは筋肥大の過程が鈍化する傾向にあることが分かった。筋衛星細胞は筋線維の修復や肥大を促す機能を持つ。すなわち, Akt1 は筋衛星細胞の機能を促進することが示唆される。

また, Akt1 の欠損によって, 筋線維あたりの筋核数は増加が鈍化していることが分かった。筋衛星細胞は, 定常状態においては休止期にあるが, 運動負荷によって活性化し増殖, 分化する。その後, 骨格筋細胞と融合して筋核を提供し, 筋線維あたりの筋核数を増加させる。運動負荷による筋核数の増加が抑制されたことは, Akt1 の欠損によって筋衛星細胞の活性化, 増殖, 分化, 融合のいずれかが抑制されていることを示す。これについて, Akt1 が欠損している状況においては, 新たに増殖した筋衛星細胞の数が減少する。つまり, Akt1 の欠損は筋衛星細胞の活性化, 増殖, 分化, 融合といった一連の活動の中で, 活性化か増殖のいずれかを抑制することになる。このことから, Akt1 は運動負荷における筋衛星細

胞の機能を制御する可能性が示唆された。

先行研究では、筋衛星細胞が骨格筋の肥大適応に重要な役割を果たすとする結果と<sup>45-47, 51)</sup>、筋衛星細胞は骨格筋の肥大適応に必ずしも必要ではないとする結果<sup>48-50)</sup>が両方提示されており、現在まで一定のコンセンサスは得られていない。本研究では Akt1 が運動負荷において筋衛星細胞の活性化か増殖のいずれかを制御することが示され、筋衛星細胞が運動負荷における骨格筋肥大に重要な役割を果たすとの説を支持している。ただし、本研究の結果では、Akt1 は筋衛星細胞の活性化と増殖のどちらを制御するかが明らかになっていない。筋衛星細胞の機能活性を目的とした理学療法介入に繋げるためには、この点を明らかにする必要があるため、今後の研究で解明していくことが望まれる。

#### II-3-5) 結論

Akt1 は、運動負荷における筋衛星細胞の活性化あるいは増殖を制御することが明らかとなった。Akt1 は mTOR 系によるタンパク質合成促進とは別の経路で骨格筋肥大を調節するが、それは筋衛星細胞の制御を介して行われる可能性が示唆された。ただし、活性化と増殖のどちらを制御するのは明らかになっていない。

#### II-4 総合考察

基礎理学療法、臨床理学療法共に筋肥大は非常に重要な課題として位置づけられる。筋肥大のメカニズムについては、臨床での実践研究のみならず、患者の体内で起こっている現象を解析する分子生物学的な研究も必要である。筋肥大については mTOR 系の寄与が非常に重要であることはコンセンサスを得られている。しかし、運動負荷の際に mTOR 系を活性化する要素の中で、何が重要なのかを明らかにすることは、運動療法による骨格筋肥大の効率を高める一助となり、理学療法の発展へとつながるものである。本研究では、運動負荷による mTOR の活性化に対して Akt1 によるシグナル入力には必ずしも必要ないこと、そして Akt1 は筋衛星細胞の機能を制御して骨格筋の肥大適応を促進することを明らかにした。これらの知見により、筋肥大のメカニズムを明らかにする分子生物学的研究は 1 歩前進することとなった。

本研究で残された課題としては、運動負荷において Akt1 非依存的に mTOR を活性化する因子の解明が挙げられる。IGF-I/Akt 系からの刺激入力は mTOR の活性化を促すが<sup>9, 11-17)</sup>,

運動負荷をかけると IGF-I<sup>26)</sup>および Akt<sup>27)</sup>に依存することなく mTOR が活性化することが先行研究により示唆された。本研究では Akt1 KO のマウスを用いて Akt1 が存在しなくとも運動負荷によって mTOR が活性化することを明らかにしたが、運動負荷によって Akt 非依存的に mTOR を活性化する経路について、どの因子が重要であるかはまだ明らかになっていない。先行研究では PA がその役割を担う可能性が示唆されており<sup>28, 29)</sup>、PA の機能を抑制するモデルで運動負荷における mTOR の活性化が起こるかを確認する研究が望まれる。運動負荷による mTOR の活性化を導く要因で何が重要であるかを解明することは、運動負荷によるタンパク質合成促進および筋肥大効果を臨床応用することにつながるため、理学療法の実践において重要な研究となる。また、Akt1 は通常状態にある筋衛星細胞の活性化と、活性化した衛星細胞の増殖のどちらを促進するのも明らかになっていない。筋肥大を目的とした筋衛星細胞に対する介入を臨床応用するためにも、この点の解明が必要となる。筋衛星細胞の活性化のみ、あるいは増殖のみを測定する方法で、Akt1 は活性化と増殖のどちらを制御するのかを明らかにする研究が望まれる。加えて、Akt1 が筋肥大に影響を及ぼすメカニズムについても明らかになっていない点が残る。筋衛星細胞の機能により筋核が増加すれば、筋核からの転写および翻訳が増加し、タンパク質合成が促進されることにつながる。しかし本研究の結果では、Akt1 KO マウスは筋核数が減少しているにもかかわらず、総 RNA 発現量およびタンパク質合成量は変化がなかった。今回の結果では Akt1 非存在下で運動負荷をかけた際に観察された 3 つの現象、すなわち筋核数の増加が抑制されたこと、総 RNA 発現量およびタンパク質合成量は不変であったこと、筋肥大が抑制されたことについて、これらが同時に起こっていることを確認したのみでその因果関係や機序は明らかになっていない。最後に、本研究の結果は運動負荷をかけて 2 週間が経過した時点のみのデータである。2 週間よりも早い時点、あるいは遅い時点でのデータが本研究と同じ結果を示すか異なる結果となるかは本研究では不明である。これらの点について解明が必要となる。

本研究では、細胞内情報伝達機構の観点から骨格筋肥大の機序を解明してきたが、総合考察で整理したようにまだ明らかになっていない点が残っている。これらを解明し、最終的には臨床理学療法での応用に繋げ、理学療法技術が発展していくよう更なる研究が望まれる。

### III 謝辞

実験手技や研究の取り組み方を基礎から丁寧に教えて下さり、最後までご指導して下さいました宮崎先生。本研究には欠かすことのできないマウスの飼育にご協力いただいた動物実験センターの皆様。北海道医療大学大学院の審査会でいつも励ましのお言葉を下さった泉研究科長。本研究の内容を審議して下さいました副査の先生。大学院博士課程への進学を勧めて下さった花川病院リハビリテーション部の岡本部長。博士課程在籍中に就職し、大学院通学のために勤務の調整にご協力下さった東北文化学園大学の先生方。札幌医科大学、札幌医科大学大学博士課程前期で臨床と研究についてご指導下さった指導教官の乾先生。大学院での研究生活の中で共に励まし合ってきた大学院生仲間達。そして臨床で働きながら大学院に通う生活を支えてくれた母。最後に、この研究のために尊い命を捧げてくれたマウス達。これらお世話になった皆様に、最大限の感謝を。

#### IV 引用文献

- [1] 理学療法士及び作業療法士法. 昭和 40 年 6 月 29 日法律第 137 号, 1965.
- [2] Relaix F, Zammit P S (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 139(16), 2845-2856.
- [3] Alan S, James L (1997). *HUMAN HISTOLOGY second Edition*. USA. Times Mirror International Publishers Ltd. [内山安男, 相磯貞和他訳. 人体組織学原著第 2 版. 東京 : 南江堂, (2000), 65-68.].
- [4] Miyazaki M, Esser K A (2009). Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *Journal of Applied Physiology*, 106(4), 1367-1373.
- [5] Goodman C A, Mayhew D L, Hornberger T A (2011). Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cellular signalling*, 23(12), 1896-1906.
- [6] Kim E, Barrett S M, Barman S B, Heddwon L B (2016). *Ganong's Review of Medical Physiology 25th Edition*. USA. McGraw-Hill Education. [岡田泰伸他訳. Lange Textbook シリーズ ギャノン生理学原書 25 版. 東京 : 丸善出版, (2017), 14-22.].
- [7] Laplante M, Sabatini D M (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-293.
- [8] Saxton R A, Sabatini D M (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- [9] Egerman M A, Glass D J (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(1), 59-68.
- [10] Benito M, Valverde A M, Lorenzo M (1996). IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 28(5), 499-510.
- [11] Adams G R, McCue S A (1998). Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *Journal of Applied Physiology*, 84(5), 1716-1722.
- [12] Miyazaki M, McCarthy J J, Esser K A (2010). Insulin like growth factor - 1 - induced

phosphorylation and altered distribution of tuberous sclerosis complex (TSC) 1/TSC2 in C2C12 myotubes. *The FEBS journal*, 277(9), 2180-2191.

- [13] Bodine S C, Stitt T N, Gonzalez M, Kline W O, Stover G L, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence J C, Glass D J, Yancopoulos G D (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*, 3(11), 1014-1019.
- [14] Rommel C, Bodine S C, Clarke B A, Rossman R, Nunez L, Stitt T N, Glass D J (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*, 3(11), 1009-1013.
- [15] Stitt T N, Drujan D, Clarke B A, Panaro F, Timofeyva Y, Kline W O, Glass D J (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell*, 14(3), 395-403.
- [16] Lai K M, Gonzalez M, Poueymirou W T, Kline W O, Na E, Zlotchenko E, Stitt T N, Economides A N, Yancopoulos G D, Glass D J (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9295-9304.
- [17] Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *The FASEB journal*, 23(11), 3896-3905.
- [18] Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux P P, Yoon S O (2014). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene*, 33(13), 1690-1699.
- [19] Yang H, Jiang X, Li B, Yang H J, Miller M, Yang A, Pavletich N P (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552(7685), 368-373.
- [20] Dennis M D, Coleman C S, Berg A, Jefferson L S, Kimball S R (2014). REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci. Signal.*, 7(335), Article No ra68.



- [21] Chen W S, Xu P Z, Gottlob K, Chen M L, Karen S, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Ryo S, Kazuyuki T, Takashi K, Hay Nissim (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development*, 15(17), 2203-2208.
- [22] Liao Y, Grobholz R, Abel U, Trojan L, Michel M S, Angel P, Mayer D (2003). Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer. *International journal of cancer*, 107(4), 676-680.
- [23] Joy J M, Gundermann D M, Lowery R P, Jäger R, McCleary S A, Purpura M, Roberts M D, Wilson S M, Hornberger T A, Wilson J M (2014). Phosphatidic acid enhances mTOR signaling and resistance exercise induced hypertrophy. *Nutrition & metabolism*, 11(1), Article No 29.
- [24] Foster D A, Salloum D, Menon D, Frias M (2014). Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mTOR. *Journal of Biological Chemistry*, Article No jbc-R114.
- [25] Hornberger T A, Stuppard R, Conley K E, Fedele M J, Fiorotto M L, Chin E R, Esser K A (2004). Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B-and growth factor-independent mechanism, *Biochemical Journal*, 380(3), 795-804.
- [26] Spangenburg E E, Le R D, Ward C W, Bodine S C (2008). A functional insulin - like growth factor receptor is not necessary for load - induced skeletal muscle hypertrophy. *The Journal of physiology*, 586(1), 283-291.
- [27] Miyazaki M, McCarthy J J, Fedele M J, Esser K A (2011). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3 - kinase/Akt signalling. *The Journal of physiology*, 589(7), 1831-1846.
- [28] Alan S, James L (1997). *HUMAN HISTOLOGY* second Edition. USA. Times Mirror International Publishers Ltd. [内山安男, 相磯貞和他訳. 人体組織学原著第2版. 東京 : 南江堂, (2000), 21-23.].
- [29] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson Z W,

- Massey D C (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 90(4), 1383-1435.
- [30] Yamada T, Himori K, Tatebayashi D, Yamada R, Ashida Y, Imai T, Wada M (2018). Electrical Stimulation Prevents Preferential Skeletal Muscle Myosin Loss in Steroid-Denervation Rats. *Frontiers in Physiology*, 9, Article No1111.
- [31] Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Hillaire D (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 81(1), 27-40.
- [32] Kim E, Barrett S M, Barman S B, Heddwon L B (2016). Ganong's Review of Medical Physiology 25th Edition. USA. McGraw-Hill Education. [岡田泰伸他訳. Lange Textbook シリーズ ギャノン生理学原書 25 版. 東京：丸善出版, (2017), 53.]
- [33] Gonzalez E, McGraw T E (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle*, 8(16), 2502-2508.
- [34] Rotwein P, Wilson E M (2009). Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 503-511.
- [35] Cho H, Thorvaldsen J L, Chu Q, Feng F, Birnbaum M J (2001). Akt1/PKB  $\alpha$  is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38349-38352.
- [36] Garofalo R S, Orena S J, Rafidi K, Torchia A J, Stock J L, Hildebrandt A L, Coskran T, Black S C, Brees D J, Wicks J R, McNeish J D, Coleman K G (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB  $\beta$ . *The Journal of clinical investigation*, 112(2), 197-208.
- [37] Sakamoto K, Arnolds D E, Fujii N, Kramer H F, Hirshman M F, Goodyear L J (2006). Role of Akt2 in contraction-stimulated cell signaling and glucose uptake in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(5), E1031-E1037.
- [38] Goldberg A L (1967). Work-induced growth of skeletal muscle in normal and hypophysectomized rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 213(5), 1193-1198.

- [39] Goodman C A, Mabrey D M, Frey J W, Miu M H, Schmidt E K, Pierre P, Hornberger T A (2011). Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *Faseb J* 25: 1028-1039.
- [40] Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9(2), 493-495.
- [41] Sambasivan R, Yao R, Kissenpennig A, Van W 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.
- [42] Jackson J R, Mula J, Kirby T J, Fry C S, Lee J D, Ubele M F, Campbell K S, McCarthy J J, Peterson C A, Dupont-Versteegden E E (2012). Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(8), C854- C861.
- [43] Zammit P S, Partridge T A, Yablonka-Reuveni Z (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(11), 1177-1191.
- [44] McCall G E, Allen D L, Linderman J K, Grindeland R E, Roy R R, Mukku V R, Edgerton V R (1998). Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. *Journal of Applied Physiology*, 84(4), 1407-1412.
- [45] Rosenblatt J D, Parry D J (1992). Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *Journal of Applied Physiology*, 73(6), 2538-2543.
- [46] Fleckman P, Bailyn R S, Kaufman S (1978). Effects of the inhibition of DNA synthesis on hypertrophying skeletal muscle. *J Biol Chem*. 253(9):3320-3327.
- [47] Goh Q, Millay D P (2017). Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. *Elife*, 6, Article No e20007.
- [48] McCarthy J J, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui A B, Van Z G (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development*, 138(17), 3657-3666.

- [49] Fry C S, Lee J D, Mula J, Kirby T J, Jackson J R, Liu F, Yang L, Mendias C L, Dupont-Versteegden E E, McCarthy J J, Peterson C A (2015). Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nature medicine*, 21(1), 76-80.
- [50] Lowe D A, Alway S E (1999). Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell and tissue research*, 296(3), 531-539.
- [51] Egner I M, Bruusgaard J C, Gundersen K (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development*, 143(16), 2898-2906.
- [52] Goodman C A, Hornberger T A (2013). Measuring protein synthesis with SUNSET: a valid alternative to traditional techniques?. *Exerc Sport Sci Rev* 41(2): 107-115.
- [53] Peng X D, Xu P Z, Chen M L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen W S, Crawford S E, Coleman K G, Hay N (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development*, 17(11), 1352-1365.
- [54] Tschopp O, Yang Z Z, Brodbeck D, Dümmler B A, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings B A. (2003). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132(13), 2943-2954.
- [55] Yang Z Z, Tschopp O, Di-Poi N, Bruder E, Baudry A, Dümmler B, Wahli W, Hemmings B A (2005). Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B alpha (PKB alpha) and Akt3/PKB gamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol*, 25(23), 10407-10418.
- [53] Horie M, Enomoto M, Shimoda M, Okawa A, Miyakawa S, Yagishita K (2013). Enhancement of satellite cell differentiation and functional recovery in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen treatment. *Journal of Applied Physiology*, 116(2), 149-155.
- [54] Das S, Morvan F, Jourde B, Meier V, Kahle P, Brebbia P, Toussaint G, Glass D J, Fornaro M (2015). ATP citrate lyase improves mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell*

metabolism, 21(6), 868-876.

- [55] Piantadosi C A, Carraway M S, Babiker A, Suliman H B (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circulation research*, 103(11), 1232-1240.

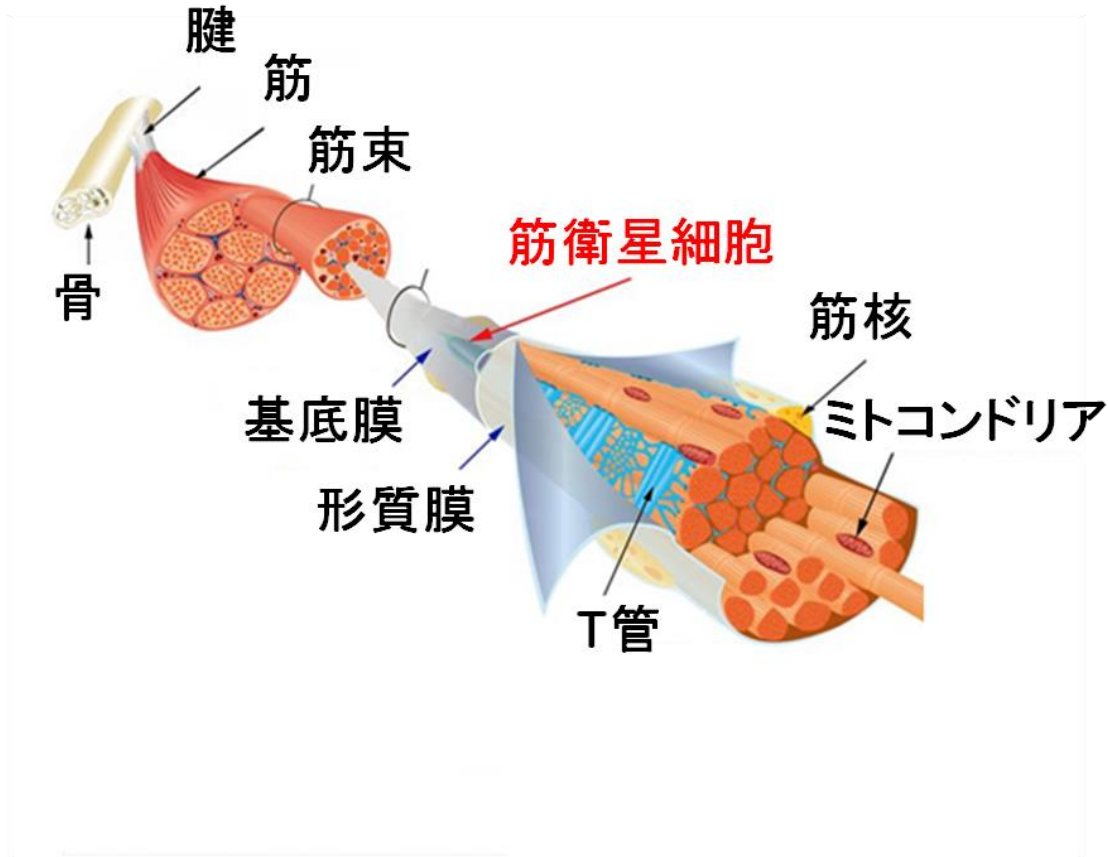
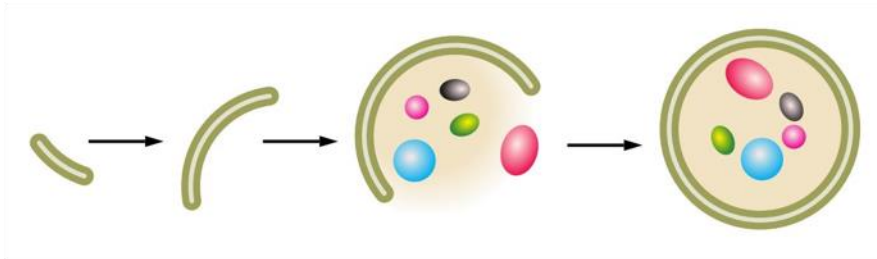


図1 骨格筋の概要図 (文献1より引用, 一部改編)

骨格筋の構造を図に示す。多くの筋原線維が束ねられ形質膜及び基底膜に包まれ筋線維となる。複数の筋線維が結合組織で包まれて筋束となり、筋束が集まって骨格筋となる。筋衛星細胞は、平常時は筋線維の外周部分、形質膜と基底膜の間に存在する。

## A オートファゴソームによる 分解対象の隔離



## B ユビキチン鎖の付加

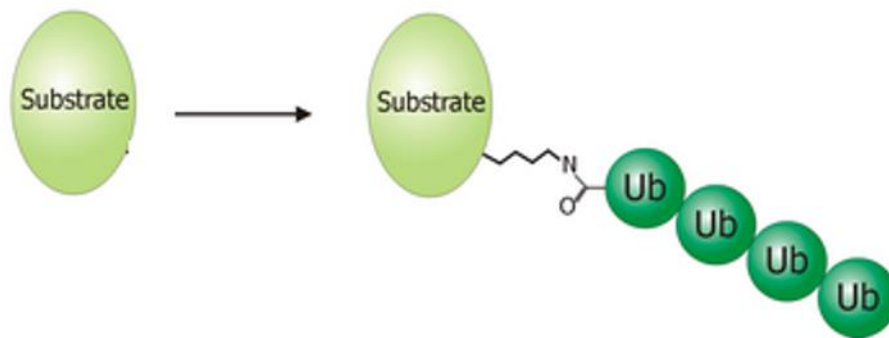


図2 オートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系の模式図

オートファジー系の模式図をA(文献8より引用, 一部改編)に, ユビキチン-プロテアソーム系の模式図をB(Wikipedia[ユビキチン]より引用, 一部改編)に示す.

