

学 位 論 文

老齡マウス骨格筋の筋線維タイプ単位

におけるサルコペニアの筋病態解析

Fiber type specific skeletal muscle pathology
in sarcopenia with aging mice

東京農工大学大学院 連合農学研究科

応用生命科学専攻

応用生物化学大講座

福永 大地

主指導教官：重本和宏

目次

略語一覽	P 3-4
1. 要旨	P 5-7
2. 序論	P 8-14
3. 方法	P 15-40
4. 結果	P 41-71
5. 考察	P 72-83
6. 総括	P 84-86
7. 参考文献	P 87-101
8. 謝辞	P 102

略語一覽

MuRF1: Muscle RING-Finger Protein-1

SOL: soleus

EDL: extensor digitorum longus OXPHOS: oxidative phosphorylation

RRFs: ragged red fibers

COX: cytochrome c oxidase

NADH-TR: nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase

SDH: succinate dehydrogenase

IGF1: insulin-like growth factor 1

ATP: adenosine triphosphate

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

mTOR: mammalian target or rapamycin

PBS: phosphate-buffered saline

PFA: paraformaldehyde

BSA: bovine serum albumin

mGT: modified gomori trichrome

TEM: Transmission electron microscopy

ADP: adenosine diphosphate

TMPD: N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine

PPAR δ : peroxisome proliferator-activated receptor delta

AMPK α 1: protein Kinase AMP-Activated catalytic subunit alpha 1

Mfn1: mitofusin-1

Mfn2: mitofusin-2

Drp1: dynamin related protein 1
Opa1: optic atrophy protein 1
Pink1: PTEN-induced kinase 1
Txnrd1: thioredoxin reductase 1
Gclc : glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
Srxn1: sulfiredoxin-1
HIF1 α : hypoxia inducible factor-1 α
PKM: pyruvate kinase muscle isozyme
PDK1: 3-phosphoinositide-dependent kinase-1
Atrogin1: F-box only protein 32
Foxo1: forkhead box protein O1
Cblb: Cbl proto-oncogene B
Actb: β -actin

1. 要旨

[背景] 加齢に伴う骨格筋の萎縮および筋機能の低下と定義されるサルコペニアは、高齢者の身体活動を損なう主要な要因となっている。近年、サルコペニアを定義する上で、従来からの指標である筋量や筋力の低下だけでなく、筋質の変化も考慮する必要性が報告された。サルコペニアの新しい定義に基づいたサルコペニア発症メカニズムの解明は、効果的な治療および予防方法の開発につながる可能性がある。また、筋質の変化を明らかにすることで、老齢マウスなどの非臨床動物モデルを用いて薬理的介入の有効性を病理学的に評価することが可能となることから、筋病理学的なサルコペニアの定義を確立することは重要である。これまでの先行研究の結果から、サルコペニア発症要因として、ミトコンドリア機能障害や筋蛋白質分解・合成バランスの変化などが考えられている。しかし、それらの詳細な因果関係は未解明である。骨格筋は、代謝と収縮特性の違いによって酸化系代謝の遅筋線維や解糖系代謝の速筋線維など複数の筋線維タイプから成るヘテロな細胞集団であり、筋線維タイプの性質変化とサルコペニアとの関連性が示唆されている。これまでに、加齢に伴うミトコンドリア機能低下や、筋蛋白質分解の変化は筋線維タイプ特異性を示すことが示唆されているが、筋線維タイプ単位の筋病態の加齢変化については不明な点が多い。

[目的] ミトコンドリア機能と形態の加齢変化を筋線維タイプ単位で解析し、ミトコンドリア病態の加齢変化とサルコペニアとの関連性について明らかにすること、筋蛋白質分解の指標である E3 ユビキチンリガーゼ Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) 発現変化を筋線維タイプ単位で解析し、加齢

