

サルコペニア発症の性差を紐解く骨格筋受容体発現制御

吉原利典*

REGULATION OF SKELETAL MUSCLE RECEPTOR EXPRESSION UNRAVELING SEX DIFFERENCES IN THE DEVELOPMENT OF SARCOPENIA

Toshinori Yoshihara

Key words: angiotensin II type I receptor, sarcopenia, sex difference.

緒言

男女の生物学的な違いは運動効果の獲得や筋萎縮の生じやすさに多大な影響を与えることから、女性アスリートの競技力向上のみならず、高齢男性の加齢による骨格筋量減少（サルコペニア）に関与すると考えられる。これまで、雌性ラットでは筋萎縮に対して骨格筋量を負に調節する因子の活性化が生じやすいことが明らかにされているが、いまだに制御メカニズムの特定には至っていない。

近年、アンジオテンシン II 1 型受容体（angiotensin II type I receptor; AT1R）の骨格筋恒常性の維持における役割が注目されており、筋機能障害の潜在的な治療標的となっている⁹⁾。特に、サルコペニアに関する国内外の研究では、2000年頃からアンジオテンシン II 変換酵素（angiotensin-converting enzyme; ACE）阻害剤による骨格筋機能の改善に着目した研究が行われ、ACE 阻害剤治療による筋力・身体機能の改善や横断研究における ACE と下肢筋量との関連が臨床試験および動物実験において示されている²⁻⁷⁾。加えて、Deminice

ら³⁾は、組織化学的にみた細胞膜上の AT1R 発現量やタンパク質発現レベルは、遅筋線維と比較して速筋線維で約 2 倍も高いことを明らかにしている。すなわち、速筋線維で認められるようなレジスタンス運動に対する高い適応応答やサルコペニアでの速筋線維の選択的萎縮による男性の急激な骨格筋量の低下に関与していると考えられるが、AT1R 発現がサルコペニアに及ぼす影響は明らかではない。

そこで本研究では、各月齢における AT1R 発現量の性差と骨格筋量により評価される筋表現型との関連を明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、性差を考慮したサルコペニア予防運動プログラムの開発に応用可能な証拠を提供することができ、本邦のさまざまな健康問題の解決や生涯自立した生活の実現に広く貢献することが期待される。

方法

A. 実験 1：実験動物および筋サンプリング
まず、骨格筋の加齢に伴う AT1R 発現の変化お

* 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University, Chiba, Japan.

よびその性差を明らかにするために、Wistar 系雄性21匹・雌性ラット20匹を用い、6か月齢（成熟）、12か月齢（中齢）および24か月齢（高齢）の各エンドポイントにおいて前脛骨筋を摘出した（各6～7匹）。ラットは、室温 $24.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、湿度50～60%、12時間の明暗サイクルを維持した環境下で飼育した。また、水と飼料は自由に摂取させるが、サンプリング前には非活動期に12～16時間程度の絶食とした。なお、本研究のプロトコルは、順天堂大学における動物使用に関する規則に従い、実験動物等部門委員会の承認を得たうえで実施した（承認番号：2021-27および2022-22）。

B. 実験2：アデノ随伴ウイルス投与および筋サンプリング

次に、AT1Rの発現制御が加齢による筋萎縮に与える影響を明らかにするために、21か月齢 Wistar 系雄性ラット7匹を用い、前脛骨筋への組換え型アデノ随伴ウイルス（recombinant adeno-associated virus; rAAV）ベクター（AT1R ショートヘアピン RNA（AAV9-GFP-U6-rAT1R-shRNA, Vector Biolabs））投与の影響を検討した。

具体的には、実験1をもとに雌性ラットの前脛骨筋における AT1R 発現量と同等（ -20% 程度）になるように AAV9-GFP-U6-rAT1R-shRNA を生理食塩水で希釈し、 3.0×10^{11} GC となるように31Gのマイクロシリンジにより片脚の前脛骨筋に直接注入した（AAV脚）。反対側の脚には、同量の生理食塩水を注入し、対照脚とした（Control：CON脚）。24か月齢時（3か月後）に、イソフルラン麻酔下で心臓摘出により安楽死させた後、前脛骨筋を摘出した。