Aはオートファゴソームが分解の対象となるタンパク質を包み込んでいく様子を示す. 黄土色の円がオートファゴソーム, 様々な色の小さな円が分解対象のタンパク質を表す.

Bは分解の対象となるタンパク質にユビキチン鎖が結合していく様子を示す. 黄緑色の円が分解対象の基質, 緑色の円それぞれがユビキチンを表す.

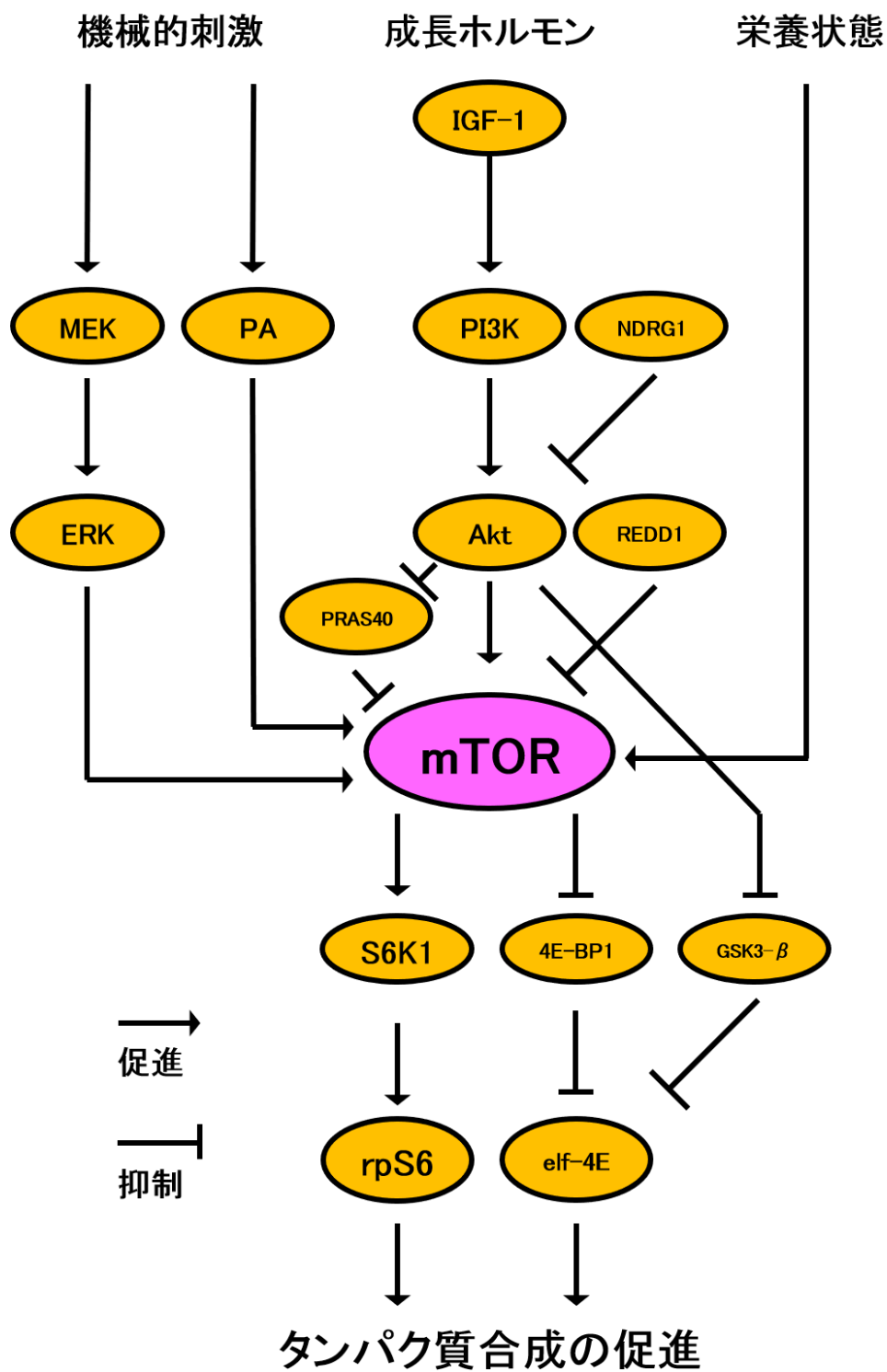


図3 mTORに関する細胞内シグナル伝達カスケード

mTORに関するシグナル伝達のカスケードを示す。各分子は他の分子から促進，あるいは抑制の刺激入力を受け，また他の分子に刺激を送る。それらの刺激は最終的にタンパク質合成を調節する。



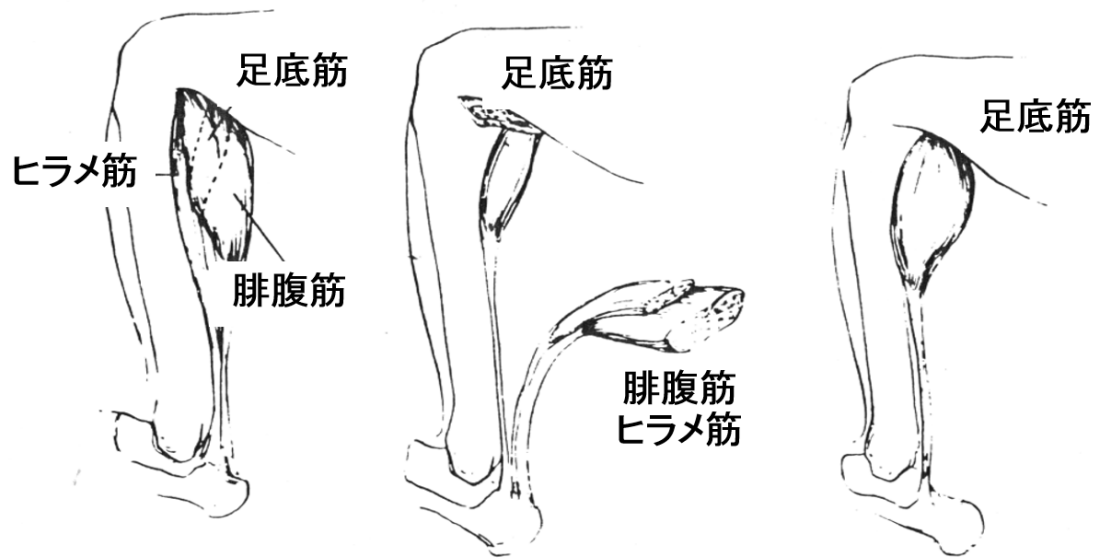


図4 共働筋切除による代償性筋肥大モデル (文献38より引用, 一部改編)

共働筋切除による代償性筋肥大モデルの図を示す。腓腹筋, ヒラメ筋を切除することによって, 足関節底屈筋である足底筋には代償的に活動量の増加が起こり, 運動負荷による骨格筋肥大が発生する。本研究では, 術後の運動負荷増大の期間を2週間としている。

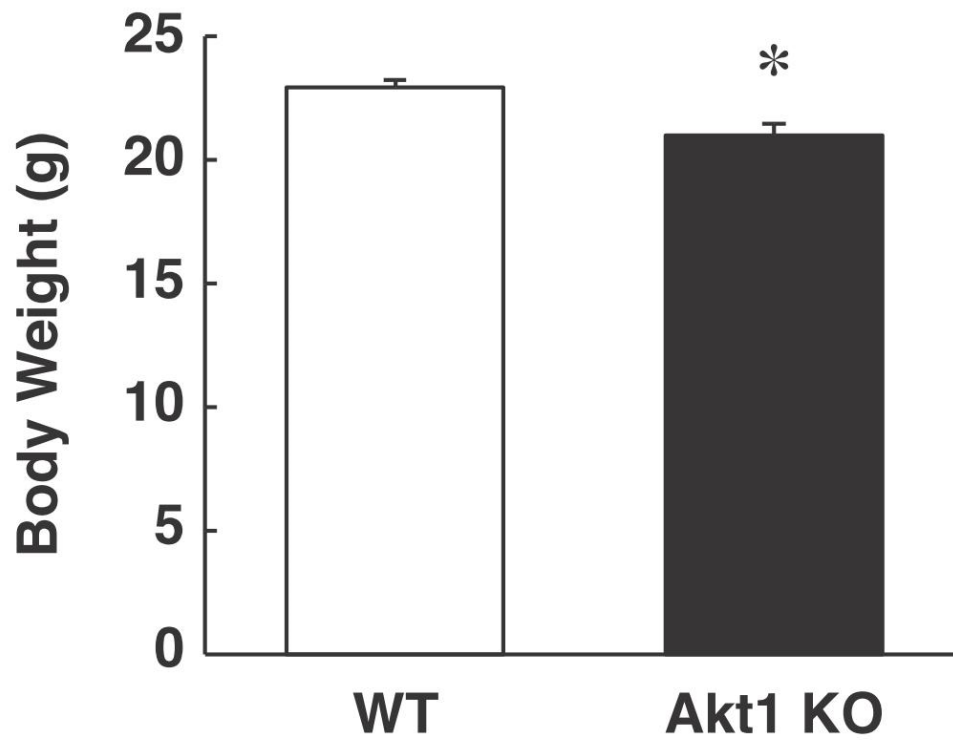


図5 体重

マウスの体重を図に示す. WT 群 (n=10) と KO 群 (n=9) を比較している. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 対応の無い t 検定を実施し, \*は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

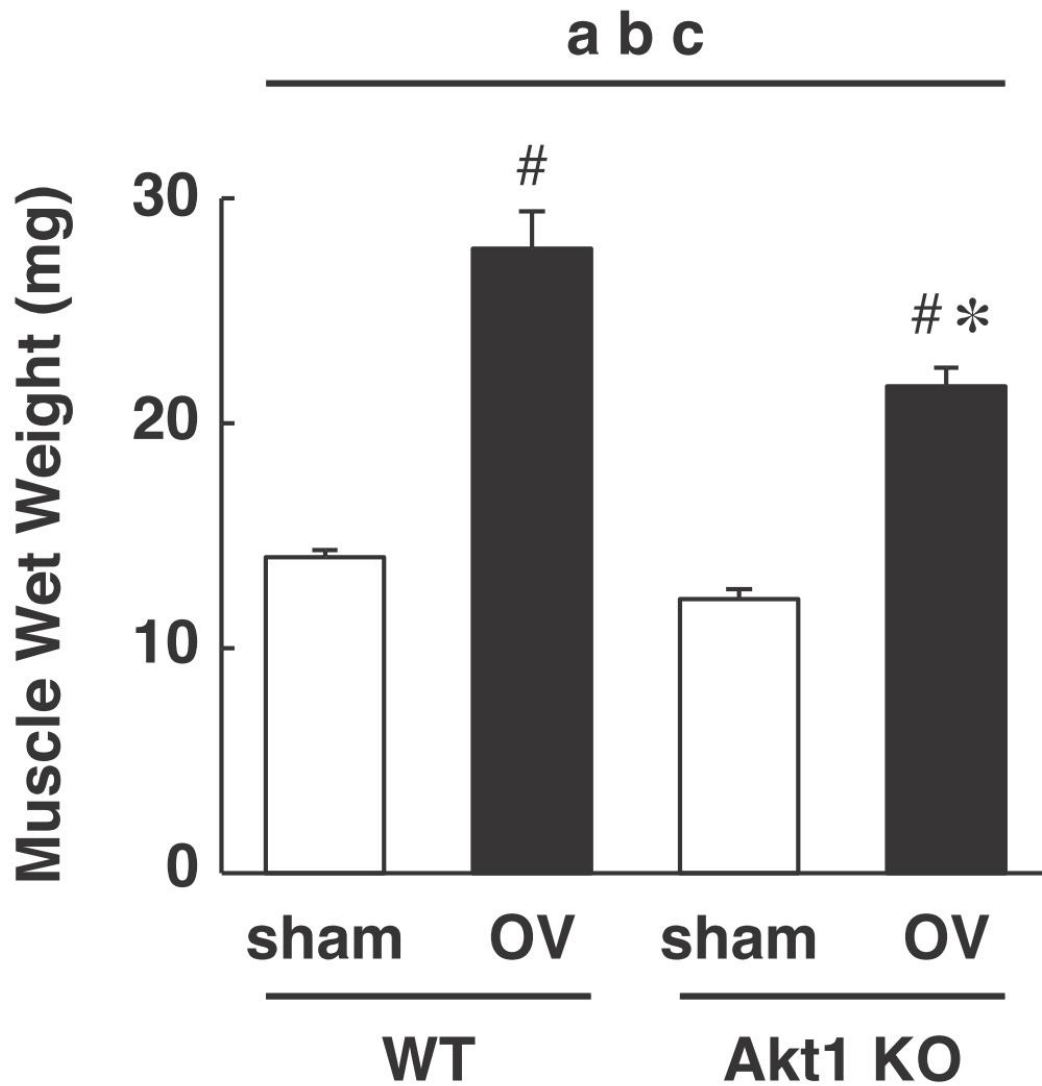


図6 足底筋湿重量

マウスの足底筋湿重量を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, aは WT VS KO, bは sham VS OV の主効果, cは遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, #は sham VS OV, \*は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

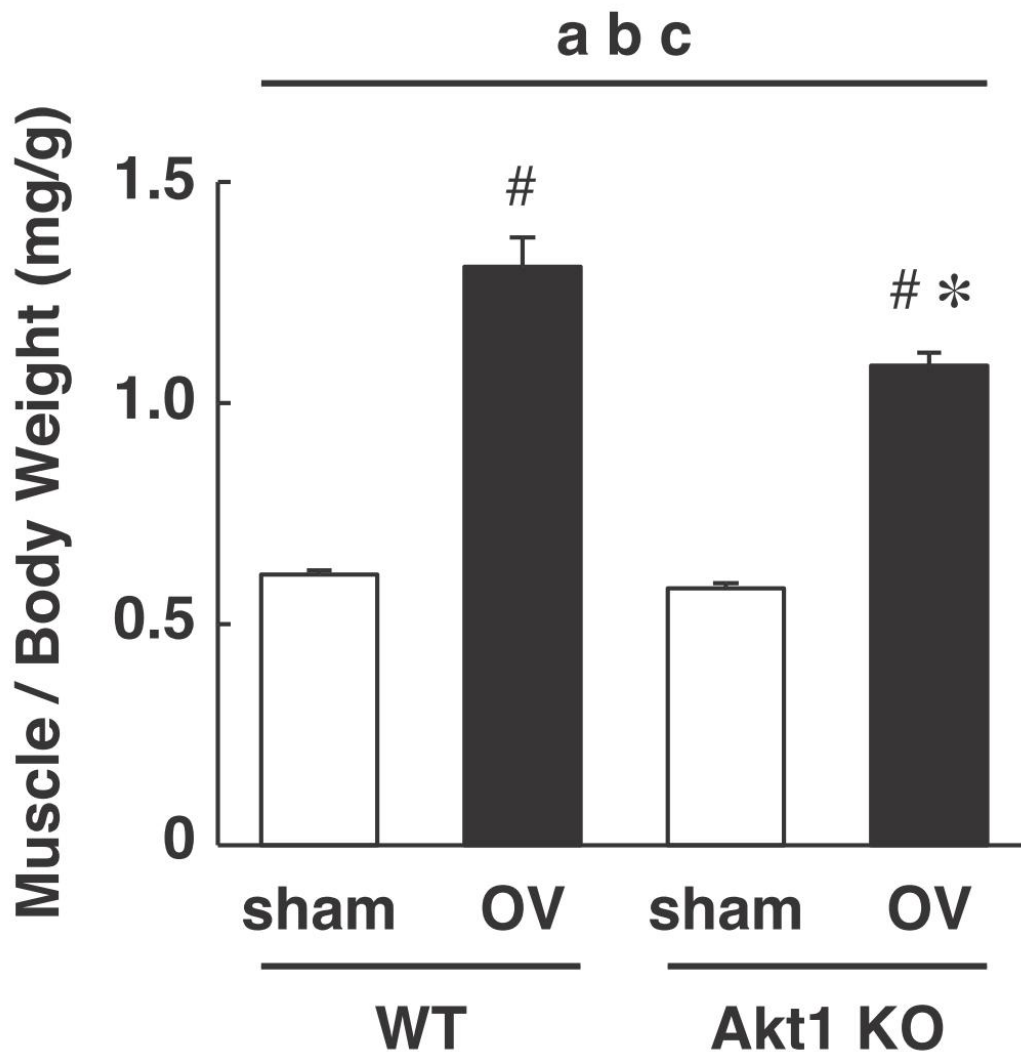


図7 補正足底筋湿重量

マウスの補正足底筋重量を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, a は WT VS KO, b は sham VS OV の主効果, c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV, \* は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

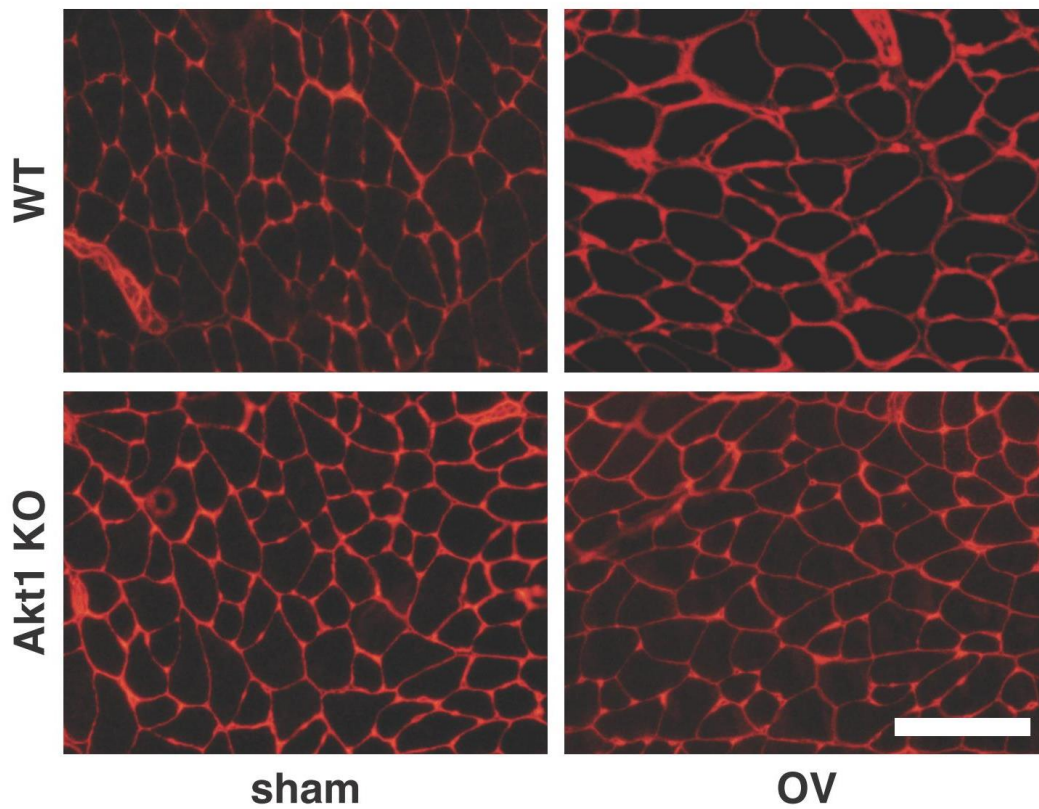


図8 筋線維横断面

マウスの足底筋横断面の免疫染色画像の典型像を図に示す。抗ラミニン抗体および2次抗体によって細胞膜が赤色に染色される。スケールバーは100 $\mu$ mを示す。

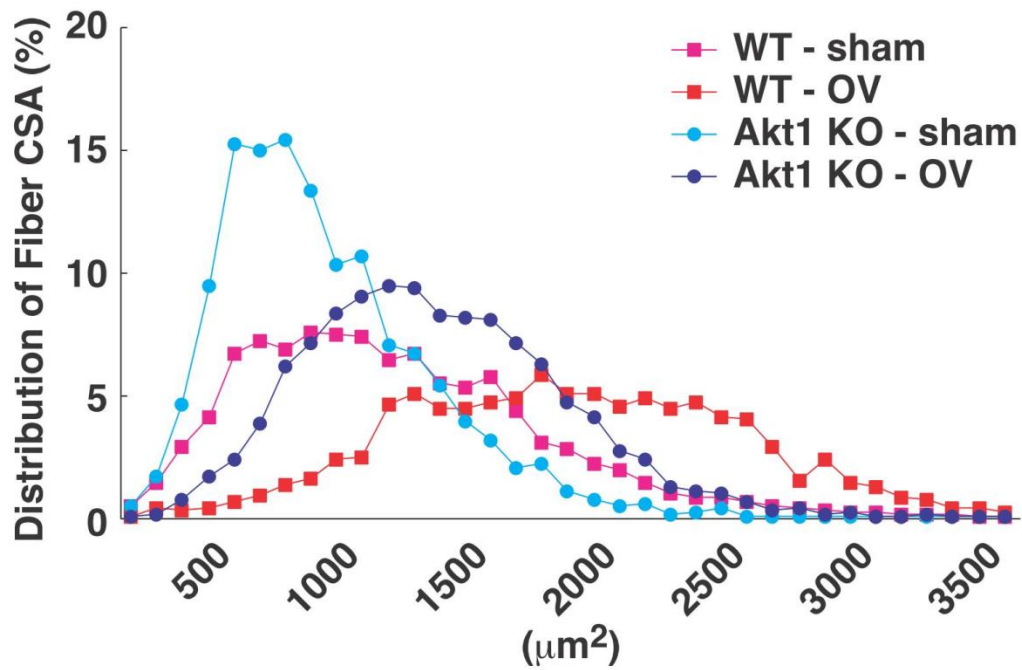


図9 筋線維横断面積度数分布図

マウスの足底筋横断面積の分布の割合を図に示す (各群 n=4). 1 サンプルあたり 300~400 本の筋線維横断面積を分析した. 桃色のグラフは WT/Sham 群, 赤色のグラフは WT/OV 群, 水色のグラフは KO/Sham 群, 青色のグラフは WT/OV 群を表す.