に伴う筋線維萎縮と筋蛋白質分解の変化との関連性についての見識を深めること、これらの筋病態変化に関与する分子メカニズムを検討することを目的とした。

[方法] 本研究では、若齢群（6-8ヶ月齢, young）、中齢群（19-20ヶ月齢, middle-aged）、高齢群（29-32ヶ月齢, old）の雌マウスを用いた。遅筋優位筋のひらめ筋（soleus; SOL, 主に type I と IIA 線維で構成される）と速筋優位筋の長趾伸筋（extensor digitorum longus; EDL, 主に type IIX と IIB 線維で構成される）の2つの下肢骨格筋における、筋病理および機能を解析した。筋病理は、凍結筋横断切片の連続切片を作製し、ミトコンドリア病理染色、筋線維タイプや MuRF1 に対する免疫染色を行った。得られた染色像を、画像解析ソフト Image-J を用いて定量的に解析した。酸化リン酸化機能（oxidative phosphorylation, OXPHOS）を解析するために、high-resolution oxygen sensor を用いた測定を行った。また、ミトコンドリア関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、筋蛋白質分解・合成関連遺伝子の mRNA 発現変化を解析した。

[結果] old 群の SOL と EDL はともに筋重量の減少を認めた。筋線維形態を解析した結果、old 群の SOL において、type IIA と IIX/IIB 線維数の減少を認めた。old 群の EDL において、type IIB 線維の数と面積の減少を認め、type IIB 面積の低下は middle-aged 群から認められた。ミトコンドリア病理解析の結果、加齢した SOL において、type I 線維特異的なミトコンドリア呼吸酵素（cytochrome c oxidase; COX、nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase; NADH-TR）活性の減少および、type I と IIA 線維における subsarcolemmal 領域のミトコンドリア蓄積が認められた。筋の呼吸機能測定の結果、加齢した SOL において OXPHOS 機能低下を認めた。

このようなミトコンドリア病態変化は、筋重量減少に先行して middle-aged 群で認められたが、筋線維萎縮との相関は小さいことを明らかにした。また、SOL におけるミトコンドリア蓄積は、ミトコンドリア病理染色性の違いから、従来から知られているミトコンドリア病理像 ragged red fibers (RRFs) とは異なる所見であることを示した。さらに、低酸素状態が関与した酸化ストレスの蓄積が、SOL におけるミトコンドリア病態変化に関連している可能性を示した。EDL においては、明確なミトコンドリア病態変化を認めなかった。一方、middle-aged 群の EDL において、type IIX と IIB 線維における MuRF1 発現上昇を認めた。middle-aged 群の SOL においては、筋蛋白質合成関連遺伝子である insulin-like growth factor 1 (IGF1) の発現減少を認めた。

[考察] 加齢に伴うミトコンドリア病態変化は、筋線維の萎縮を誘導するのではなく、筋の質的な変化に伴う筋機能低下（代謝機能、筋力、持久力など）に関与することが示唆された。SOL と EDL における筋線維の萎縮においては、それぞれ、MuRF1 発現上昇を介した筋蛋白質分解亢進や、IGF1 発現減少を介した筋蛋白質合成低下の関与が考えられた。本研究において、サルコペニアは筋線維タイプ単位で発症メカニズムが異なることが示され、予想以上に複雑なメカニズムが存在する可能性が考えられた。サルコペニア発症メカニズムの更なる解明が必要であるが、本研究の結果は、サルコペニア動物モデルとしての筋病理学的な所見は、今後有用な指標になると考えられた。

2. 序論

骨格筋は、体重の約 40%を占めており、運動と代謝の点において我々の身体活動を支えている重要な組織である。骨格筋量は加齢に伴い減少する。一般的に、骨格筋量は 20～30 代の頃にピークをむかえるが、それ以降は徐々に減少し、80 歳までにはピーク時の 30～40% の筋量が減少すると言われている [1]。加齢に伴う骨格筋量の減少は、全ての筋で均一に生じるわけではなく、下肢において特に顕著に認められる [2,3]。下肢骨格筋量の減少は、高齢者の身体活動量を低下させるだけでなく、転等などによる骨折の危険性を増加させ、場合によっては寝たきり状態などの要介護問題へと発展し得ることから、高齢者の日常生活動作 (activities of daily living, ADL) と生活の質 (quality of life, QOL) を損なう主な要因となっており、高齢社会を向かえた日本や欧米などの先進国において、社会的かつ経済的に重要な研究課題となっている [3,4]。このような加齢に伴う骨格筋量の減少は、ギリシャ語で筋肉を示す sarco と減少を示す penia との単語を合わせた造語であるサルコペニア (sarcopenia) という概念として、1989 年に Irwin Rosenberg によって提唱された [3]。当初は、サルコペニアは、加齢に伴う骨格筋量の減少と定義され研究が進められていたが、その後、疫学研究が進むにつれて、筋量の減少のみならず筋力や身体機能の低下も考慮する必要性が報告された。多くの疫学研究により、サルコペニアは、高齢者の ADL や QOL を損なうだけでなくフレイルや認知症など様々な老年病症候群と関連しており [5,6]、高齢者の要支援や要介護、寿命においても影響を与えることが明らかとなってきた [7]。そして 2016 年の 10 月 1 日に、サルコペニアは国際疾病分類 ICD-10 のコードを取得し、独立した疾患として認知されるようになり、世界的にその注目度がますます高まってきている。