C. サンプル処理

ラットの前脛骨筋の一部（40～50 mg 程度）を切り出し、protease inhibitor cocktail（Complete EDTA-free, 1873580, Roche）および phosphatase inhibitor cocktail（PhosSTOP, 4906837, Roche）を含んだ5倍量の Homogenate Buffer 中（20 mM HEPES pH 7.4, 4 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100）でホモジナイズした。その後、 $12000 \times g$ 、 4°C で15分間遠心分離して上清を回収した。得られた上清のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit（23225, Thermo）を用いて測定し、

濃度が 2.0 mg/ml になるように Laemmli サンプルバッファー（1610737, BioRad）を用いて調整した。その後、すべてのサンプルを 95°C で5分間加熱し、分析まで -20°C で凍結保存した。

D. ウェスタンブロッティング

タンパク質発現量の分析には、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。サンプルは、各レーン当たり $10 \mu\text{g}$ のタンパク質を負荷し、 $3 \mu\text{l}$ の分子量マーカー（プレジジョン Plus プロテインデュアルスタンダード, 161-0374, Bio Rad）とともに泳動した。泳動後ゲルを、ミニトランスブロッドセル（Bio Rad）を用いて 80 V で45分間通電し、イミュン-ブロット PVDF 膜（162-0176, Bio Rad）にタンパク質を転写した。その後、EveryBlot（12010020, Bio Rad）を用いて室温で20分間のブロッキング処理を行った。

ブロッキング処理後、3%ウシ血清アルブミン/0.1% Tween-20- トリス緩衝生理食塩水（T-TBS）で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。用いた抗体は、AGTRA（1：4000, AF211026630-001, コスモ・バイオ）、eGFP（1：2000, CAB4211, Invitrogen）、phosphorylated Thr180/Tyr182- p38 mitogen-activated protein kinase（MAPK）（1：2000, 9211, Cell Signaling）、p38 MAPK（1：2000, 9212, Cell Signaling）、phosphorylated Thr202/Tyr204- extracellular signal-regulated kinase（ERK）1/2（1：2000, 9234, Cell Signaling）、ERK1/2（1：2000, 9202, Cell Signaling）、phosphorylated Thr37/46- eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1（4EBP1）（1：2000, 9459, Cell Signaling）および4EBP1（1：2000, 9459, Cell Signaling）であった。一次抗体反応終了後、T-TBSで10分×2回洗浄し、室温で1時間の二次抗体反応を行った。二次抗体は、3%ウシ血清アルブミン/T-TBSで 1×10^4 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG HRP-linled antibody（7074, Cell Signaling）または Anti-Mouse IgG HRP-linled antibody（7076, Cell Signaling）を用いた。二次抗体反応終了後、T-TBSで10分×3回洗浄し、ECL Prime（RPN2232, Cytiva）を用いて発光させた。

E. 統計解析

得られたデータは、実験1では6か月齢雄性

ラットを、実験2ではCON脚の平均値を1とした場合の発現率で示した(平均値±標準偏差)。統計学的分析は、性別の加齢に伴う各変数の差については月齢(Age)×性別(Sex)の要因について二元配置分散分析を、2群間の差の比較には対応のある/ないT検定またはSidak法による多重比較を行った。有意水準は危険率5%とした。

結 果

A. 前脛骨筋重量および低下率(実験1)

前脛骨筋の相対筋重量には月齢および性別の主効果が認められたが、有意な交互作用は認められなかった(図1)。しかしながら、6か月齢に対する24か月齢の前脛骨筋重量の比率を比較したところ、雄性ラットは雌性ラットと比較して有意に低い比率を示した(雄性ラット-15.6% vs 雌性

ラット-10.4%, $P=0.0134$)。

B. AT1R 発現量(実験1)

AT1R 発現量には月齢および性別の主効果が認められた($P=0.0135$ および $P=0.0015$)(図2)。

C. 前脛骨筋重量(実験2)

AT1R ショートヘアピンRNAを投与した3か月後の前脛骨筋重量には、CON脚とAAV脚との間で有意な差は認められなかった(CON脚 557.3 ± 74.0 vs AAV脚 553.9 ± 70.4 , $P=0.6946$)(図3)。

D. AT1R および GFP 発現量(実験2)

AAV脚のAT1R 発現量は、CON脚と比較して有意に低い値を示した(CON脚 1.00 ± 0.40 vs AAV脚 0.77 ± 0.45 , $P=0.0114$)(図4)。また、GFP 発現量はAAV脚で有意に高値を示した(CON脚 1.00 ± 0.24 vs AAV脚 23.68 ± 7.90 , $P=0.0003$)。