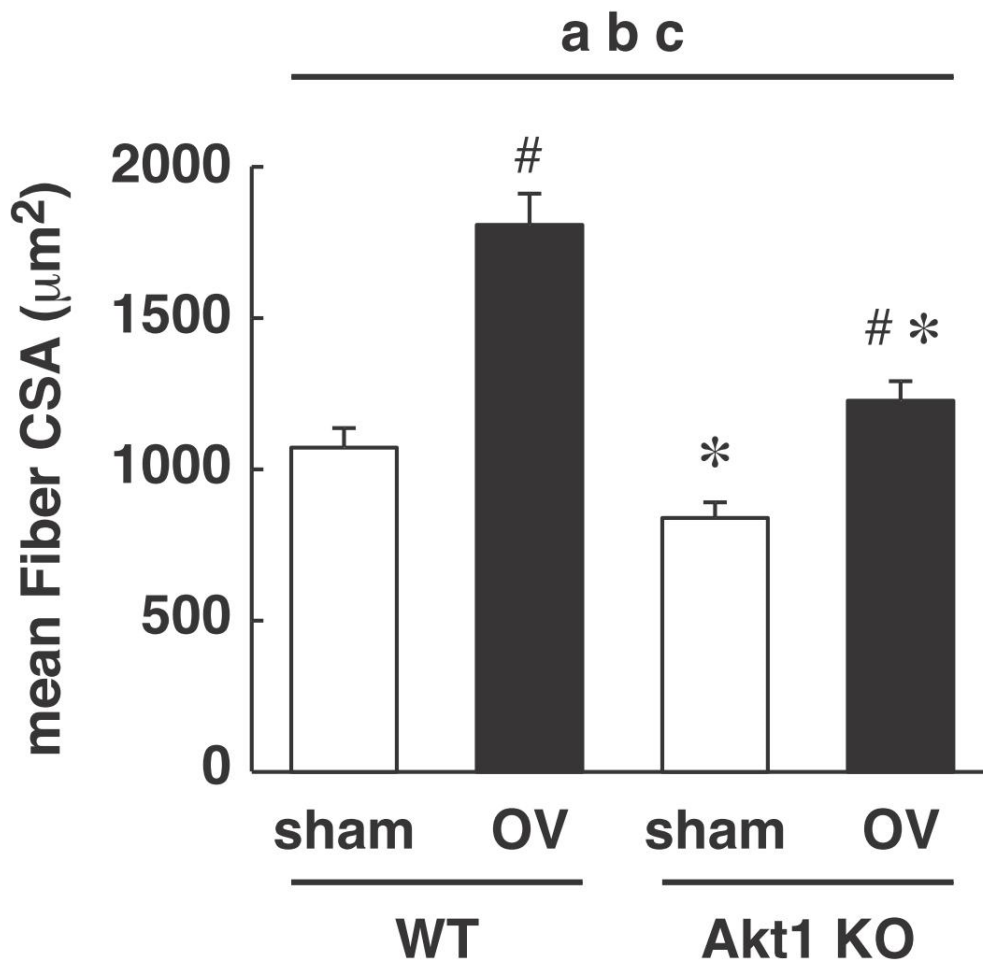


図 10 筋線維断面積

マウスの足底筋横断面積を図に示す (各群 n=4). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, a は WT VS KO, b は sham VS OV の主効果, c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, #は sham VS OV, \*は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

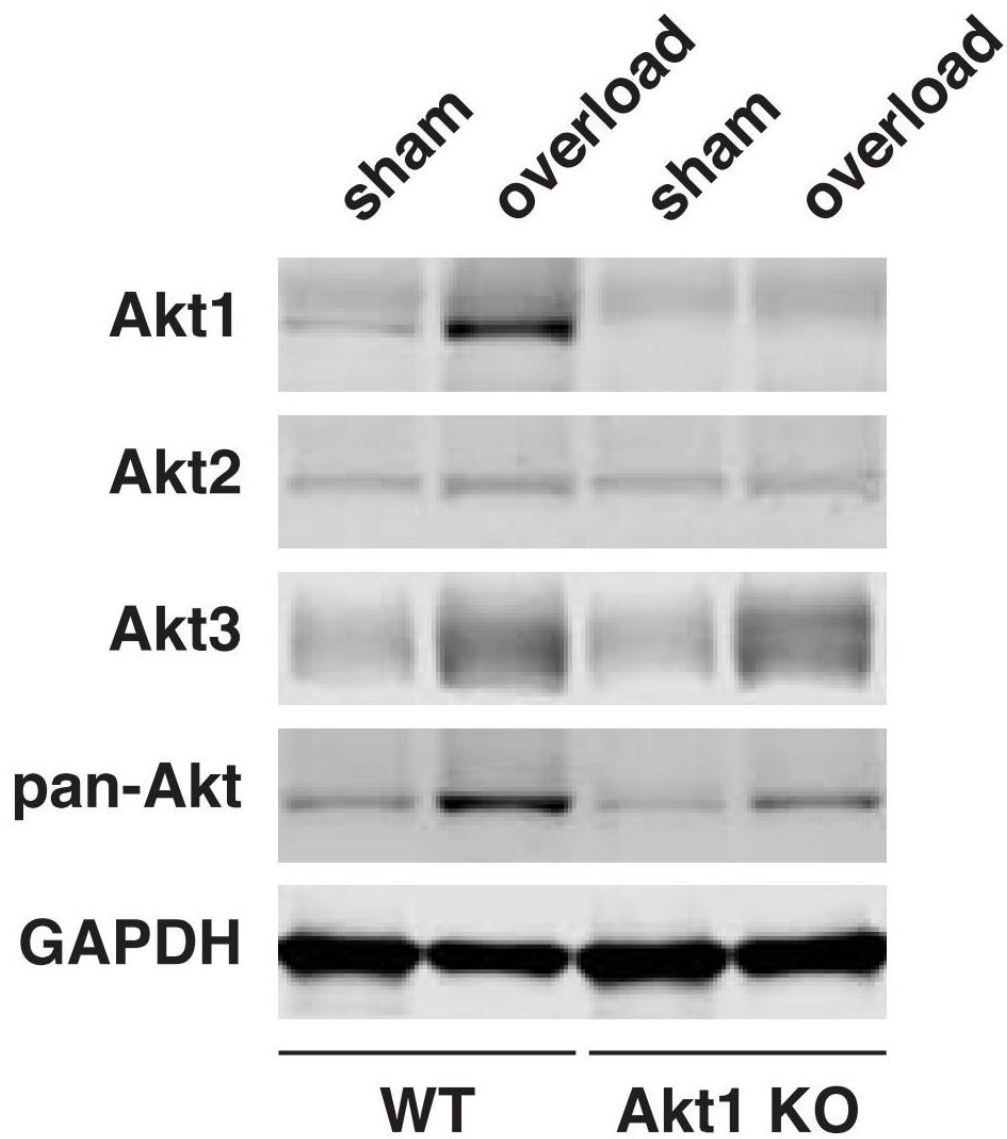


図 11 各 Akt アイソフォームのウエスタンブロッティング典型例

各 Akt アイソフォーム及び pan-Akt のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す。  
GAPDH をローディングコントロールとして使用した。



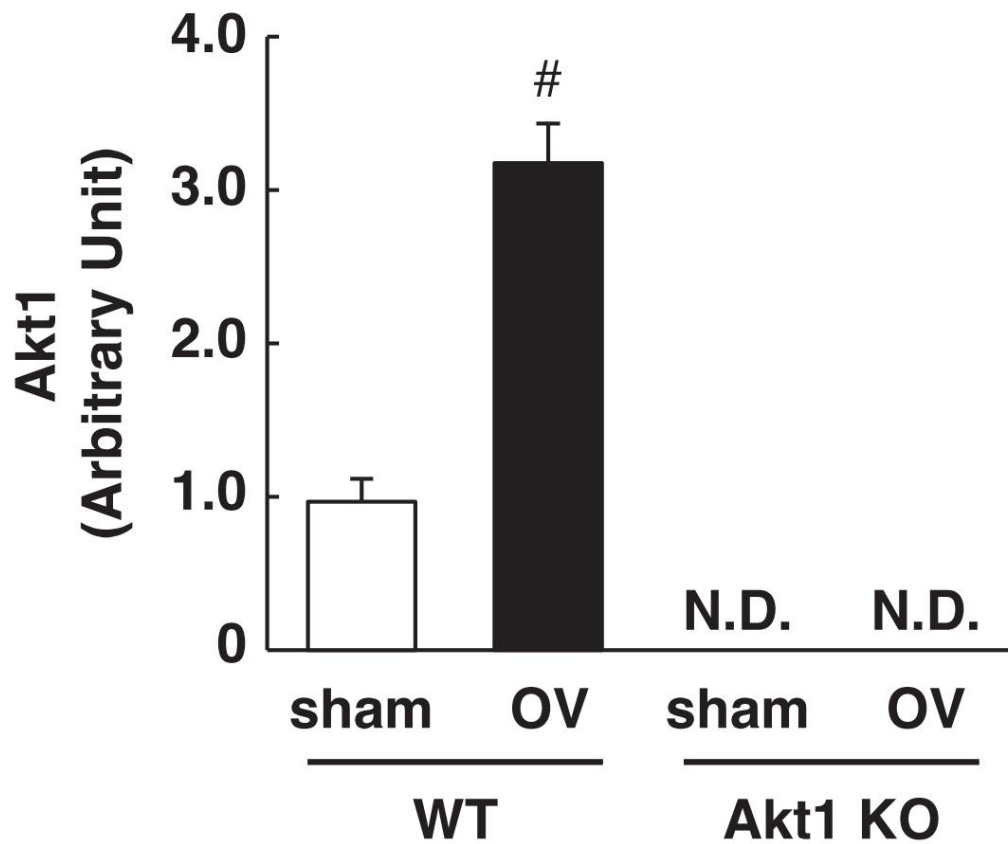


図 12 Akt1 発現量

Akt1 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 各群の比較として対応の無い t 検定を実施し, #は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05). KO 群では Akt1 は検出されなかった.

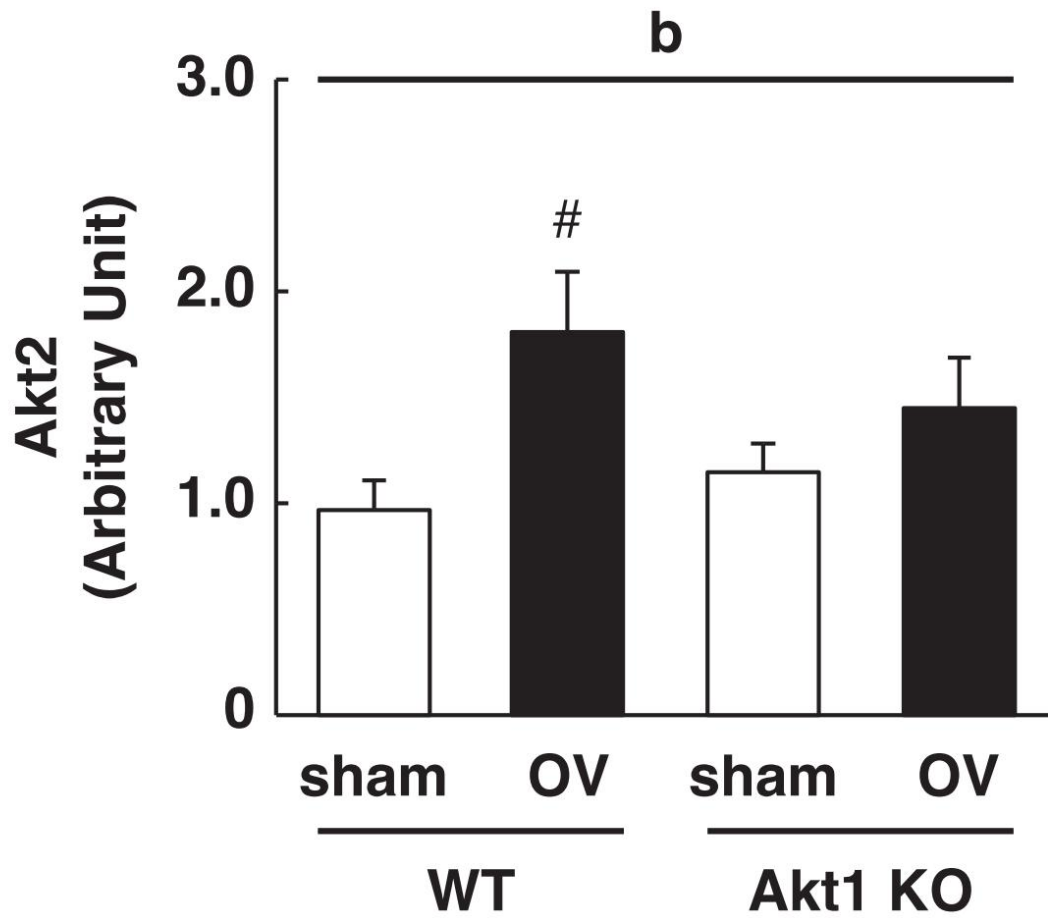


図 13 Akt2 発現量

Akt2 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除いて補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

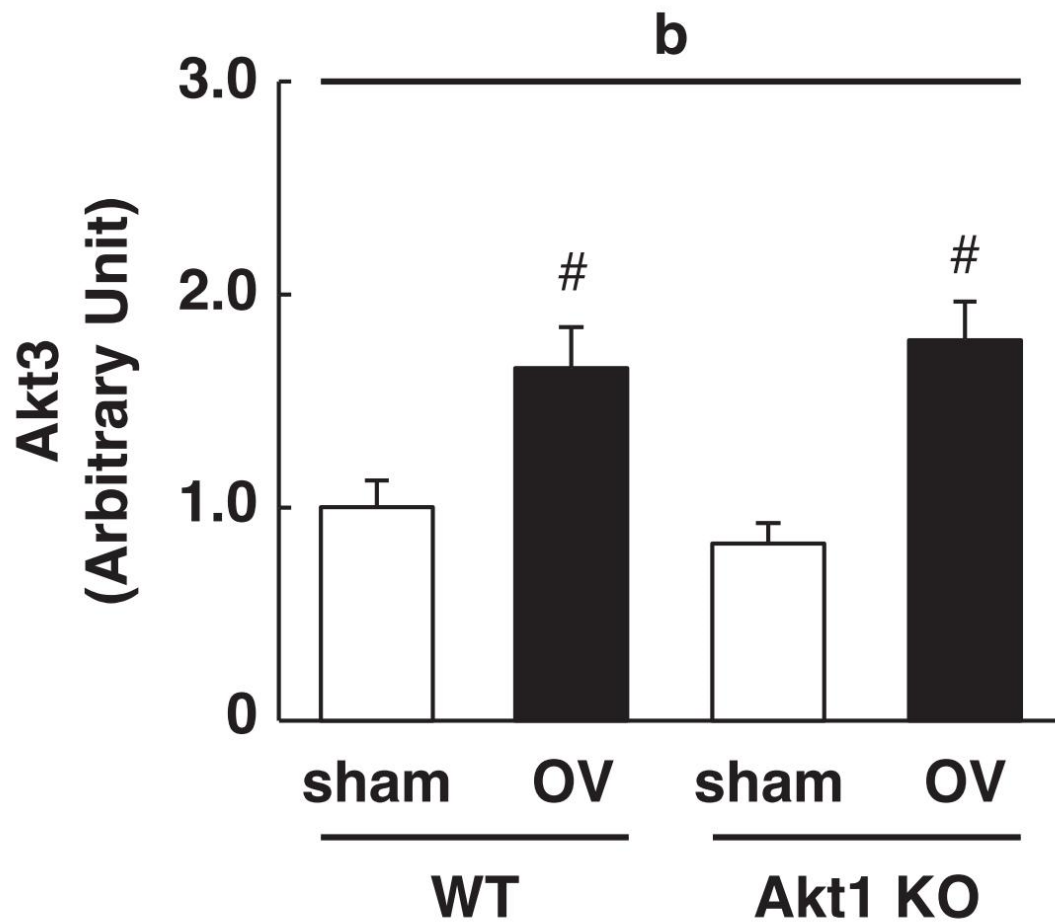


図 14 Akt3 発現量

Akt3 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す ( $p < 0.05$ ).