サルコペニアの最初の診断基準は、2010年に、European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) によって提唱された。EWGSOP は、「進行的な骨格筋量と筋力の低下を特徴とする症候群で、身体的な機能障害、QOLの低下、死のリスクを伴うもの」をサルコペニアと定義し、主に筋量と筋力を指標としたガイドラインを提示した。その後、2018年にEWGSOPは、新たな指標として筋の質（muscle quality）に基づいた観点をサルコペニアの定義として改定した[8]。現在のところ、この新たな定義に加わった筋質の指標としては、筋量あたりの筋力を採用している[8]。一方で、最近の研究では、骨格筋内の脂肪やコラーゲンなどの結合組織量の変化なども筋質の指標として検討が進められているように[9,10]、サルコペニアにおける筋質の変化に着目した研究は、今後ますます進展していくものと予想される。サルコペニアの新しい定義に基づいて、従来からの指標である筋量や筋力の低下のみならず、筋質の変化も考慮して、サルコペニア発症メカニズムを解明することは、効果的な治療および予防方法の開発につながる可能性があることから、今後さらに高齢社会が加速する現代において、極めて重要な研究課題である。また、筋質の変化を明らかにすることで、老齢マウスなどの非臨床動物モデルを用いて薬理的介入の有効性を病理学的に評価することが可能となることから、筋病理学的なサルコペニアの定義を確立することは重要である。

サルコペニアは、加齢のみを背景因子とする原発性サルコペニアと、加齢に加えて基礎疾患に伴う活動量の減少や栄養不良などの二次的な要素を背景因子として持つ二次性サルコペニアに分類される。これまでの研究から、原発性サルコペニアの発症において、運動神経細胞の脱落、神経筋接合部の形態変化、筋サテライト細胞（筋の幹細胞）の減少、ミトコンドリア機能不全、筋蛋白質

分解の亢進や合成能の低下など、いくつかのメカニズムが関与していることが示唆されているが、詳細な発症メカニズムは未だ不明な点が多い[4]。

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) を介して細胞にエネルギー (adenosine triphosphate, ATP) を供給している重要な細胞小器官である[11]。遺伝子変異によって高度にミトコンドリア機能が喪失するミトコンドリアミオパチーは、重度な骨格筋量の減少と筋力低下を示すことから、ミトコンドリアは骨格筋機能の恒常性を維持する上で重要な役割を担っていると考えられている[12,13]。そして、加齢筋においても、ミトコンドリア機能の低下が認められることが知られている[14]。老齢動物 (マウスやラット) を用いた先行研究によると、加齢筋において、ミトコンドリア生合成の減少[15,16]、ミトコンドリア酵素活性の減少[15,17]、OXPHOS 機能の低下[17,18]、ragged red fibers (RRFs) と呼ばれるミトコンドリア形態異常を示す筋線維の増加[19,20]、ミトコンドリアの融合と分裂やミトファジー (ミトコンドリアのオートファジー) といったミトコンドリアダイナミクスの変化に伴うミトコンドリア形態変化[21,22]など、ミトコンドリアの機能的および形態的な変化が認められることが報告されている。また、このような加齢に伴うミトコンドリアの病態変化は、筋線維萎縮を伴う筋量の減少のみならず、筋の OXPHOS 機能低下や、筋力の低下といった、骨格筋機能の障害に密接に関連することが報告されている[16,17,19,21-23]。さらに、老齢動物だけでなく高齢者の骨格筋においても、ミトコンドリア生合成やミトコンドリア呼吸酵素活性の減少が認められることや[24-27]、ミトコンドリア呼吸酵素活性の低下と歩行速度や筋力の低下が相関を示すこと[24-26]が報告されている。一方で、ミトコンドリア生合成の重要な調節因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) を骨格筋特異的に発現誘導させた PGC-1 α トラン