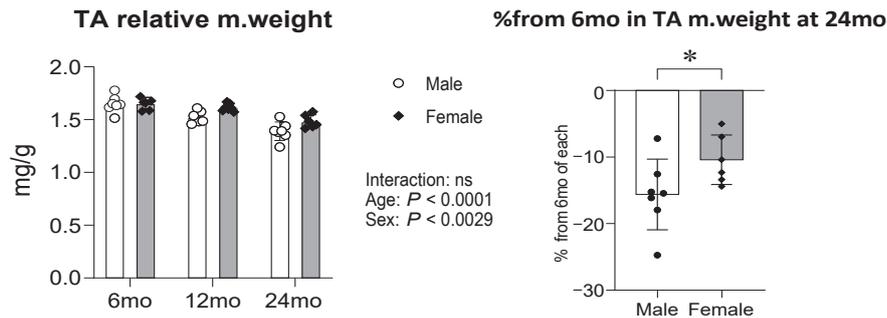


図1. 前脛骨筋重量および6か月齢に対する比率(実験1)

Fig.1. Tibialis anterior (TA) muscle weight and % from 6mo in the msucle weight at 24mo (Experiment 1).

Data are shown for 6-month-old (6mo), 12-month-old (12mo), and 24-month-old (24mo) rats (n = 6-7 per group), and are expressed as mean ± standard deviation.

* $P < 0.05$.

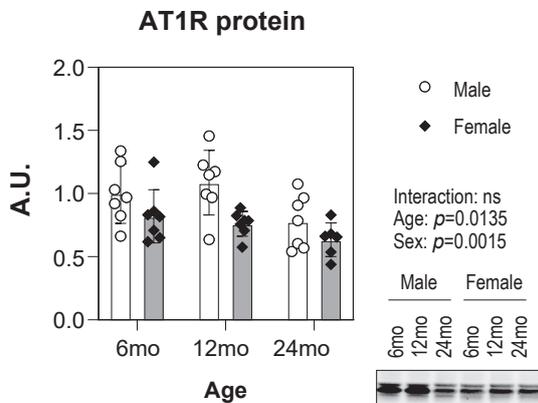


図2. アンジオテンシンII型受容体発現量(実験1)

Fig.2. Angiotensin II type I receptor (AT1R) expression (Experiment 1).

Data are shown for 6-month-old (6mo), 12-month-old (12mo), and 24-month-old (24mo) rats (n = 6-7 per group), and are expressed as mean ± standard deviation.

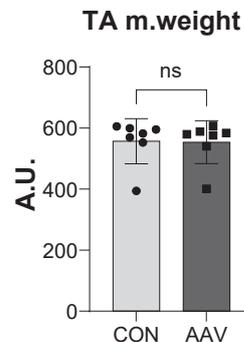


図3. 前脛骨筋重量(実験2)

Fig.3. Tibialis anterior (TA) muscle weight (Experiment 2).

Data are shown for saline-injected control (CON), and AT1R-shRNA-injected (AAV) legs (n = 7), and are expressed as mean ± standard deviation. ns; not significant.

E. 細胞内シグナル伝達 (実験 2)

4EBP1 (CON 脚 1.00 ± 0.22 vs AAV 脚 0.97 ± 0.20 , $P = 0.5544$)、ERK (CON 脚 1.00 ± 0.15 vs AAV 脚 0.87 ± 0.11 , $P = 0.0692$) および p38 MAPK (CON 脚 1.00 ± 0.39 vs AAV 脚 1.11 ± 0.31 , $P = 0.3355$) のリン酸化率には、CON 脚と AAV 脚との間で有意な差は認められなかった (図 5)。

考 察

本研究では、各月齢における AT1R 発現量の性差と骨格筋量により評価される筋表現型との関連を明らかにすることを目的とした。まず、ラットの各月齢における相対筋重量の違いとその性差について検討したところ、雄性ラットおよび雌性ラットの前脛骨筋重量は24か月齢において有意に低値を示し、6か月齢に対する比率は雌性ラット

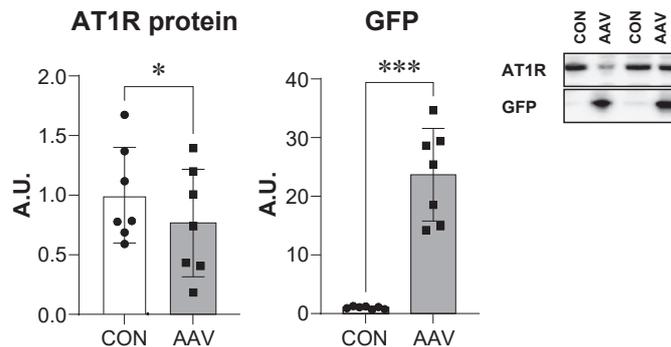


図 4. アンジオテンシン II 1型受容体および緑色蛍光タンパク質発現量(実験 2)

Fig.4. Angiotensin II type I receptor(AT1R) and green fluorescent protein(GFP) expression levels(Experiment 2).