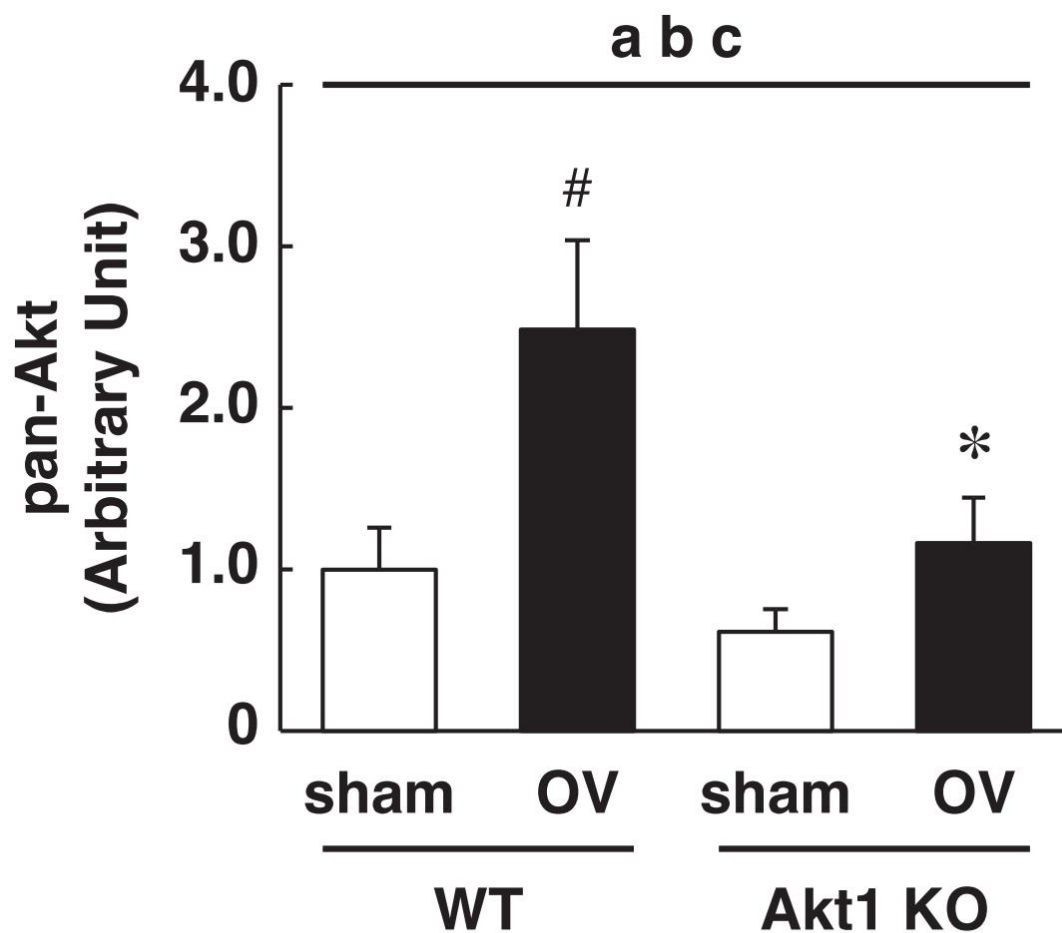


図 15 pan-Akt 発現量

Akt アイソフォームを同時に検出する pan-Akt 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, a は WT VS KO, b は sham VS OV の主効果, c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, #は sham VS OV, \*は WT VS KO が有意であったことを示す ( $p < 0.05$ ).

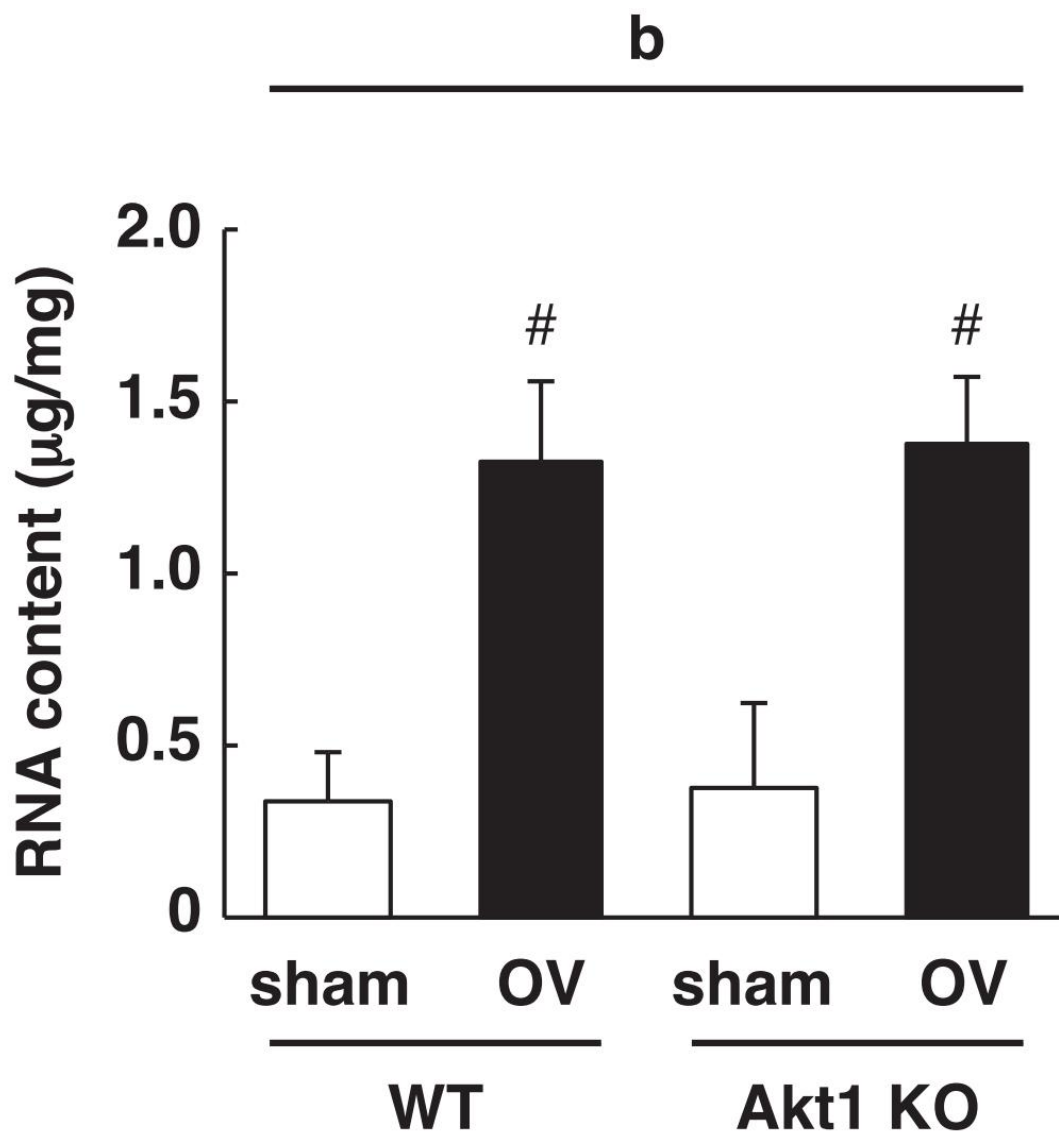


図 16 総 RNA 発現量

転写によって合成される総 RNA 量を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, **b** は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

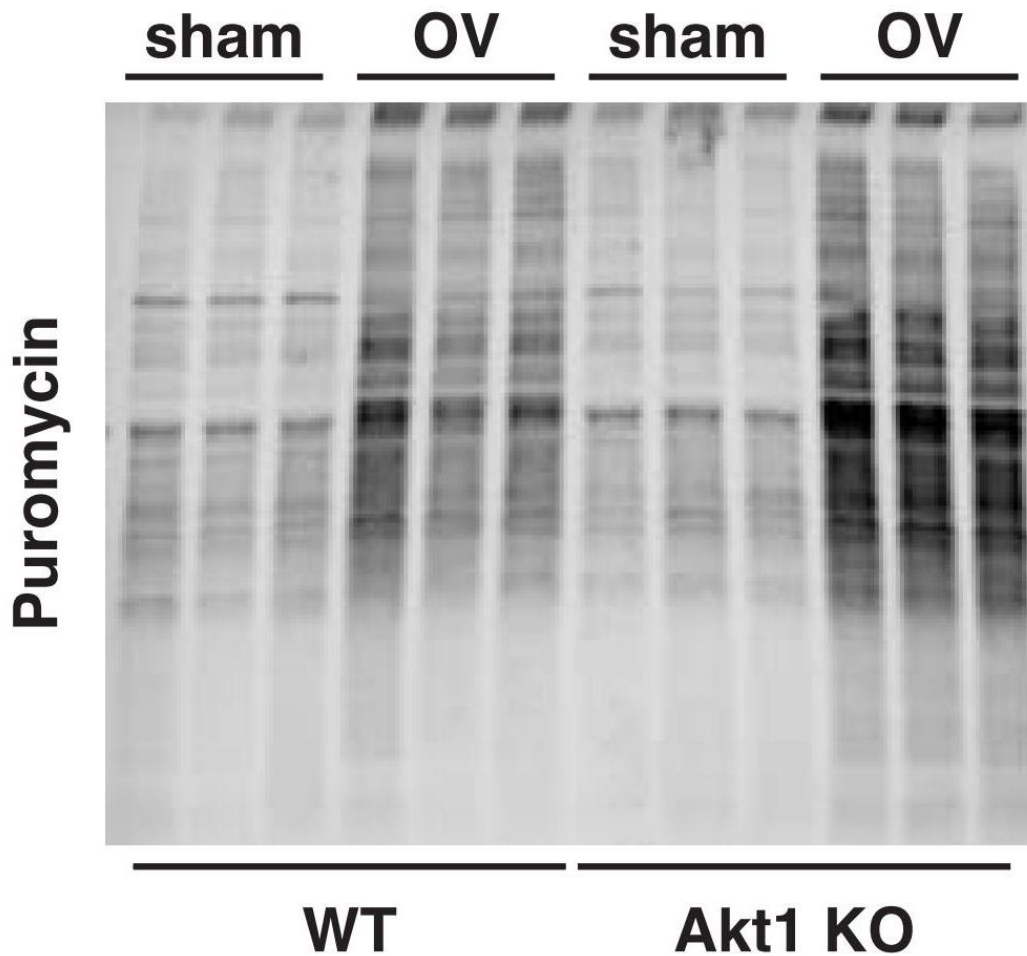


図 17 SUnSET 法によるウエスタブロットティング典型例

SUnSET 法で用いられる抗ピュウロマイシン抗体によるウエスタブロットティングの典型的な画像を示す。足底筋で新たにタンパク質が合成された際に取り込まれたピュウロマイシンを検出する。ピュウロマイシンはあらゆる分子量のタンパク質に取り込まれるため、連続的なバンドとなる。分析の際はバンド全体を定量する。

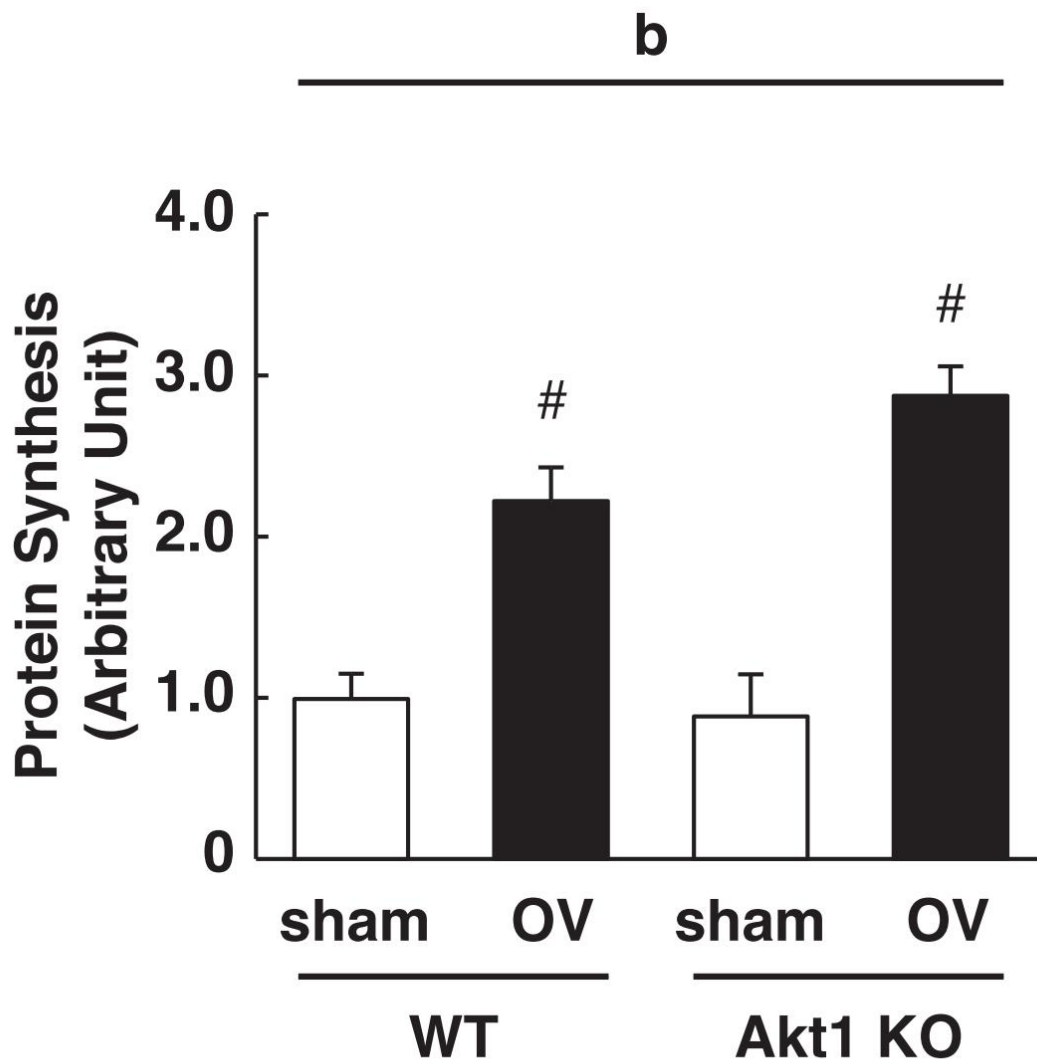


図 18 タンパク質合成量

タンパク質合成量の定量結果を図に示す (各群 n=3). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

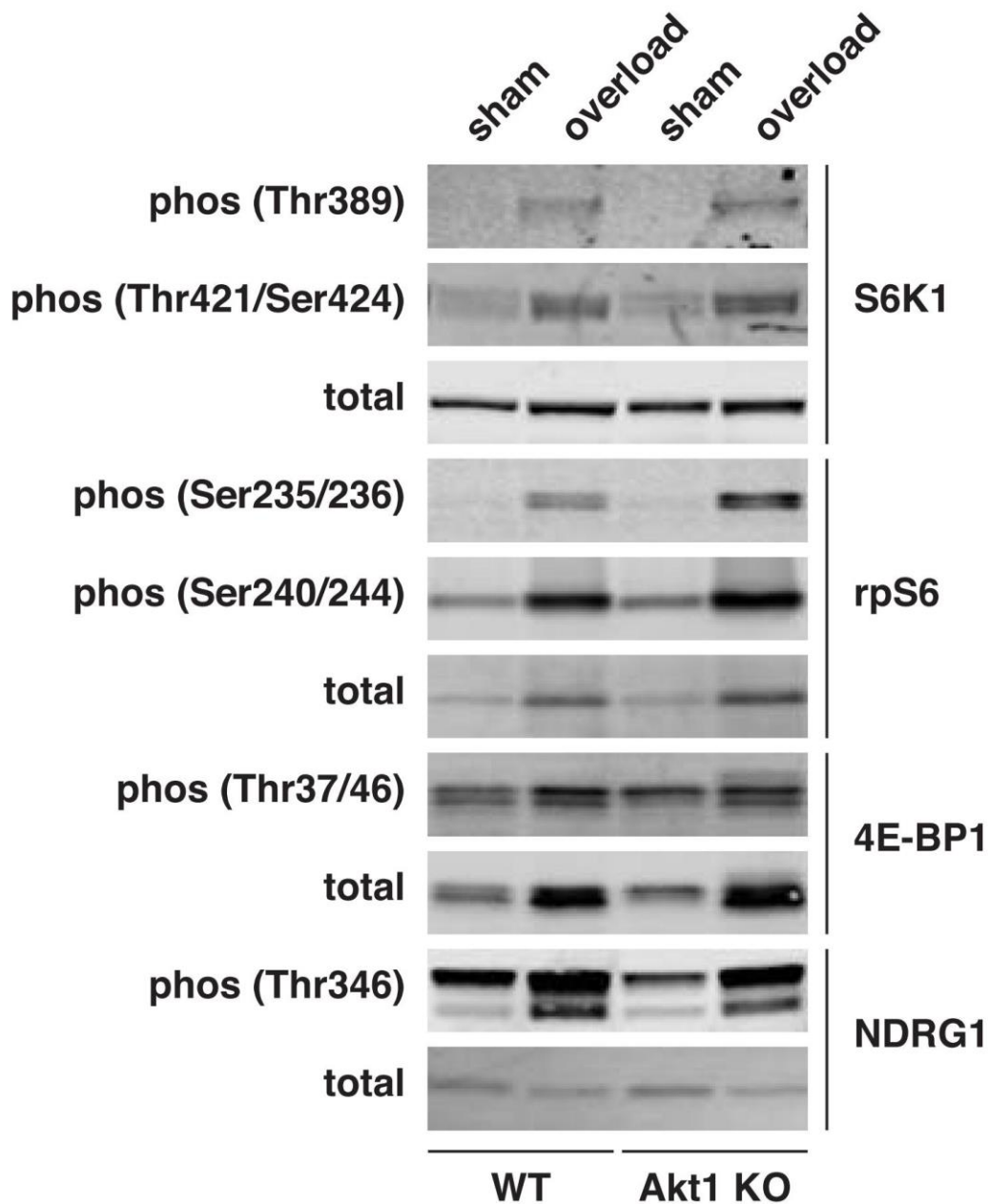


図 19 mTOR の下流因子のウエスタンブロッティング典型例

mTOR 下流因子のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す. S6K1, rpS6, 4E-BP1 は mTORC1, NDRG1 は mTORC2 の下流因子である. 特に S6K1 (T389) の発現量は mTORC1 の活性を, NDRG1 (T346) の発現量は mTORC2 の活性を表す. NDRG1 (T346) は複数のバンドが検出されるが, 分析の際はバンドを全て定量する.



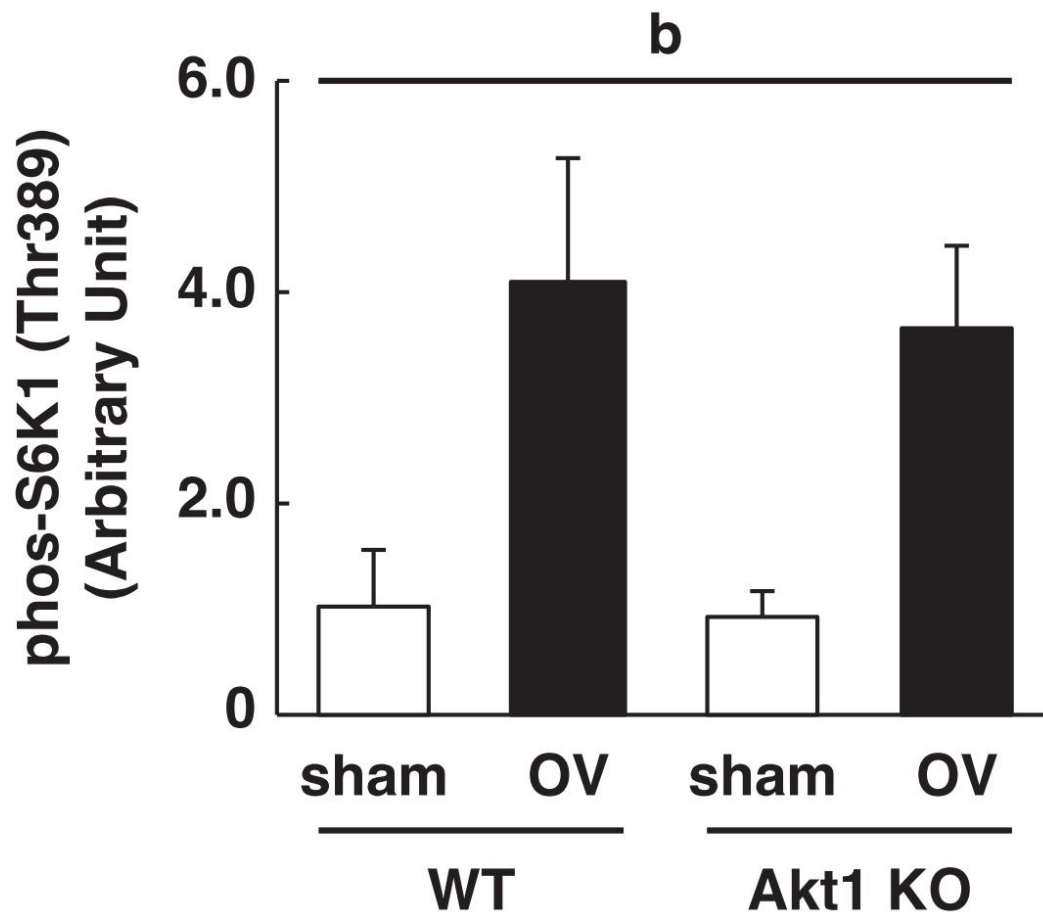


図 20 phos-S6K1 (Thr389) 発現量

phos-S6K1 (Thr389) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施したが, sham VS OV, WT VS KO の比較はいずれも有意差はなかった ( $p < 0.05$ ).