スジェニックマウスは、加齢に伴うミトコンドリア機能低下を改善するだけでなく、筋線維の萎縮や筋機能の低下に対しても拮抗するという結果が示されている[15]。これらのエビデンスから、加齢に伴うミトコンドリアの病態変化は、サルコペニア発症における主要な原因の1つとして考えられている[28]。しかしながら一方で、近年の研究では、加齢に伴うミトコンドリア機能の低下は筋萎縮の程度と相関しないことや[17,29]、異なる骨格筋で比較するとミトコンドリア機能障害が均一に生じるわけではないこと[17,18]も報告されており、サルコペニアにおける筋病態と加齢に伴うミトコンドリア病態の変化との詳細な因果関係について未だ議論が続いている。

骨格筋の量は蛋白質分解と合成のバランスによって制御されている[4]。骨格筋において、主にユビキチンプロテアソーム経路による蛋白質の分解と、insulin-like growth factor 1 (IGF1)/ phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/ mammalian target or rapamycin (mTOR) 経路を介した蛋白質合成シグナルを主として、骨格筋量の恒常性が維持されていると考えられている[30,31]。加齢した骨格筋において、ユビキチンプロテアソーム関連遺伝子の発現上昇や、IGF1/PI3K/mTOR シグナルの減弱が認められることが報告されており、加齢に伴う筋蛋白質分解と合成のバランス変化は、上述したミトコンドリア病態変化に並んで、サルコペニア発症メカニズムの主要な要因を担っていると考えられている[4,16,30-33]。しかしながら、上述にあるミトコンドリア病態の加齢変化と同様に、加齢に伴う筋蛋白質分解と合成のバランス変化においても、骨格筋が異なれば変化が異なることが報告されており[32,33]、サルコペニアにおける筋蛋白質分解と合成の加齢変化の意義についても、議論が続いている。

我々は、サルコペニアの筋病態を理解する上で、骨格筋を構成する筋線維の多様性を考慮する必要があると考えている。哺乳類の骨格筋は、表 1 に記すように、代謝特性と収縮特性の違いに基づいて複数の筋線維タイプから構成されている。ミトコンドリアによる酸化的代謝特性を持ち、収縮速度は遅いが持久力の発揮に優れた type I 線維（遅筋線維）と、嫌氣的な解糖系代謝特性を持ち、収縮速度は速く瞬発力の発揮に優れた type IIB 線維（速筋線維）、そして、それらの中間的な性質を持つ type IIA 線維（type II 線維の中では type I 線維の特徴を持つ）と type IIX 線維（type II 線維の中では type IIB 線維の特徴を持つ）が存在する [34,35]。また、各筋線維タイプは、代謝特性や収縮特性の違いだけでなく、筋線維面積の大きさや筋線維に含有される毛細血管の量や局在性 [35-37]、さらには、蛋白質の合成能においても、異なる特徴を示すことが明らかとされていることから [38]、筋線維タイプの性質変化は筋の質的变化を伴うことが予想される。従って、骨格筋を多様性に富む細胞集団として捉え、サルコペニアの筋病態を理解する必要がある。実際に、加齢筋において、筋線維タイプの変化を伴うことが報告されている。加齢筋において、type I 線維よりも type II 線維の方が萎縮しやすいことが知られている [4]。老齢動物を用いた先行研究では、ミトコンドリア呼吸機能の加齢変化は、type I や IIA 線維が豊富に含まれる遅筋優位筋において主に認められること [17,18] や、定常状態におけるミトコンドリアの形態は、酸化的代謝の type I, IIA 線維と解糖系代謝の type IIX, IIB 線維との間で異なることが報告されている [39]。また、ユビキチンプロテアソームのマーカージン遺伝子である Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) の発現上昇は、type IIX と IIB 線維が豊富に含まれる速筋優位筋において主に認められるとの結果が報告されている [33]。これらのことから、ミトコンドリア機能や形態の加齢変化や、筋蛋白質分解と合成バランスの加齢変化は、筋線維タイプ単位で異なることが示唆されるが、各筋線維タイプにおける筋病態の