Data are shown for saline-injected control(CON), and AT1R-shRNA-injected(AAV) legs(n = 7), and are expressed as mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

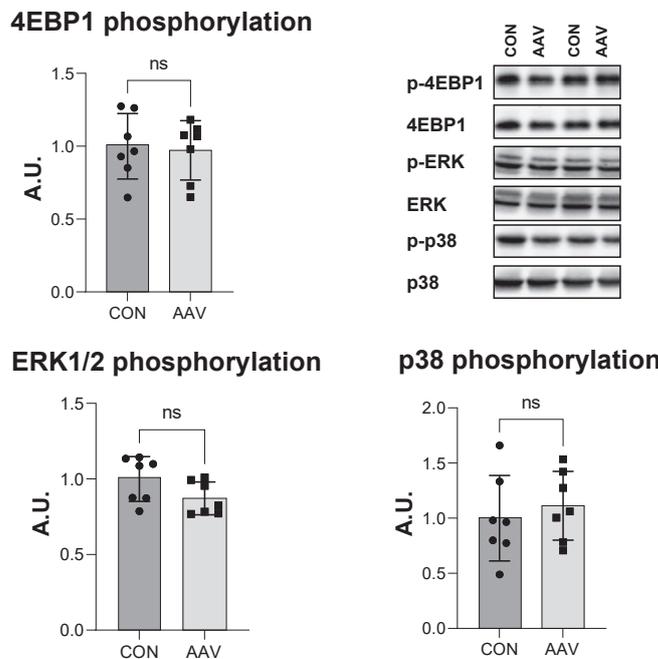


図 5. 細胞内シグナル伝達リン酸化率(実験 2)

Fig.5. Phosphorylation of the Intracellular signaling(Experiment 2).

Data are shown for saline-injected control(CON), and AT1R-shRNA-injected(AAV) legs (n = 7), and are expressed as mean \pm standard deviation. ns; not significant, 4EBP1; 4E-binding protein 1, ERK; extracellular signal-regulated kinase.

と比較して雄性ラットで有意に小さかった。これまで女性と比較して男性では加齢とともに急激な骨格筋量の低下が生じることが知られており、本研究のデータはその結果を支持するものであった。次に、加齢に伴う AT1R 発現量の変化およびその性差について検討したところ、AT1R 発現量は両性別において24か月齢で有意に低値を示したが、雄性ラットの AT1R 発現量は雌性ラットと比較して有意に高値を示した。AT1R は、血圧の調節において重要な役割を担うレニン・アンジオテンシン系 (RAS) における G タンパク質共役受容体であり、生理活性ペプチドであるアンジオテンシン II がこの受容体に結合されることで、昇圧応答が引き起こされる。しかしながら、近年ではこの古くから存在する RAS の新たな役割に注目が集まっている。すなわち、RAS が骨格筋恒常性の維持においても重要な役割を担っていることが明らかにされてきており⁸⁾、筋機能障害の潜在的な治療標的として注目されている⁹⁾。更に、AT1R は骨格筋において酸化ストレスの産生に関与することから⁴⁾、先行研究では受容体遮断薬を使用して直接アンジオテンシン II と AT1R との結合を阻害することで、活性酸素種を介して生じるネガティブなシグナル伝達を抑制し、高齢マウスの前脛骨筋¹⁾ や機械的人工換気によるラット横隔膜⁵⁾ における筋萎縮を抑制することが明らかにされている。これらのことから、雌性ラットと比較して雄性ラットにおいて6か月齢に対する24か月齢の筋重量の比率が小さかった理由として、AT1R 発現量が20%程度高値を示すことが要因と考えられる。