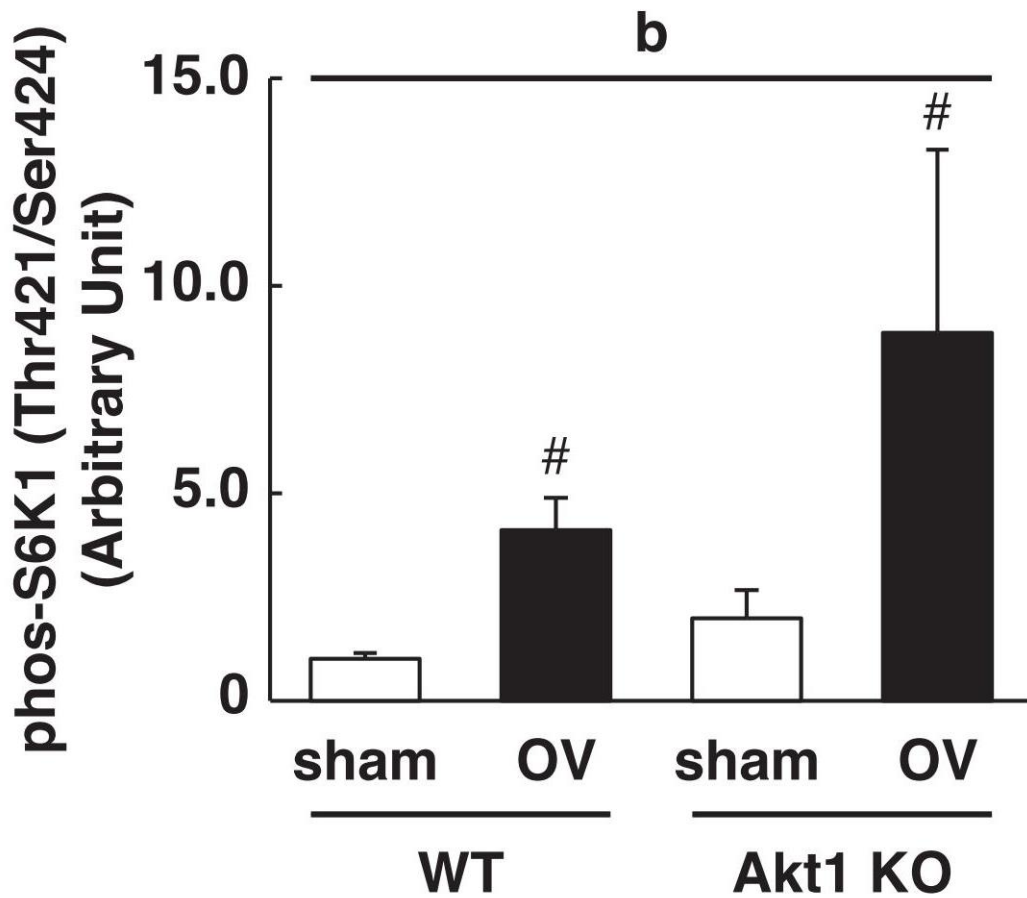


図 21 phos-S6K1 (Thr421/Ser424) 発現量

phos-S6K1 (Thr421/Ser424) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

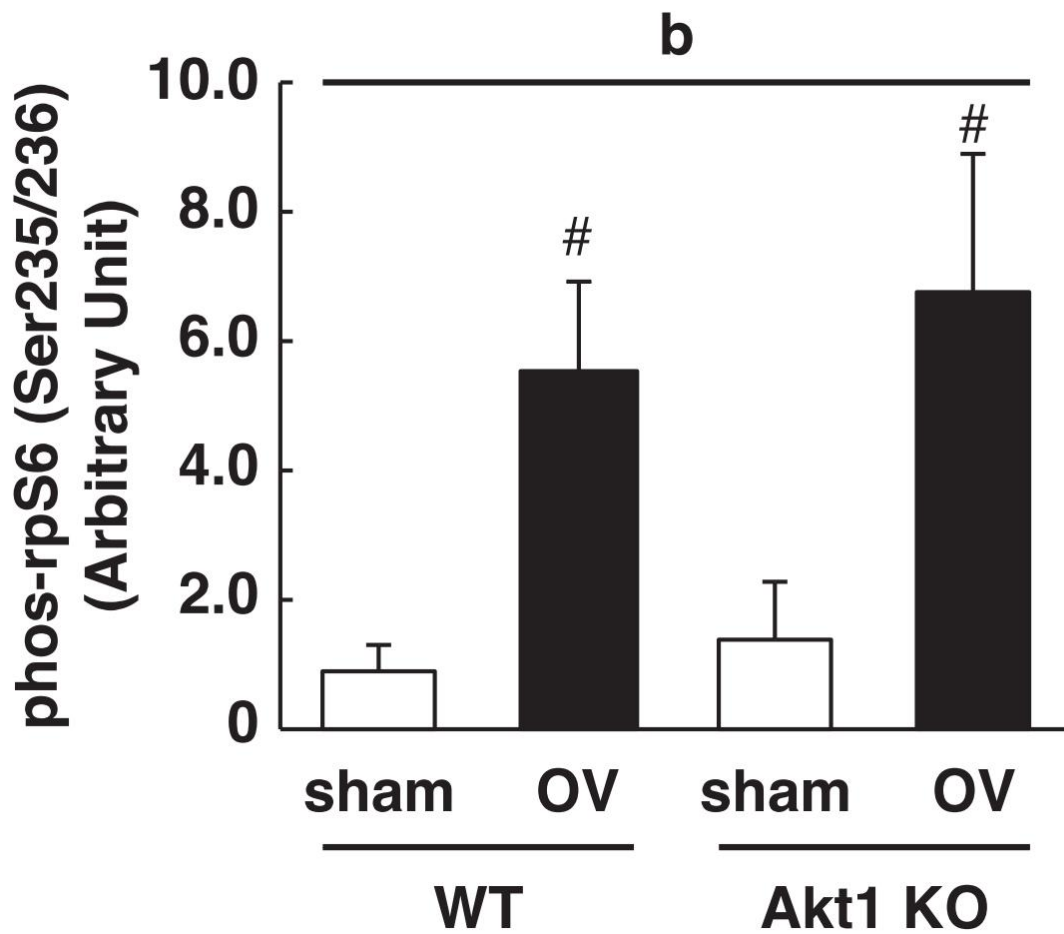


図 22 phos-rpS6 (Ser235/236) 発現量

phos-rpS6 (Ser235/236) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

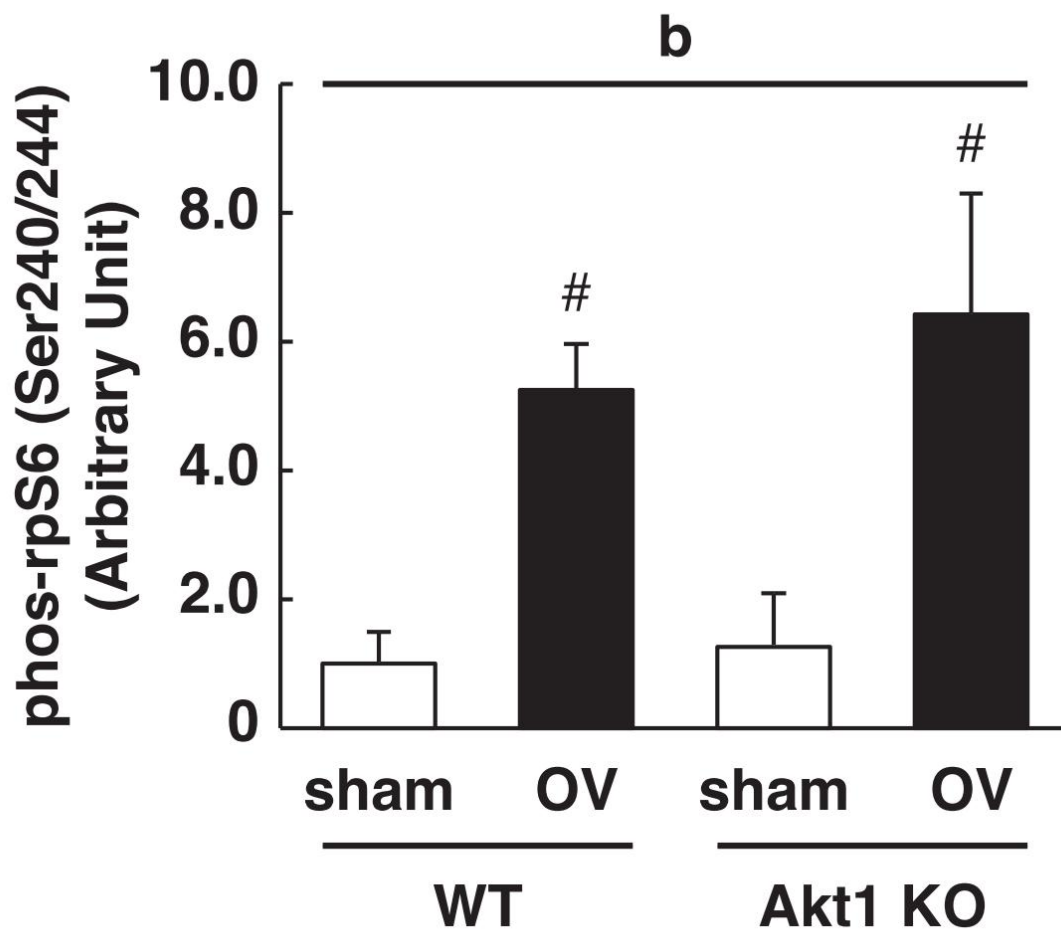


図 23 phos-rpS6 (Ser240/244) 発現量

phos-rpS6 (Ser240/244) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

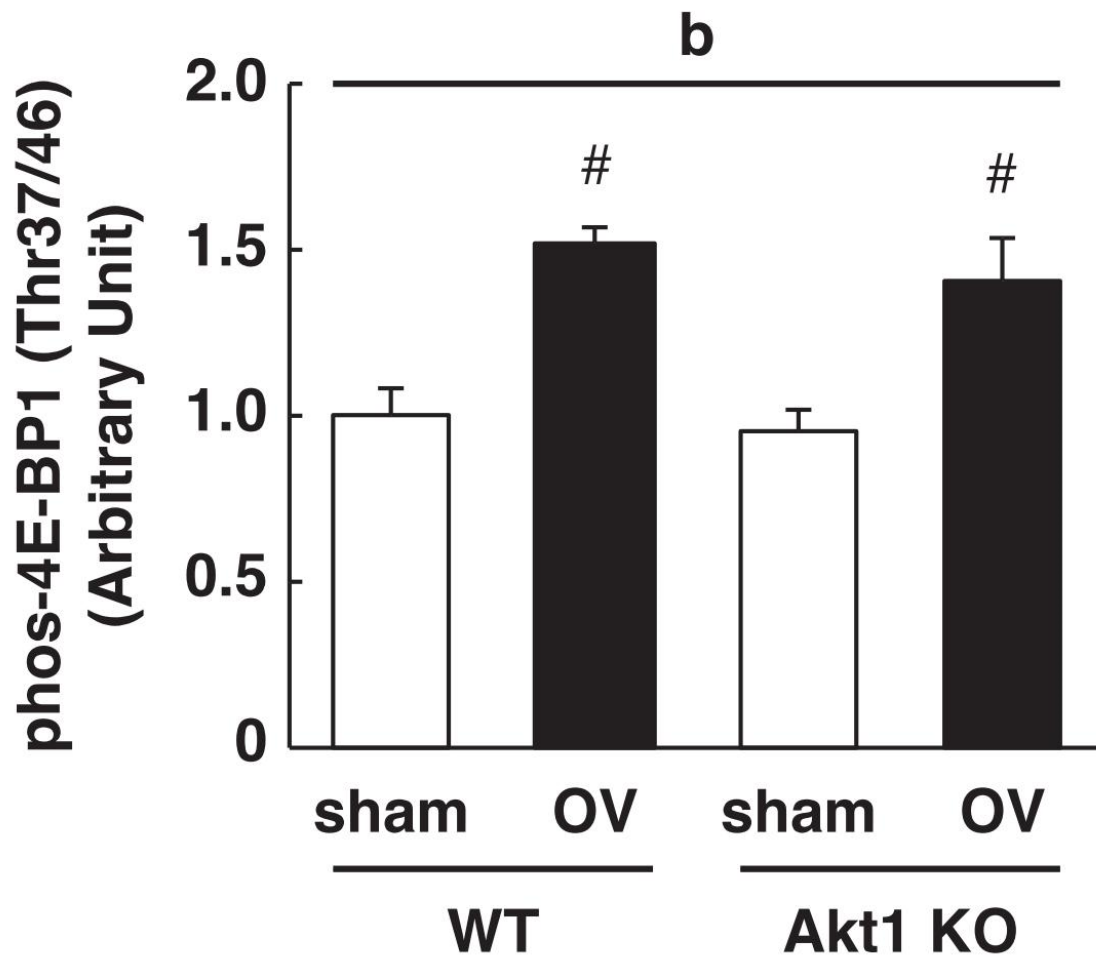


図 24 phos-4E-BP1 (Thr37/46) 発現量

phos-4E-BP1 (Thr37/46) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

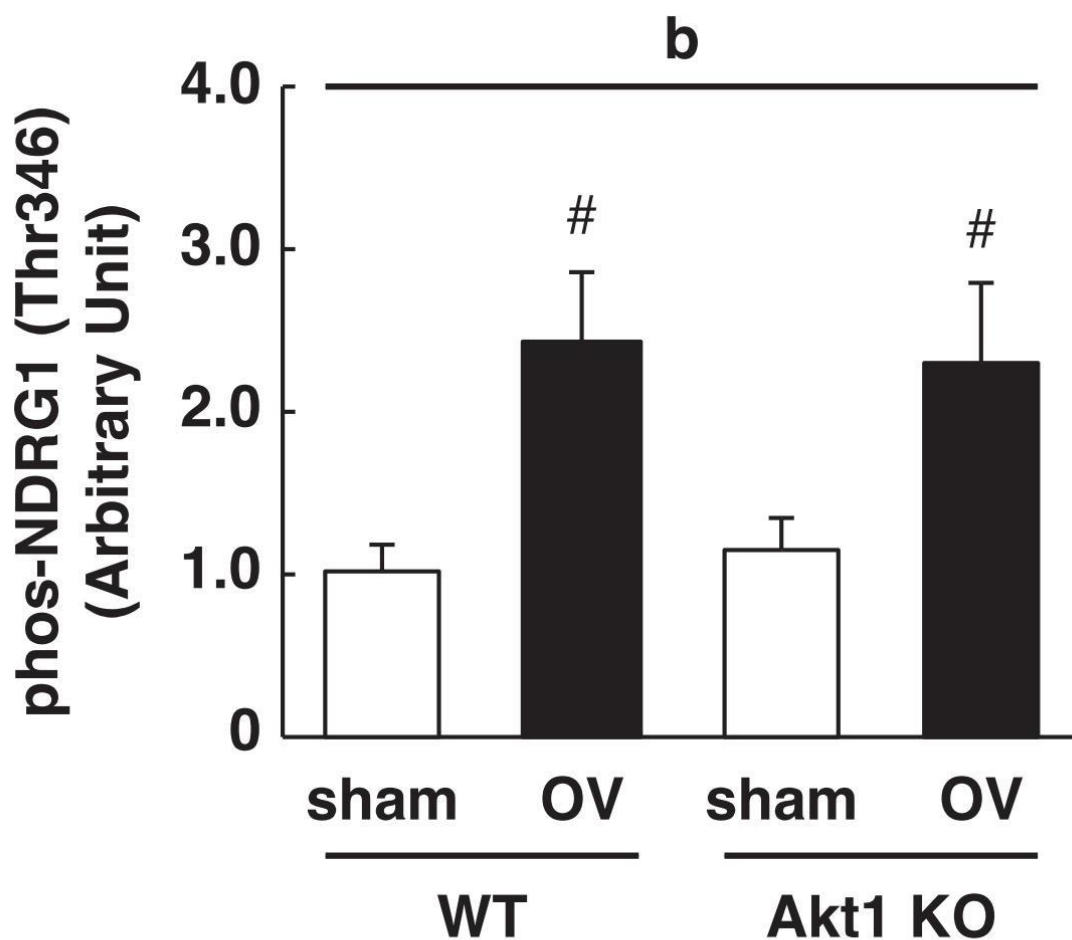


図 25 phos-NDRG1 (Thr346) 発現量

phos-NDRG1 (Thr346) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除いて補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

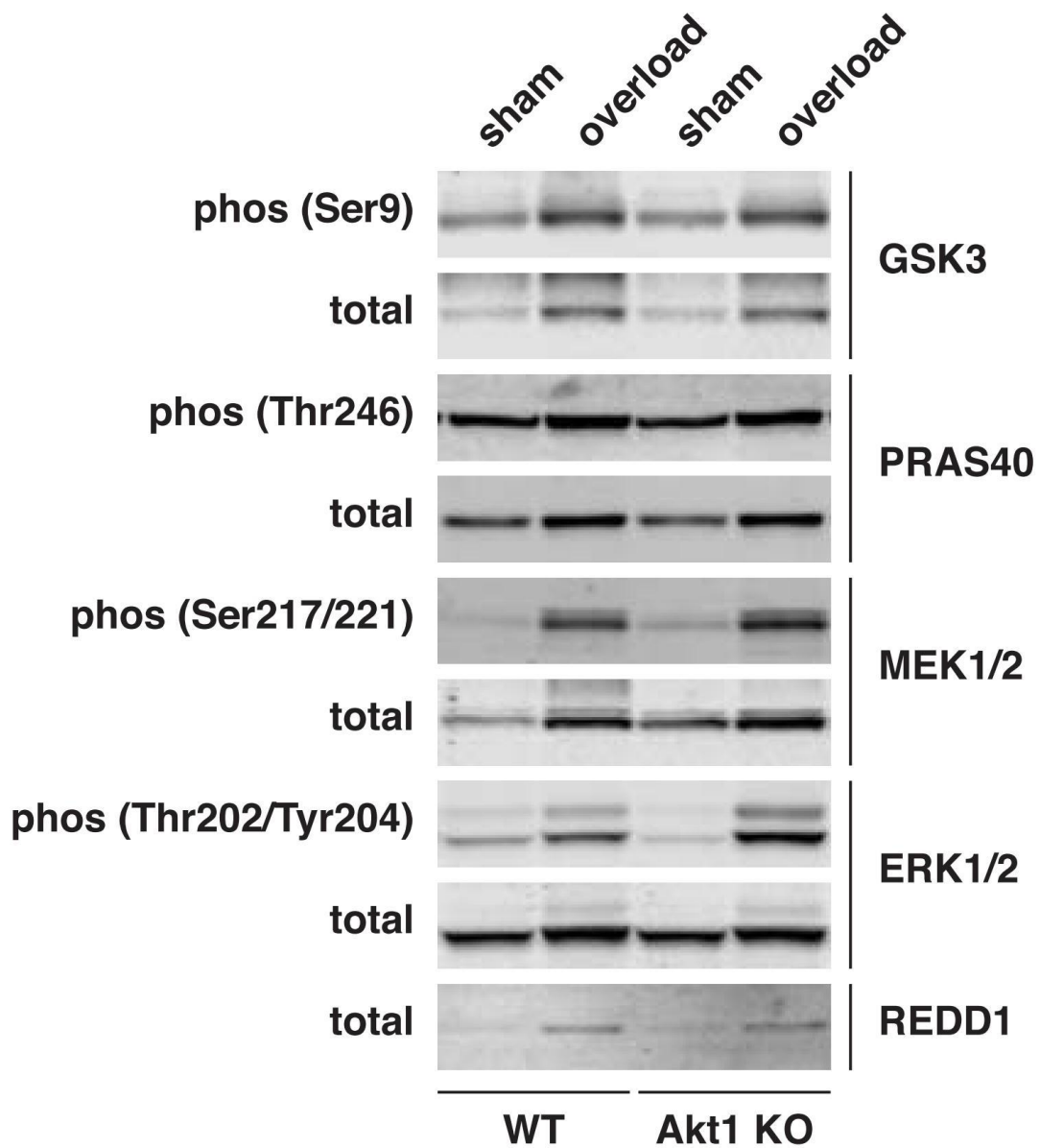


図 26 Akt/mTOR 系下流因子のウエスタンブロッティング典型例

Akt/mTOR 系下流因子のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す。MEK1/2, ERK1/2 は複数のバンドが検出されるが、分析の際はバンドを全て定量する。