加齢変化についてはほとんど分かっていない。これまでの先行研究では、筋のホモジネートを用いた解析が多く、筋線維タイプ単位における加齢変化を解明する上で十分な情報は得られていなかった。さらに、加齢という非常に長いタイムコースにおいて、若齢群と老齢群の2時点のみの比較研究が多く、サルコペニア発症要因を明らかにする上では、サルコペニアが顕在化する以前の時点も含めて、加齢に伴う筋の質的变化を研究する必要がある。

本研究では、ひらめ筋 (soleus; SOL, 主に type I と IIA 線維で構成される遅筋優位筋) と長趾伸筋 (extensor digitorum longus; EDL, 主に type IIX と IIB 線維で構成される速筋優位筋) の2つの下肢骨格筋を評価対象として、筋病理学的評価や機能評価をもとに、ミトコンドリア呼吸機能および形態の加齢変化を筋線維タイプ単位で解析し、ミトコンドリア病態変化とサルコペニアとの関連性を明らかにすることを目的とした。また、筋蛋白質分解の指標として、E3 ユビキチンリガーゼ MuRF1 発現の加齢変化を筋線維タイプ単位で評価し、加齢に伴う筋線維萎縮と筋蛋白質分解の変化との関連性についての解析も行った。加えて、加齢した SOL と EDL において認められた筋病態変化の背景にあると考えられる分子メカニズムを示すために、ミトコンドリア生合成やダイナミクス関連遺伝子などのミトコンドリア関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、筋蛋白質分解と合成の関連遺伝子の発現の解析を行った。本研究において、若齢群 (6-8 ヶ月齢, young)、中齢群 (19-20 ヶ月齢, middle-aged)、高齢群 (29-32 ヶ月齢, old) の3群の雌マウスを使用した。

表 1. 筋線維タイプの特性について

ミオシン重鎖 アイソフォーム	遅筋線維		速筋線維	
	type I	type IIA	type IIX	type IIB
ミトコンドリア活性	高	高	中	低
解糖代謝酵素活性	低	低	高	高
代謝特性	酸化的代謝	酸化的代謝 解糖系代謝	酸化的代謝 解糖系代謝	解糖系代謝
収縮速度	遅	速 (type IIB > IIX > IIA)		
持久力	高	中	低	低
筋線維面積	小	中	中	大
毛細血管密度	高	中	低	低
筋蛋白質合成能	高	高	中	低

各筋線維タイプは、筋構成蛋白質の1つであるミオシン重鎖のアイソフォームの違いによって分類される。

3. 方法

3-1. 実験動物

全ての動物実験は、東京都健康長寿医療センター研究所の動物実験実施規則に従い実施した（動物実験承認番号 20016）。雌の C57BL/6NCr マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、東京都健康長寿医療センター研究所の動物施設において飼育した。12 時間毎（午前 8 時から午後 8 時）の明暗期、室温約 23 °C、SPF 環境、自由摂餌および自由飲水可能な飼育環境の下で飼育した。飼料は、CRF-1（オリエンタル酵母工業）を 121 °C で 20 分間の高圧蒸気滅菌したものを使用した。給水は、塩素塩酸を添加した水（残留塩素濃度 12 ± 2 ppm、pH 2.5-3.0）を給水瓶に入れ、マウスに与えた。マウスは、三種（ドミトール、ミタゾラム、ベトルフェール）混合麻酔を腹腔内に投与し、麻酔下放血による安楽殺処置を実施した。本研究では、若齢群として 6-8 ヶ月齢（young 群）、中齢群として 19-20 ヶ月齢（middle-aged 群）、高齢群として 29-32 ヶ月齢（old 群）の 3 つの群の C57BL/6NCr マウス（雌）を使用した。先行研究の結果、マウスにおける筋重量は、6-10 ヶ月齢においてピークを示すこと [40]、24 ヶ月齢前後において筋重量の減少が認められること [41]、が報告されていることを参考として、上記の群を設定した。