そこで、AT1R ショートヘアピン RNA を雄性ラットの前脛骨筋に注入し、雄性ラットの AT1R 発現量を雌性ラットと同等の発現レベルに制御し、サルコペニアの進行に及ぼす影響について検討した。本研究の結果、AT1R 発現量は CON 脚と比較して AAV 脚で23%低い値を示した。しかしながら、AAV 脚の前脛骨筋重量は、CON 脚と比較して有意な差は認められなかったことから、雄性ラット前脛骨筋における AT1R 発現量の制御はサルコペニア予防の手段ではない可能性が示唆される。これまで、サルコペニアに関する国内外の研

究では、2000年頃から ACE 阻害剤による骨格筋機能の改善に着目した研究が行われてきており、ACE 阻害剤治療による筋力・身体機能の改善や横断研究における下肢筋量との関連が臨床試験および動物実験において示されている²⁻⁷⁾。また、上述したように、活性酸素種の産生を抑制する作用により、高齢マウスの前脛骨筋における筋萎縮を抑制する¹⁾ ことも知られている。これらの結果は、ACE 阻害剤や AT1R 遮断薬の投与が筋機能障害に対する治療的アプローチとして有効であることを示している。一方、AT1R 遮断薬の1つであるロサルタンの投与はレジスタンス運動に対する骨格筋の適応 (肥大) の程度を低下させてしまうことも報告されており⁶⁾、AT1R を介した種々の作用 (シグナル伝達など) は、骨格筋の適応 (成長・再生) にとって必要不可欠な刺激であり、ACE 阻害剤や AT1R 遮断薬によるアプローチは、RAS 自体の機能を阻害してしまうのかもしれない。本研究では、安静時における4EBP1や ERK および p38 MAPK の活性化にネガティブな影響は認められなかった。このように、AT1R 発現量による悪影響はみられなかったが、本研究では濃度依存的な発現制御の影響については明らかではなく、少なくとも雌性ラットと同程度になるような20%程度の AT1R 発現量の低下が、加齢による筋表現型の退行的な変化に関与している可能性は低いのではないかと考えられる。

総 括

本研究の結果、AT1R 発現量は高齢ラットの前脛骨筋で有意に低値を示し、その発現量には性差が認められることが明らかとなった。一方、雄性ラットにおける AT1R 発現量の発現低下はサルコペニアの進行に影響を与えないことが示された。本研究では、骨格筋組織全体の AT1R 発現量について検討を行ったが、AT1R 発現量は血管内皮細胞に豊富に含まれていることが報告されているため、今後は筋組織全体ではなく、1本の筋線維を取り出し、血管の影響を排除したうえで、AT1R 発現量の加齢変化および発現制御の影響を明らかにする必要があると考えられる。

謝 辞

本研究に助成いただきました公益財団法人明治安田厚生事業団に深く感謝申し上げます。研究の遂行にあたり、ご協力いただきました筑波大学助教の土橋祥平先生に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Burks TN, et al. (2011): Losartan restores skeletal muscle remodeling and protects against disuse atrophy in sarcopenia. *Sci Transl Med*, **3**, 82ra37.
- 2) Cesari M, et al. (2009): Angiotensin-converting enzyme inhibition and novel cardiovascular risk biomarkers: results from the Trial of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors (TRAIN) study. *Am Heart J*, **157**, 334.e1-334.e8.
- 3) Deminice R, et al. (2020): Human and rodent skeletal muscles express angiotensin II type 1 receptors. *Cells*, **9**, 1688.
- 4) Hord JM, et al. (2021): Nox2 signaling and muscle fiber remodeling are attenuated by losartan administration during skeletal muscle unloading. *Physiol Rep*, **9**, e14606.
- 5) Kwon OS, et al. (2015): AT1 receptor blocker losartan protects against mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction. *J Appl Physiol* (1985), **119**, 1033-1041.
- 6) McBride TA (2006): AT1 receptors are necessary for eccentric training-induced hypertrophy and strength gains in rat skeletal muscle. *Exp Physiol*, **91**, 413-421.
- 7) Onder G, et al. (2002): Adverse drug reactions as cause of hospital admissions: results from the Italian Group of Pharmacoepidemiology in the Elderly (GIFA). *J Am Geriatr Soc*, **50**, 1962-1968.
- 8) Powers SK, et al. (2018): The renin-angiotensin system and skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, **46**, 205-214.
- 9) Ranjbar R, et al. (2019): The potential therapeutic use of renin-angiotensin system inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *J Cell Physiol*, **234**, 2277-2295.