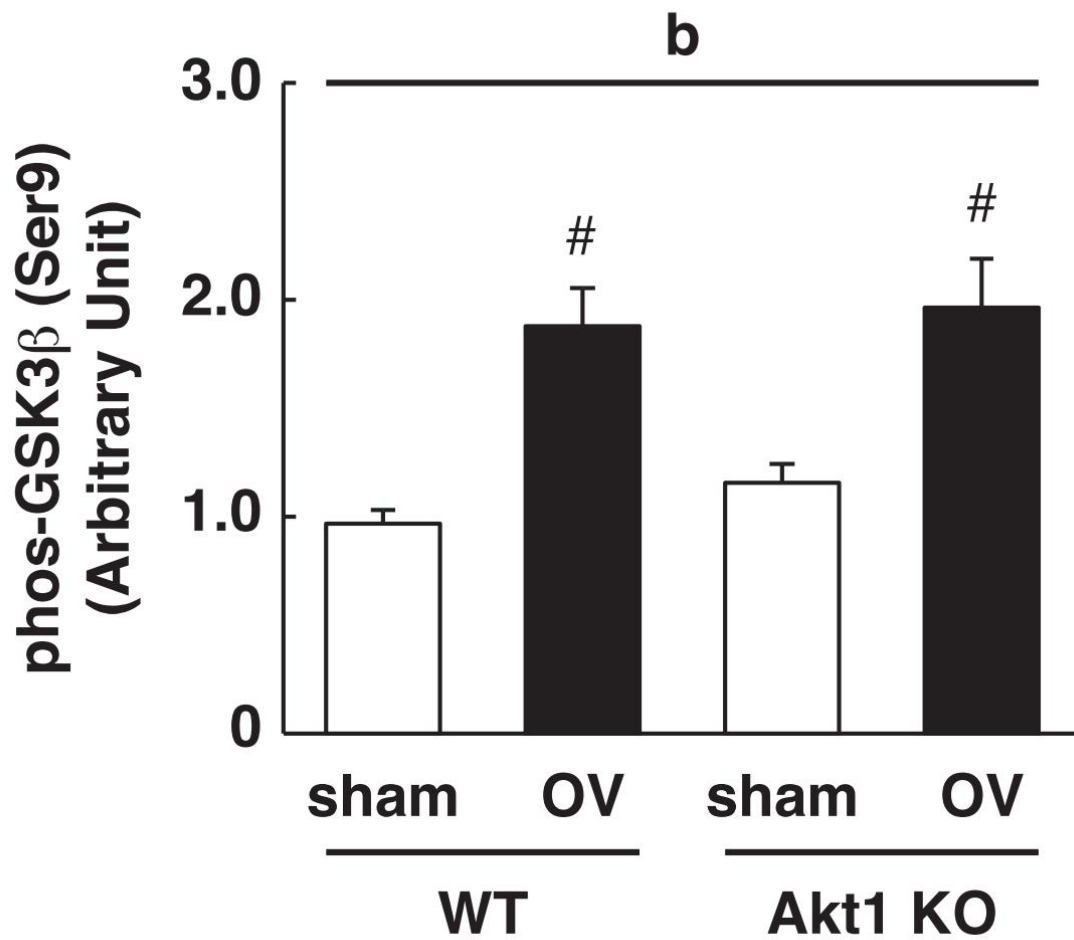


図 27 phos-GSK3 B (Ser9) 発現量

phos-GSK3B (Ser9) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除いて補正した. 結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す ( $p < 0.05$ ).



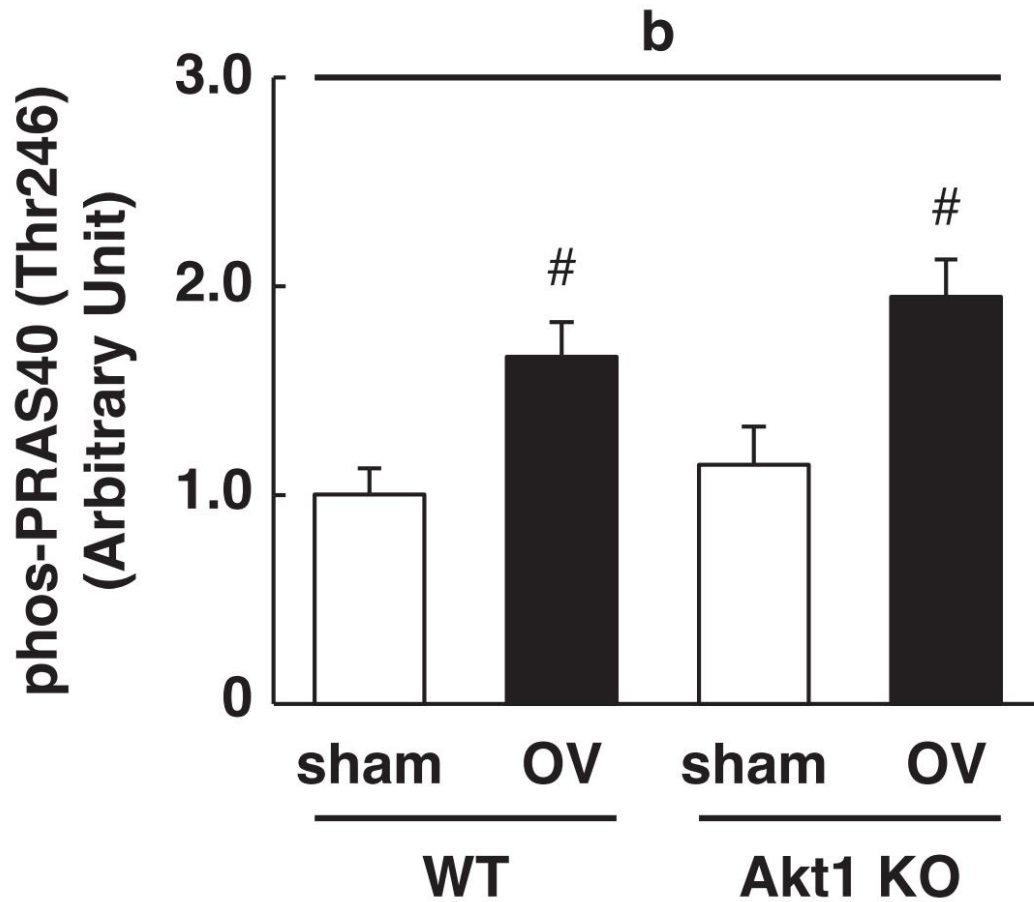


図 28 phos-PRAS40 (Thr246) 発現量

phos-PRAS40 (Thr246) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除いて補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, **b**は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, **#**は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

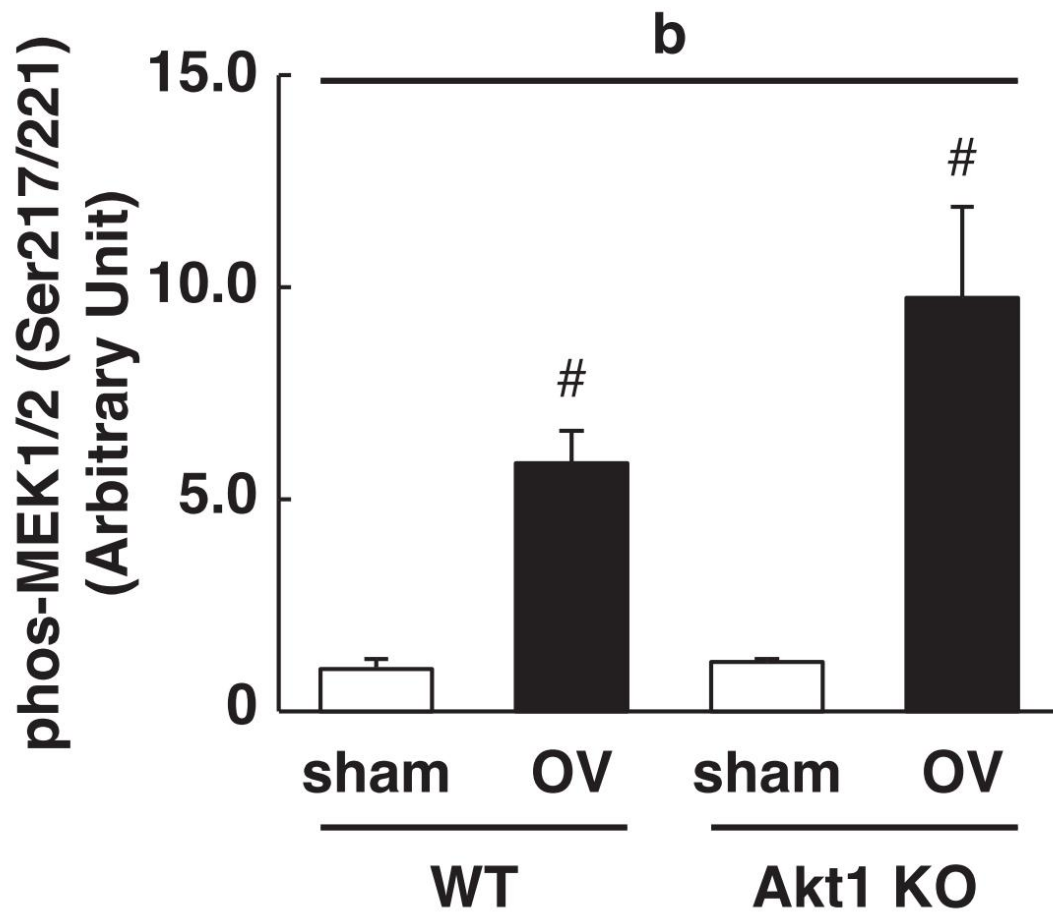


図 29 phos-MEK1/2 (Ser217/221) 発現量

phos-MEK1/2 (Ser217/221) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

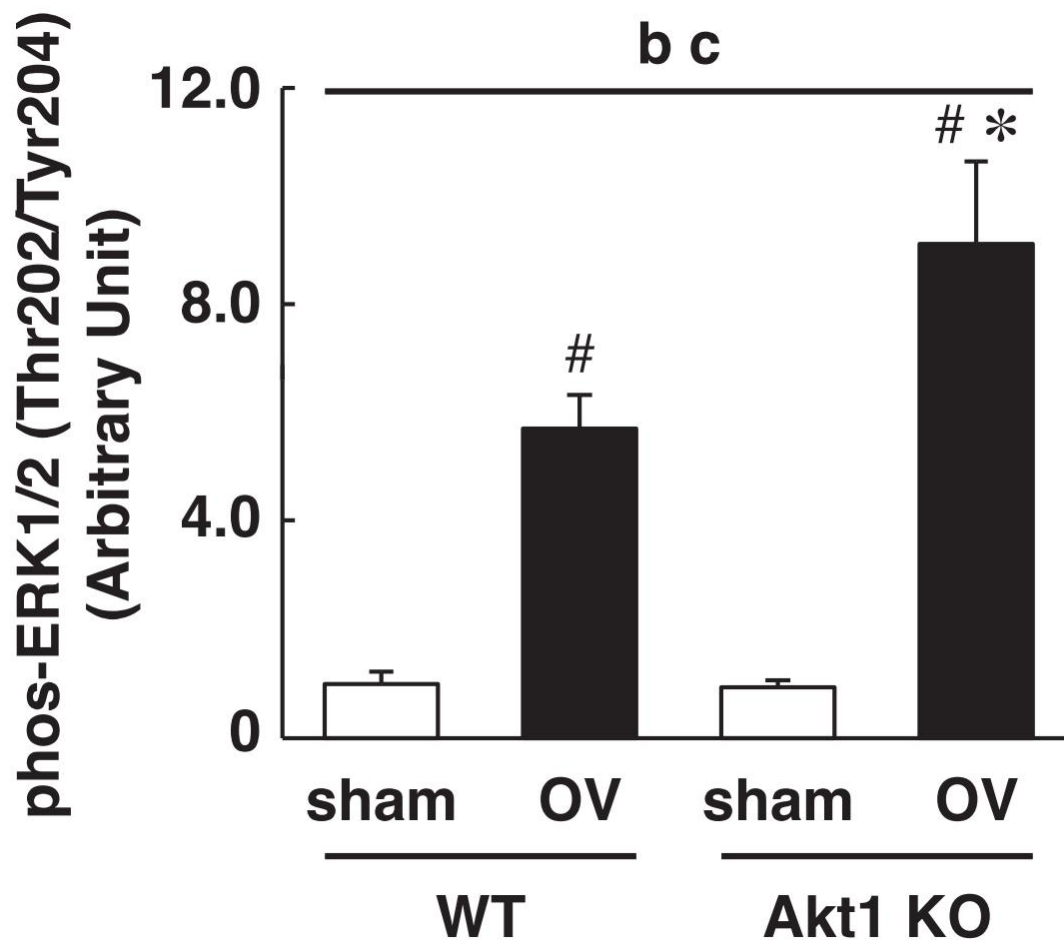


図 30 phos-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 発現量

phos-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果, c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV, \* は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

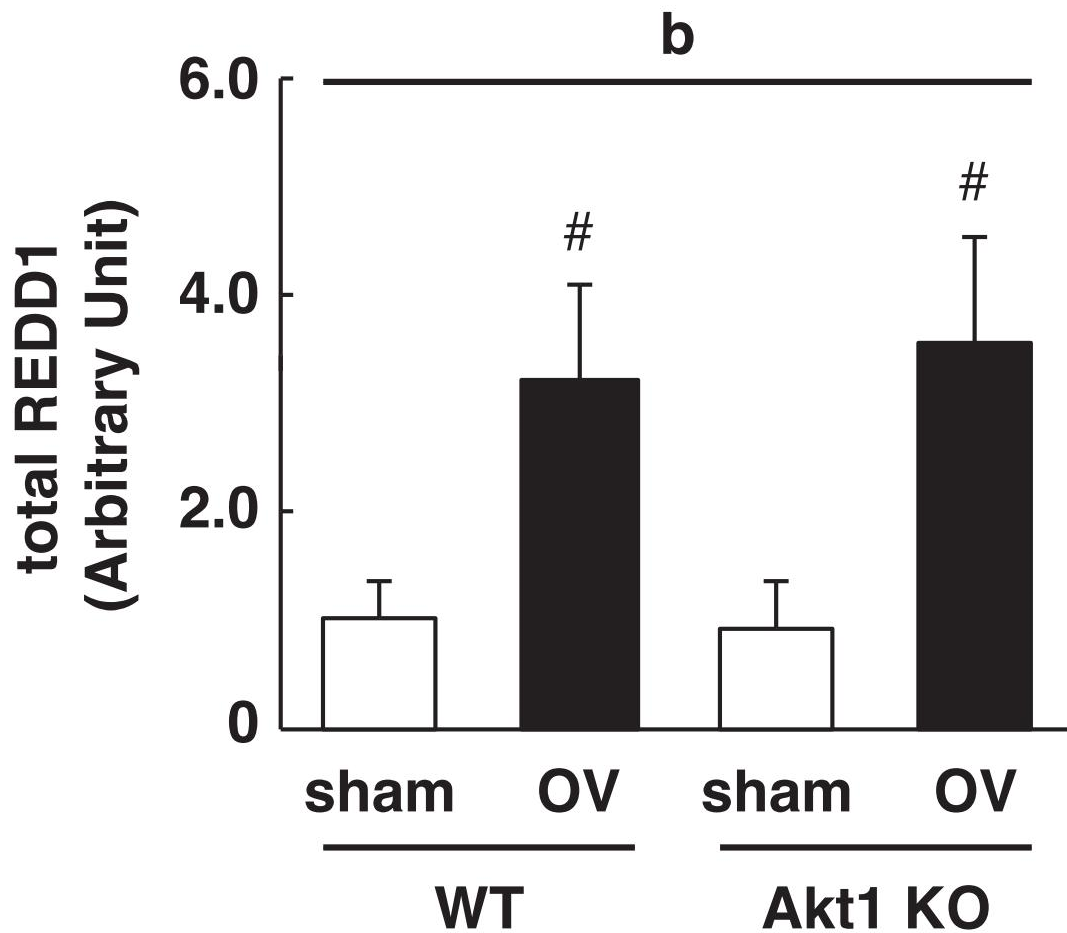


図 31 total-REDD1 発現量

total-REDD1 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, bは sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, #は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

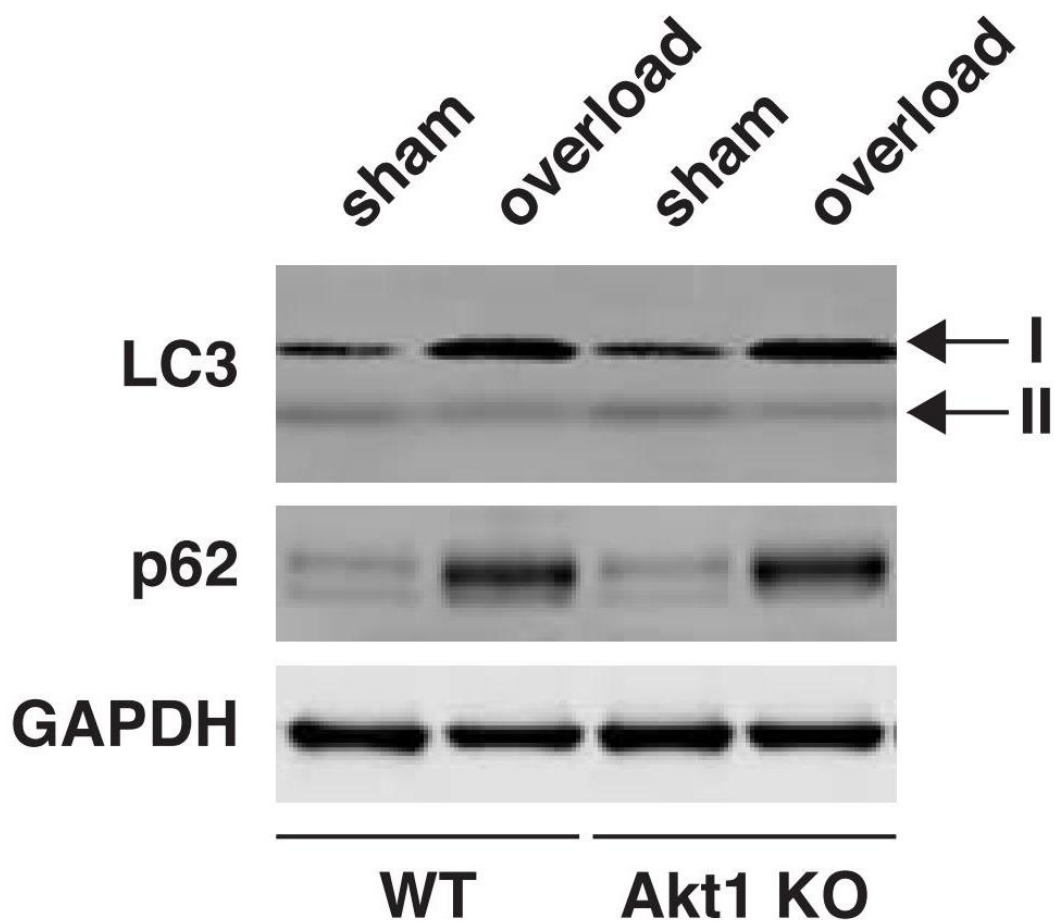


図 32 LC3, p62 のウエスタンブロッティング典型例

LC3-I, LC3-II, p62 のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す. GAPDH をローディングコントロールとして使用した LC3-II は LC3-I より分子量が大きいが高疎水性が高いため, 電気泳動において LC3-I よりもバンドの移動度は大きくなる. 分析の際はバンドを全て定量する.