生存曲線は種を超えて老化の指標として使われており、生存曲線を参照することで、異なる動物施設の結果であっても、本研究で得られた結果と比較することができると考えられる。本研究における動物施設の生存曲線を図 1 に示した。東京都健康長寿医療センター研究所の動物施設にて飼育した、それぞれの群における生存率は、図 1 に示すように、young 群；100%、middle-aged 群；90%、

old 群 ; 20%であった。

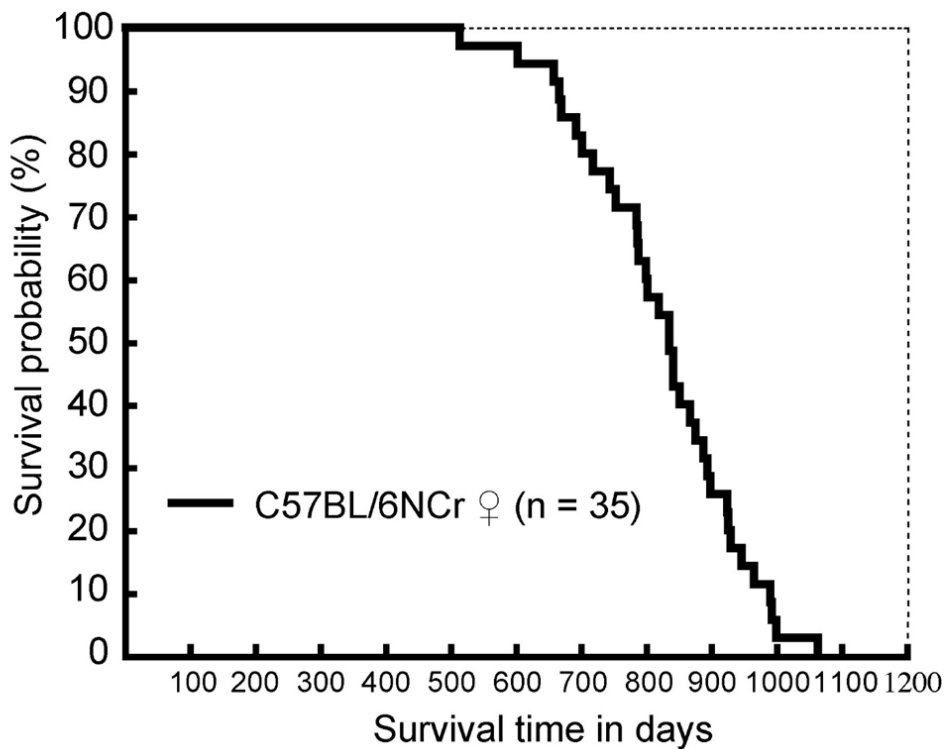


図 1. 東京都健康長寿医療センター研究所の動物施設において飼育したマウスの生存曲線

C57BL/6NCr (雌) マウスにおける Kaplan-Meier 生存曲線を示した。

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

3-2. 骨格筋の凍結筋横断切片の作製

マウスを安楽殺した後、ひらめ筋(soleus, SOL)と長趾伸筋(extensor digitorum longus, EDL)を採取し、トラガカントゴム(tragacanth gum, 206-02242, Wako)を用いてコルク板に垂直になるように立てた。その後、液体窒素で十分に冷却したイソペンタン(166-00615, Wako)を用いて、約30秒間の急速凍結を行った。凍結サンプルは、凍結筋横断切片を作製するまで、 -80°C の温度条件で保管した。

-28°C の温度条件に設定したクリオスタット内で、筋の中央領域の横断面において、厚さ $8\mu\text{m}$ の連続切片を作製した。切片作製後、約30分間風乾し、各種染色実験を実施するまで -80°C の温度条件で保管した。スライドガラスはPoly-L-lysineコートされたもの(S7441, MATSUNAMI)を使用し、刃はフェザーミクロトーム替刃(C35, FEATHER)を使用した。また、各種染色実験において、 -80°C 条件で保管した凍結筋切片サンプルを室温において約30分間風乾させた後に、染色を施した。

3-3. 免疫組織染色

凍結筋切片をphosphate-buffered saline(PBS)で1分間洗浄し、4% paraformaldehyde(4% PFA)を用いて氷上で15分間の固定を行い、PBSで5分間の洗浄を3回繰り返した。次に、メタノールを用いて、 -20°C の温度条件で10分間の透過処理を行った。PBSで5分間の洗浄を2回繰り返した後に、5% goat serum と 1% bovine serum albumin(BSA)を含有したPBSを用いて、室

温条件で 60 分間のブロッキング反応を行った。続いて、一次抗体を 4 °C の温度条件で一晩反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、2 次抗体を室温条件で 90 分間、遮光条件下で反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、退色防止剤（SlowFade® Antifade kit, Invitrogen）を用いて、染色した切片を封入した。封入後、蛍光顕微鏡（AF6500, Leica）で組織形態を観察し画像を取得した。上述した一連の手順について、実験手順-1 に整理した。

実験手順-1（免疫組織染色）

凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄

↓

氷上で 15 分間の固定（固定液：4% PFA）

↓

PBS で 5 分間洗浄 x 3 回

↓

-20 °C の温度条件でメタノールによる透過処理（10 分間）

↓

PBS で 5 分間洗浄 x 2 回

↓

室温条件で 60 分間のブロッキング反応

（ブロッキング液：5% goat serum と 1% BSA を含有した PBS）

↓

4 °C の温度条件で一次抗体反応（一晩）

↓

PBS で 5 分間洗浄 x 3 回

↓

遮光下・室温条件で二次抗体反応（90分間）

↓

PBS で 5 分間洗浄 x 3 回

↓

退色防止剤によって切片を封入

（退色防止剤：SlowFade® Antifade kit, Invitrogen）

↓

蛍光顕微鏡による観察・染色画像の取得

図 2 に示すような各筋線維タイプに対する免疫染色画像を取得し、筋線維タイプの分別を行った。一次抗体および二次抗体ともに、1% BSA を含有した PBS を用いて適切な濃度に希釈した。使用した 1 次抗体および 2 次抗体の詳細は、下記表に記した。

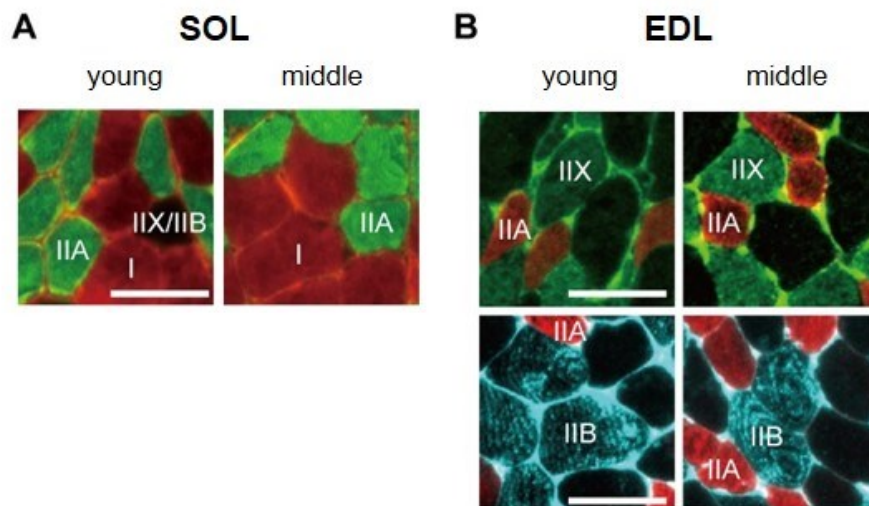


図 2. 各筋線維タイプに対する免疫染色

(A) young 群と middle-aged 群の SOL における各筋線維タイプに対する免疫染色像を例示した。赤染色された筋線維は type I 線維を表し、緑染色された筋線維は type IIA 線維を表す。本研究では、type I および type IIA に対する免疫染色において、両者ともに染色されなかった筋線維を type IIX/IIB 線維と定義した。Scale bar = 100 μ m.

(B) young 群と middle-aged 群の EDL における各筋線維タイプに対する免疫染色像を例示した。赤染色された筋線維は type IIA 線維を表し、緑染色された筋線維は type IIX 線維を表し、青染色された筋線維は type IIB 線維を表す。本研究では、young, middle-aged, old 群の各群において、EDL における type I 線維は 1 本も検出されなかった。Scale bar = 100 μ m.

1 次抗体の一覧表

1 次抗体	抗原	1 次抗体 希釈濃度
BA-F3 (mouse IgG1)	Myosin heavy chain type I (type I fiber)	12 μ g/mL
SC-71 (mouse IgG2b)	Myosin heavy chain type IIA (type IIA fiber)	3 μ g/mL
6H1 (mouse IgM)	Myosin heavy chain type IIX (type IIX fiber)	1 : 20
BF-F3 (mouse IgM)	Myosin heavy chain type IIB (type IIB fiber)	1 : 20
4844 (rabbit IgG)	mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV)	1 : 250
Ab77577 (rabbit IgG)	muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)	1 : 1000