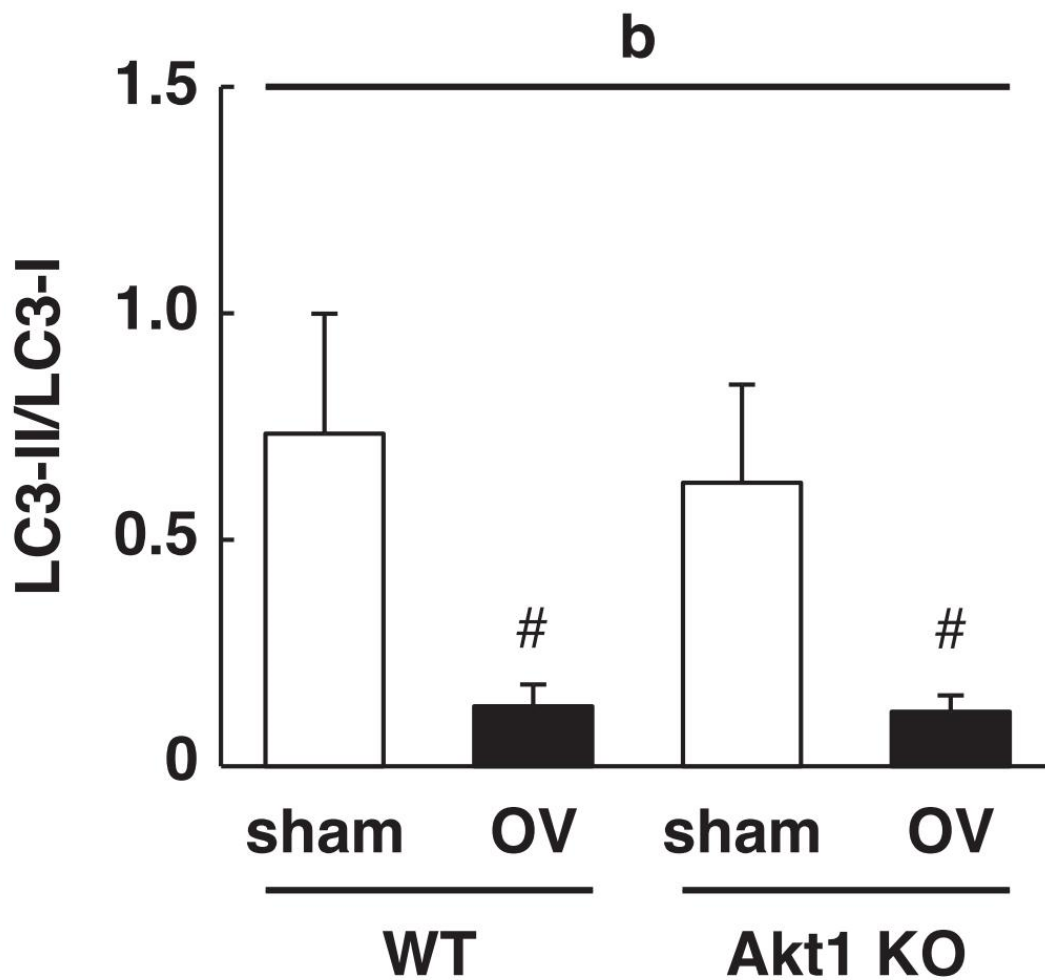


図 33 LC3-II/I の発現量の比率

LC3-II/I の発現量の比を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

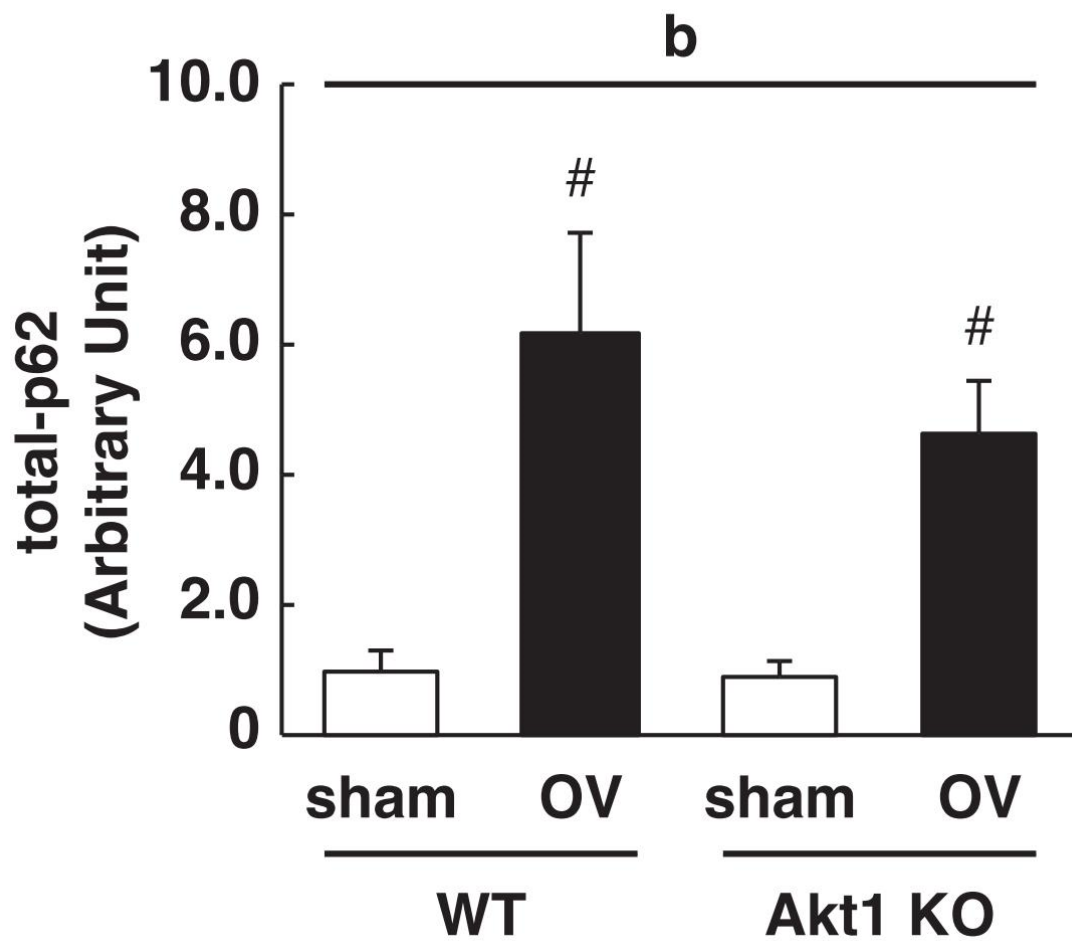


図 34 p62 発現量

p62 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

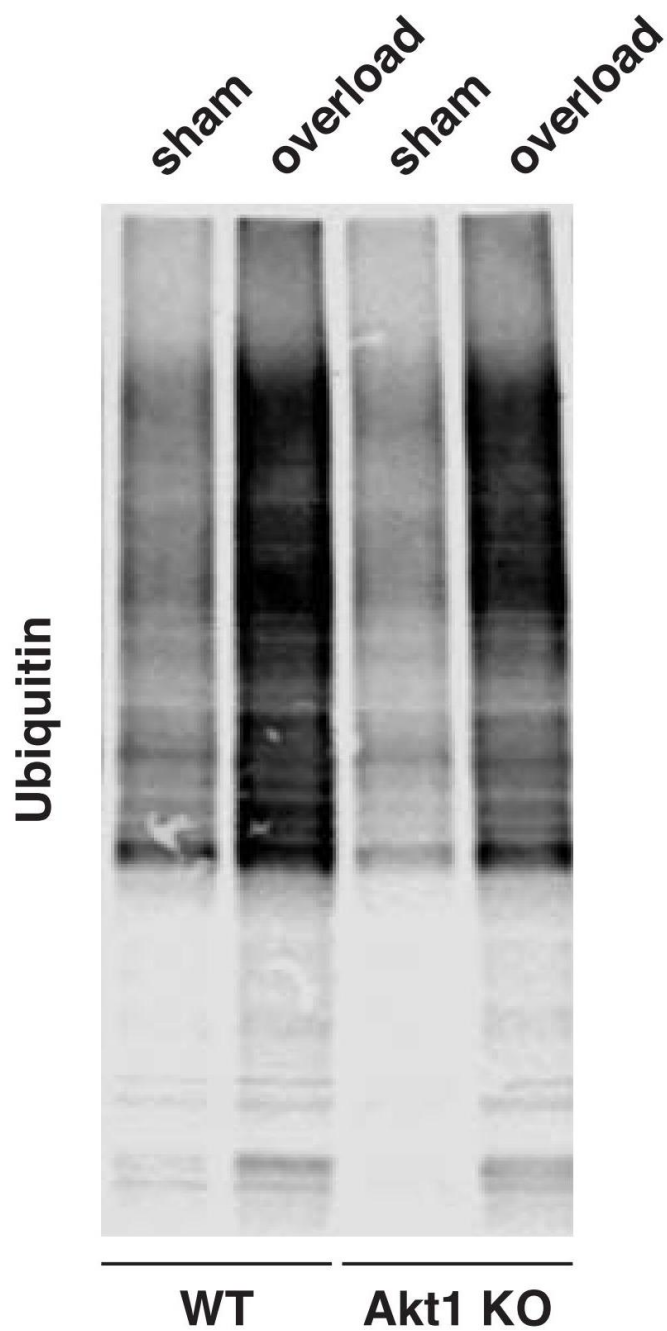


図 35 ユビキチン化されたタンパク質のウエスタンブロッティング典型例

ユビキチン化されたタンパク質のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す。ユビキチンはあらゆる分子量のタンパク質に結合するため、ユビキチンを検出するバンドは複数の分子量において出現する。分析の際はバンド全体を定量する。



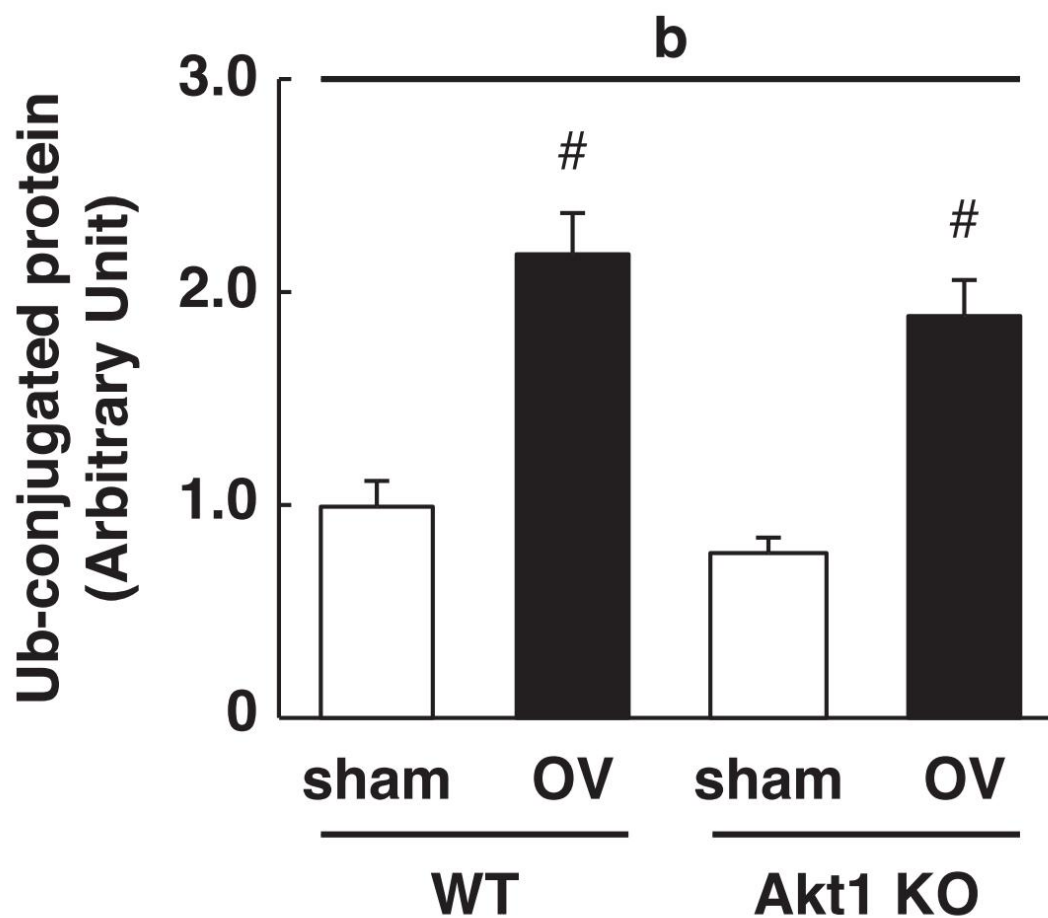


図 36 ユビキチン化されたタンパク質量

ユビキチン化されたタンパク質発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). WT/Sham 群の平均値で各群を除して補正した. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定を実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

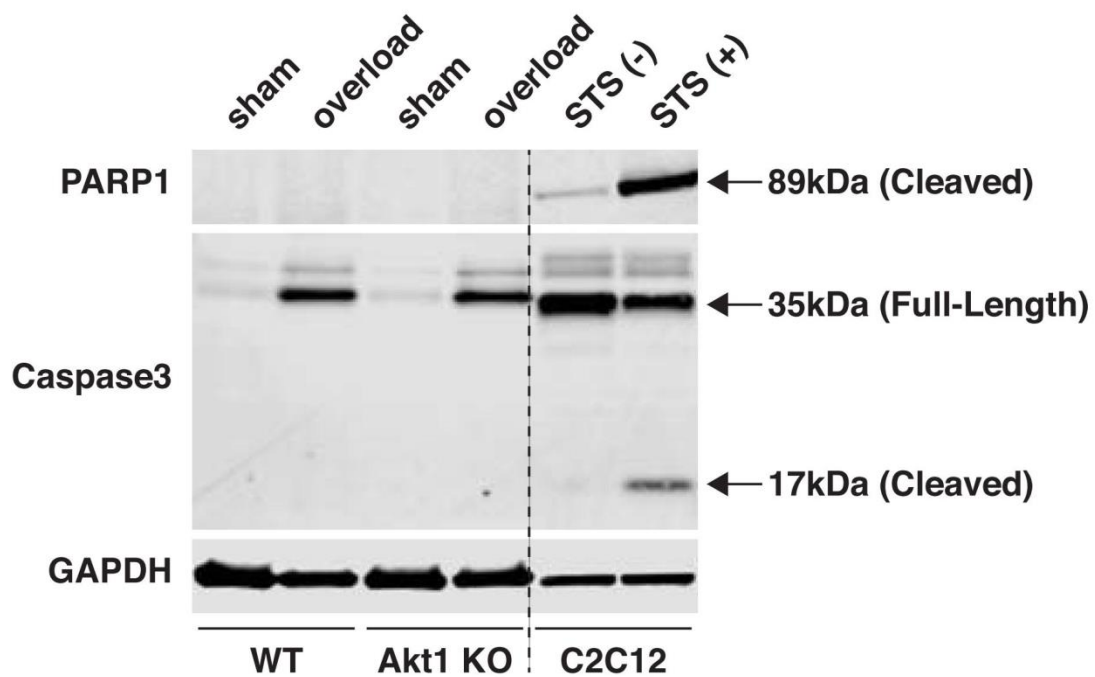


図 37 Caspase3, PARP1 のウエスタンブロッティング典型例

Caspase3 と PARP1 のウエスタンブロッティングの典型的な画像を示す。GAPDH をローディングコントロールとして使用した。Caspase3 は切断されることで活性型となりアポトーシスを引き起こす。また、PARP1 はアポトーシスに伴い切断される。C2C12 は培養したマウス筋芽細胞で、プロテインキナーゼ阻害薬である STS を添加することでアポトーシスが誘導されるため、アポトーシスのポジティブコントロールとして使用される。

活性型の Caspase3 や切断された PARP1 は、ポジティブコントロールでは発現しているがマウス足底筋では検出されなかった。

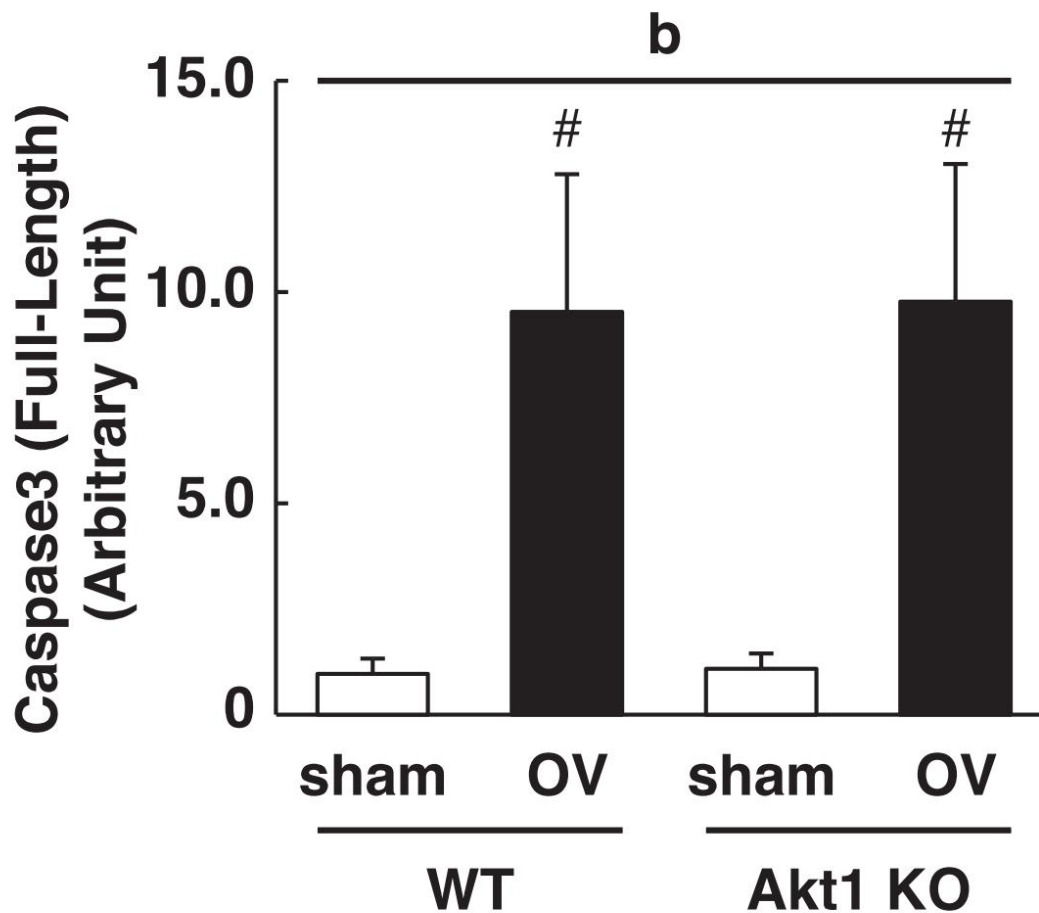


図 38 Caspase3 発現量

Full-Length Caspase3 発現量の定量結果を図に示す (各群 n=6). 結果は平均値 ± 標準誤差で示される.. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定実施し, # は sham VS OV が有意であったことを示す (p<0.05).

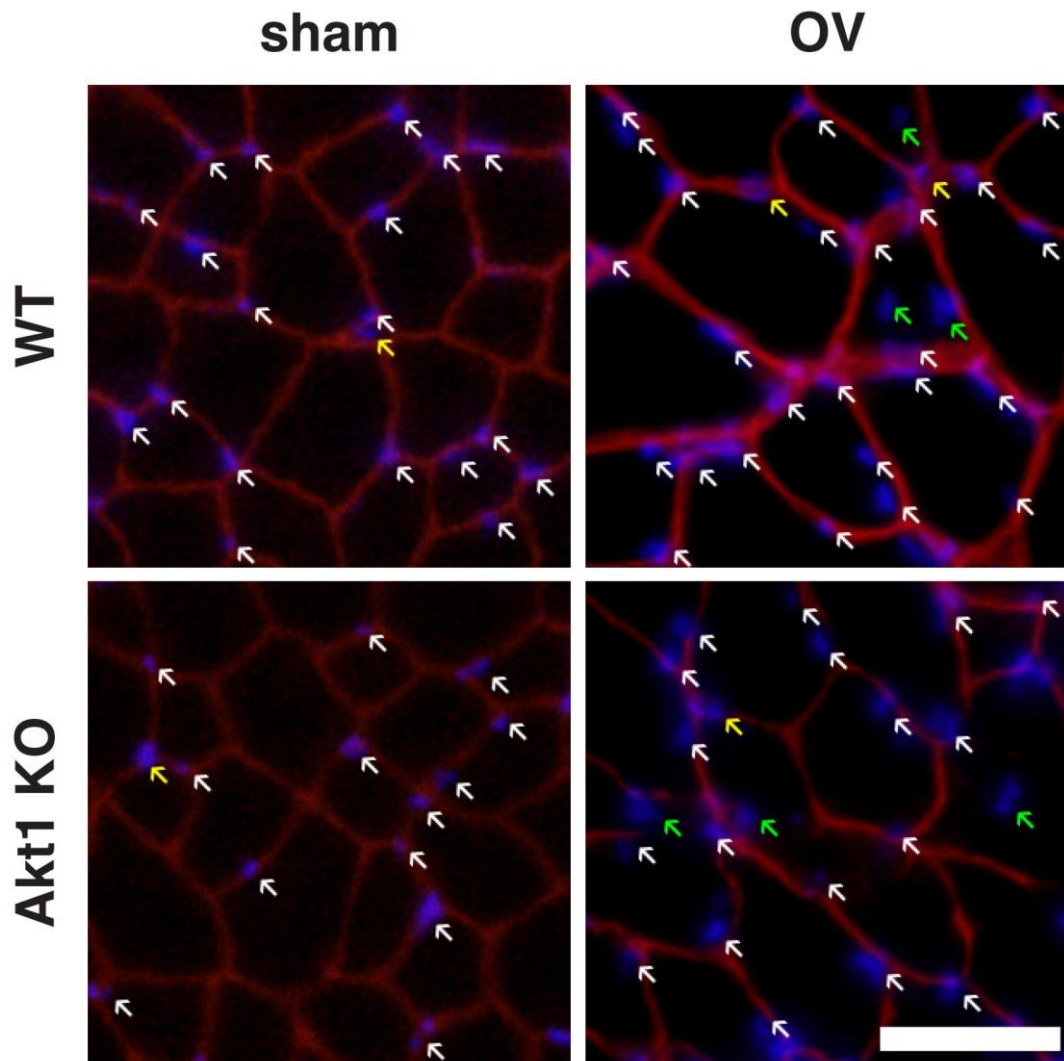


図 39 ジストロフィンと DAPI の共染色画像

マウスの足底筋横断面の免疫染色画像の典型像を図に示す。抗ジストロフィン抗体および 2 次抗体によって細胞膜が赤色に、DAPI によって核が青色に染色される。それぞれで得られた画像をマージした。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。白色の矢印は筋線維の周辺部に存在する細胞核、緑色の矢印は筋線維の周辺から離れて存在する中心核、黄色の矢印は筋線維と筋線維の間に存在する核であり、筋核としてカウントしていない。

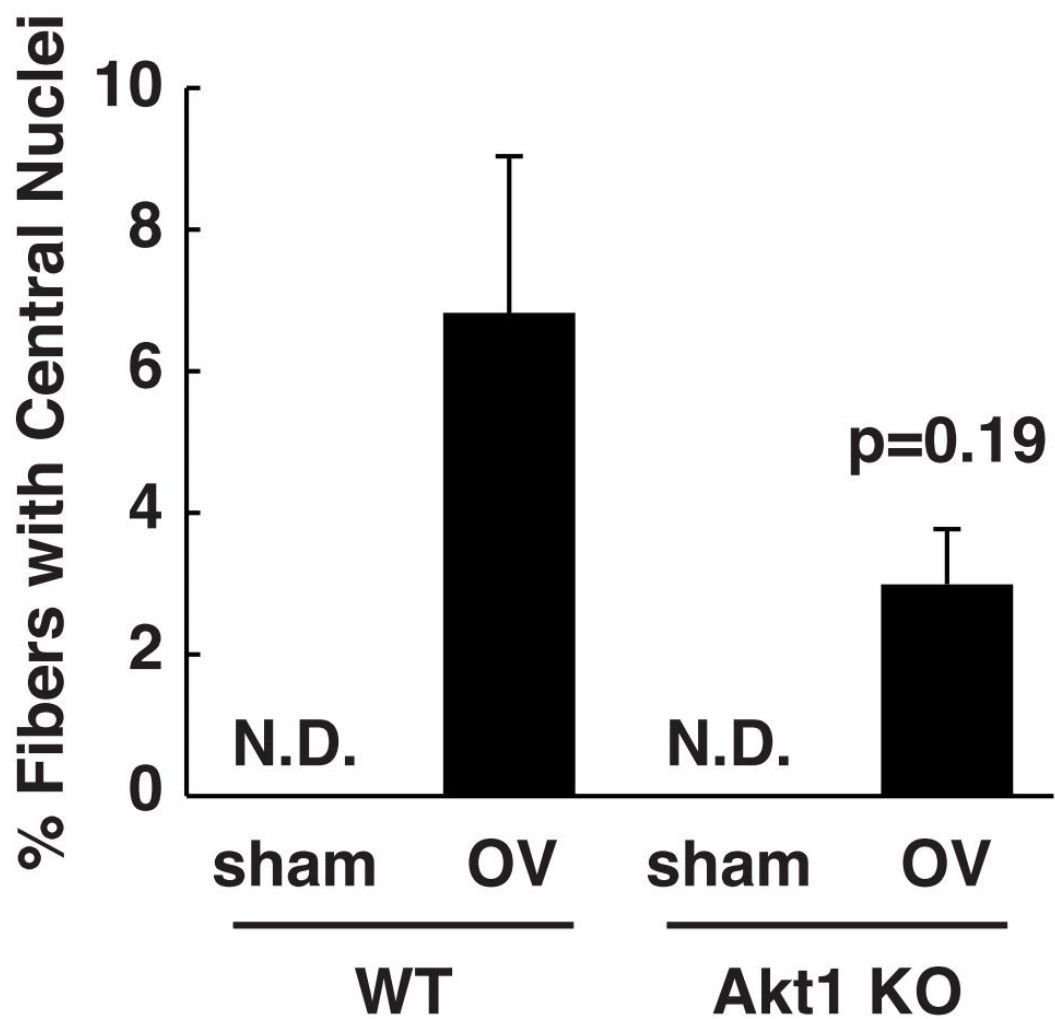


図 40 中心核を持つ筋線維数

中心核を有する筋繊維の数を図に示す (各群 n=6). マウスの足底筋横断面の全視野で中心核を有する筋繊維の数をカウントした. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. Sham 群において中心核は同定されなかった. 対応のない t 検定を実施し WT VS KO を比較したところ有意差は無かったが ( $p < 0.05$ ), KO によって減少が見られる.

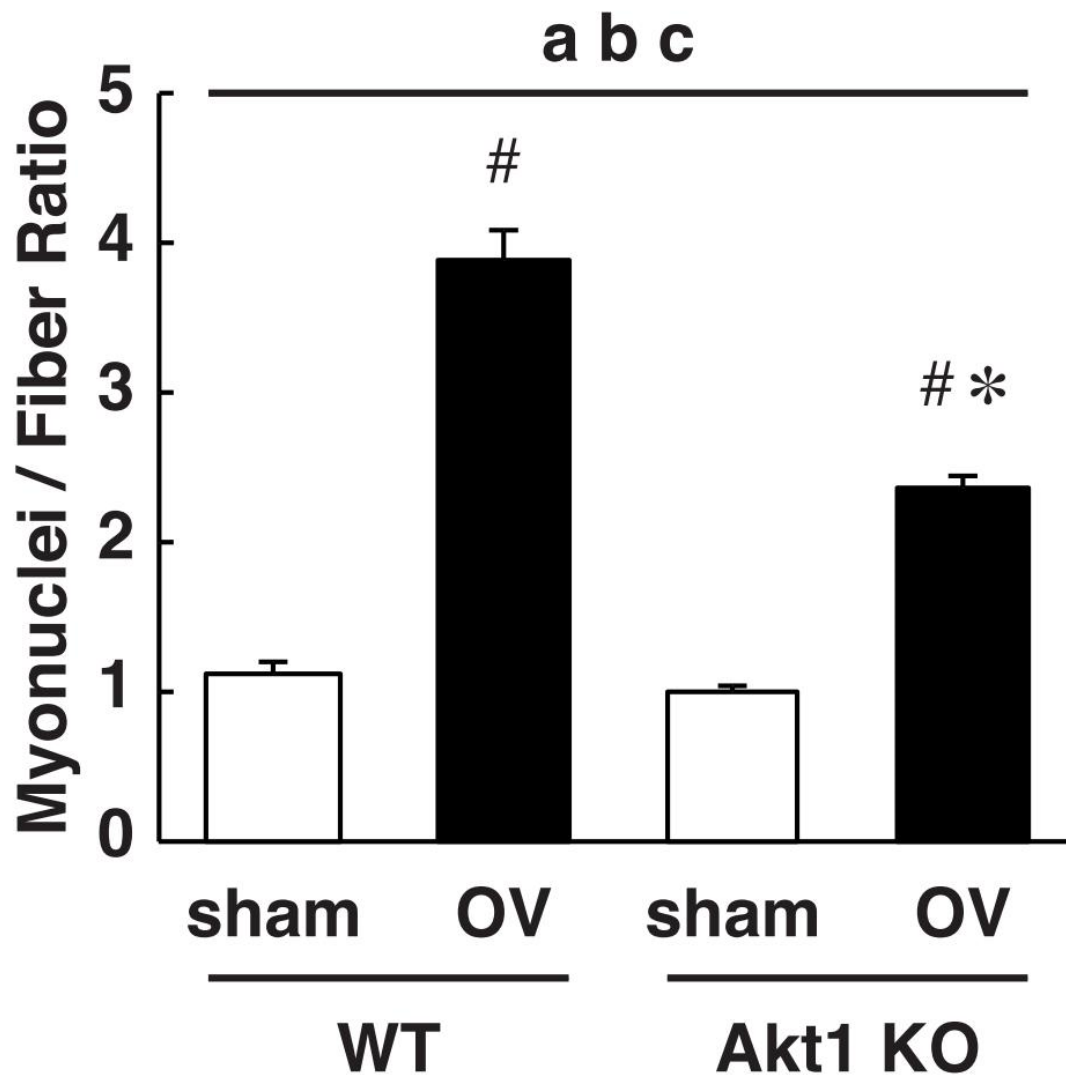


図 41 筋線維あたりの筋核数

筋線維あたりの筋核数を図に示す (各群 n=6). 全サンプルの筋全体から 1 サンプルあたり 30~40 本の筋繊維を無作為に選択し筋核数をカウントした. 結果は平均値 ± 標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, a は WT VS KO , b は sham VS OV の主効果 , c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定実施し, #は sham VS OV, \*は WT VS KO が有意であったことを示す (p<0.05).

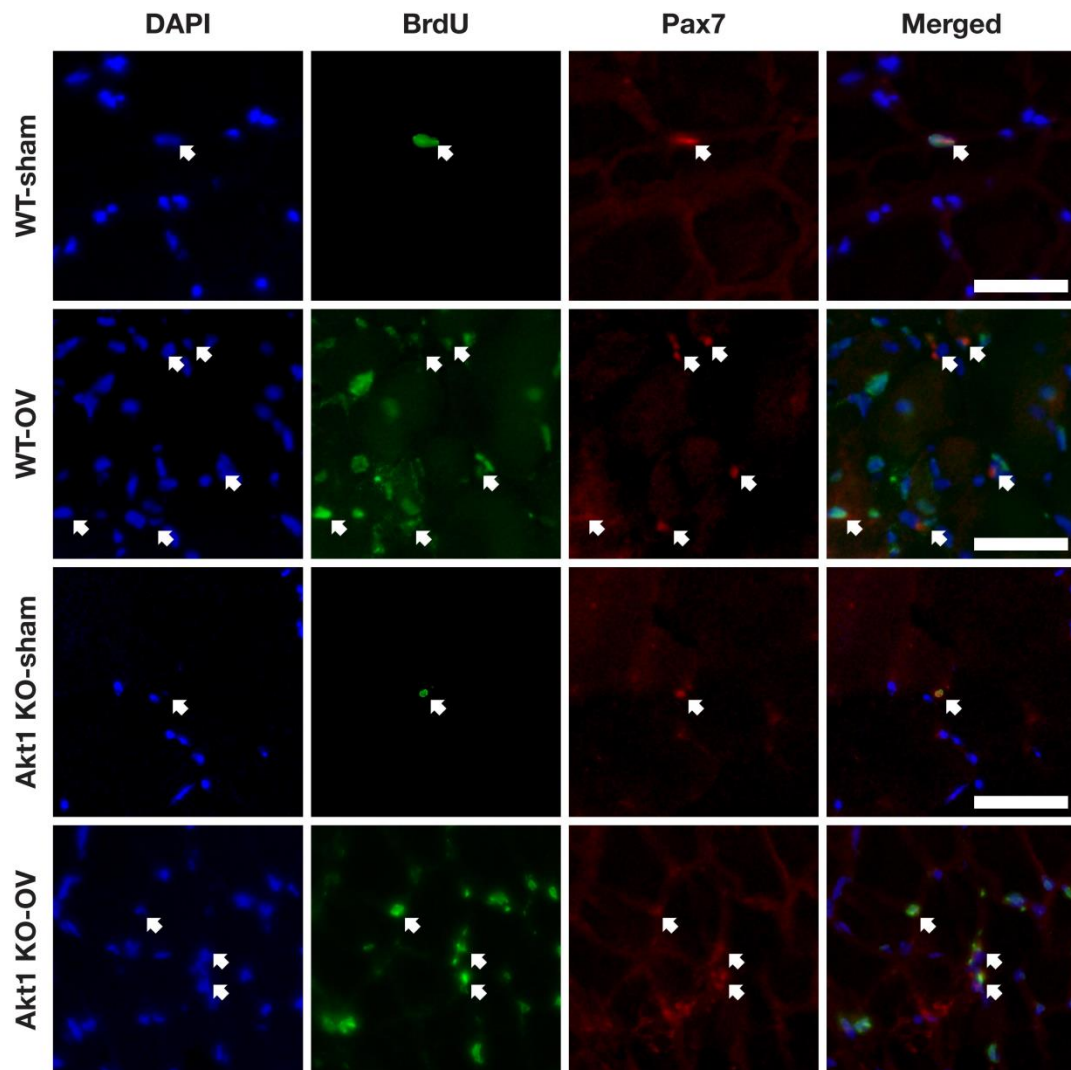


図 42 Pax7, BrdU, DAPI の共染色画像

マウスの足底筋横断面の免疫染色画像の典型像を図に示す。抗 BrdU 抗体および 2 次抗体によって新たに増殖した細胞の核が緑色に，抗 Pax7 抗体および 2 次抗体によって筋衛星細胞が赤色に，DAPI によって核が青色に染色される。それぞれで得られた画像をマージした。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。白色の矢印は新たに増殖した筋衛星細胞（Pax7+ / BrdU+ / DAPI+）を示す。

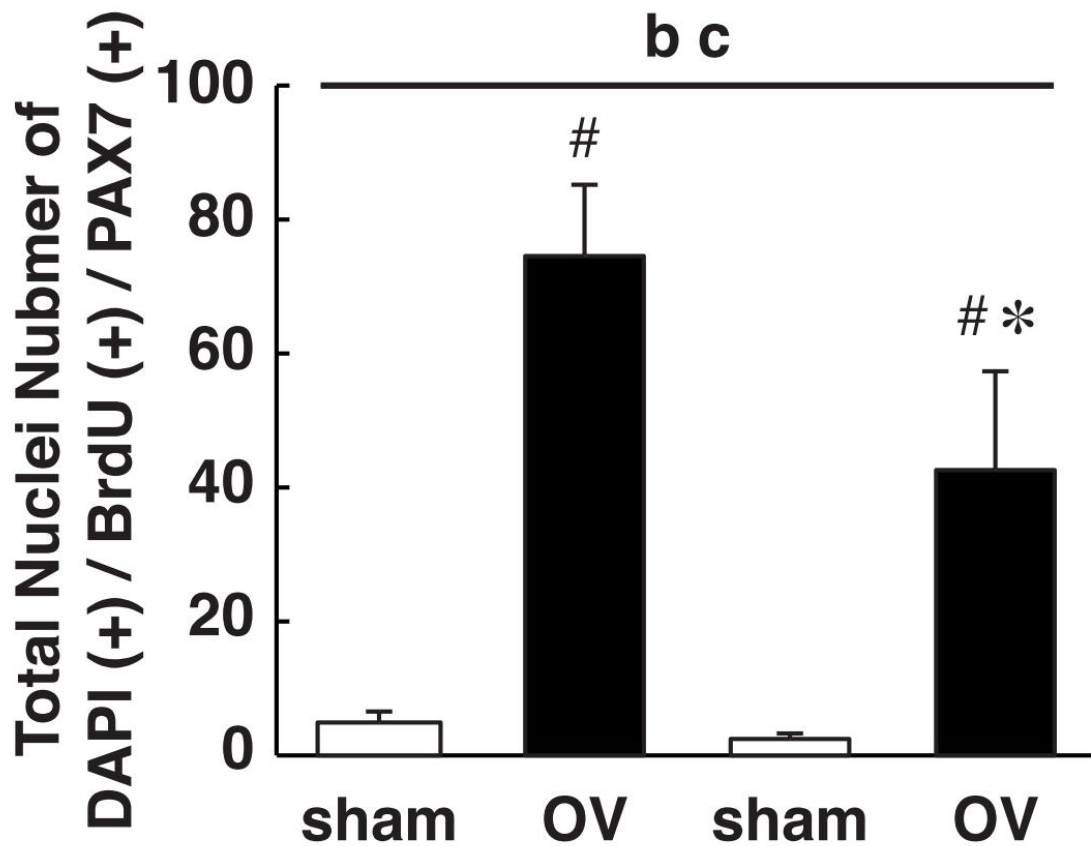


図 43 新たに増殖した筋衛星細胞数

新たに増殖した筋衛星細胞数を図に示す(各群 n=4). 各サンプルの筋全域において新たに増殖した筋衛星細胞数の数を計測している. 結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示される. 二元配置分散分析を実施し, b は sham VS OV の主効果, c は遺伝子型と実験操作の相互作用が有意であったことを示す. 事後検定として Tukey の多重比較検定実施し, # は sham VS OV, \* は WT VS KO が有意であったことを示す.



表 1 使用した抗体

Laminin antibody (Cat#: L9393、Sigma-Aldrich)
Akt1 (Cat#: 2967、Cell Signaling Technology)
Akt2 (Cat#: 2964、Cell Signaling Technology)
Akt3(Cat#: 8018、Cell Signaling Technology)
pan-Akt (Cat#: 4691、Cell Signaling Technology)
phospho-S6K1 (T389, Cat#: 9205、Cell Signaling Technology)
phospho-S6K1 (T421/S424, Cat#: 9204、Cell Signaling Technology)
phos-rpS6 (S235/236, Cat#: 4858、Cell Signaling Technology)
phos-rpS6 (S240/244, Cat#: 5364、Cell Signaling Technology)
rpS6 (Cat#: 2317、Cell Signaling Technology)
phos-4E-BP1 (Thr37/46, Cat#: 2855、Cell Signaling Technology)
4E-BP1 (Cat#: 9644、Cell Signaling Technology)
phos-NDRG1 (Thr346, Cat#: 5482、Cell Signaling Technology)
NDRG1 (Cat#: 5196、Cell Signaling Technology)
phospho-GSK3 $\beta$ (Ser9, Cat#: 5558、Cell Signaling Technology)
GSK3 $\beta$ (Cat#: 9832、Cell Signaling Technology)
phospho-PRAS40 (Thr246, Cat#: 13175、Cell Signaling Technology)
PRAS40 (Cat#: 2691、Cell Signaling Technology)
phos-MEK1/2 (Ser217/221, Cat#: 9154、Cell Signaling Technology)
MEK1/2 (Cat#: 4694、Cell Signaling Technology)
phos-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cat#: 4370、Cell Signaling Technology)
ERK1/2 (Cat#: 4696、Cell Signaling Technology)
ubiquitin (Cat#: 3936、Cell Signaling Technology)
cleaved-PARP (Asp214, Cat#: 9548、Cell Signaling Technology)
caspase3 (Cat#: 9665、Cell Signaling Technology)
REDD1 antibody (Cat#: 10638-1-AP、Proteintech)
LC3 (Cat#: M186-3、MBL)
p62 (Cat#: PM045、MBL)
GAPDH (Cat#: sc-32233、Santa Cruz Biotechnology)

S6K1 (Cat#: sc-230, Santa Cruz Biotechnology)

Pax7 (Cat#: sc-81648, Santa Cruz Biotechnology)

Puromycin antibody (Cat#: MABE343, EMD Millipore)

BrdU (Cat#: ab6326, Abcam)

dystrophin (Cat#: ab15277, Abcam)

Alexa Fluor 488-conjugated anti-Rat IgG (Cat#: ab150157, Abcam)

Alexa Fluor 568-conjugated anti-Rabbit IgG (Cat#: ab175471, Abcam)

IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (Cat#: 926-32210, LI-COR Biosciences)

IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG (Cat#: 926-68021, LI-COR Biosciences)

Alexa Fluor 680-conjugated Goat anti-Mouse IgG2a (Cat#: A31563, Thermo Fisher Scientific)

Alexa Fluor 568-conjugated Goat anti-Mouse IgG (Cat#: A11031, Thermo Fisher Scientific)