BA-F3, SC-71, 6H1, BF-F3 は、Developmental Studies Hybridoma Bank から入手した。4844 は、Cell Signaling Technology から入手した。Ab77577 は、abcam から入手した。

2 次抗体の一覧表

2 次抗体	二次抗体 希釈濃度
Alexa Fluor® 594 Goat anti-mouse IgG1	1 : 2000
Alexa Fluor® 647 Goat anti-mouse IgG2b	1 : 2000
Alexa Fluor® 594 Goat anti-mouse IgM	1 : 2000
Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgM	1 : 2000
Alexa Fluor® 555 Goat anti-rabbit IgG	1 : 1000

2 次抗体は全て、invitrogen から入手した。

3-4. Cytochrome c oxidase (COX) 染色

COX 染色は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV (complex IV) の酵素活性を反映する組織化学染色である。凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄し、COX 染色反応液で 37 °C、60 分間の温度条件で反応させた。その後、蒸留水で 90 秒間洗浄し、室温条件で 1% CuSO₄ (030-04442, Wako) と 5 分間反応させた。蒸留水で 90 秒間洗浄した後に、70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応を順次各 30 秒間行った。その後、キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK (DM-01, DAIDO SANGYO) を用いて封入した。光学顕微鏡 (DMD108, Leica) を用いて組織形態を観察し、染色画像を取得した。COX 染色反応液は、以下の組成となるように調製して使用した。上述した一連の手順について、実験手順-2 に整理した。

COX 染色反応液組成 (pH 5.5 に調製) :

- 30 mg 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (349-00903, Wako)
- 13.5 mL 0.1 M sodium acetate/pH 5.6 (011-00276, Wako)
- 1.5 mL 1% manganese chloride (139-00722, Wako)
- 150 µL 0.1% hydrogen peroxide solution (084-07441, Wako)

実験手順-2 (COX 染色)

凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄

↓

37 °C の温度条件で COX 染色反応液と 60 分間反応

↓

蒸留水で 90 秒間洗淨

↓

室温条件で 1% CuSO₄ と 5 分間反応

↓

蒸留水で 90 秒間洗淨

↓

70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応（各 30 秒間）

↓

キシレンによる 1 分間の透徹処理 x 2 回

↓

MOUNT QUICK で封入

↓

光学顕微鏡を用いた組織形態観察・染色画像の取得

3-5. Succinate dehydrogenase (SDH) 染色

SDH 染色は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II (complex II) の酵素活性を反映する組織化学染色である。凍結筋切片を PBS で 1 分間洗淨した後、SDH 染色反応液で 37 °C、30 分間の条件で反応させた。蒸留水で 90 秒間洗淨した後に、70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応を順次各 30 秒間行った。その後、キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK を用いて封入した。光学顕微鏡で組織形態を観察し、画像を取得した。SDH 染色反応液は、以下の組成となるように調製して使用した。上述した一連の手順について、実験手順-3 に整理した。

SDH 染色反応液組成（pH 7.2-7.6 に調製）：

- 15 mg nitro blue tetrazolium chloride (144-01993, Wako)
- 7.5 mL 0.2 M sodium succinate
- 7.5 mL 0.2 M phosphate buffer

実験手順-3（SDH 染色）

凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄

↓

37 °C の温度条件で SDH 染色反応液と 30 分間反応

↓

蒸留水で 90 秒間洗浄

↓

70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応（各 30 秒間）

↓

キシレンによる 1 分間の透徹処理 x 2 回

↓

MOUNT QUICK で封入

↓

光学顕微鏡を用いた組織形態観察・染色画像の取得

3-6. Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase (NADH-TR) 染色

NADH-TR 染色は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (complex I) の酵素活性を反映する組織化学染色である。凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄した後、NADH-TR 染色反応液で 37 °C、30 分間の条件で反応させた。蒸留水で 90 秒間洗浄した後に、70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応を順次各 30 秒間行った。その後、キシレンで 1 分間の透徹処理を 2 回行い、MOUNT QUICK を用いて封入した。光学顕微鏡で組織形態を観察し、画像を取得した。NADH-TR 染色反応液は、以下の組成となるように調製して使用した。上述した一連の手順について、実験手順-4 に整理した。

NADH-TR 染色反応液組成 (pH 7.4 に調製) :

- 18 mg nitro blue tetrazolium chloride
- 16 mg β -NADH (040-16234, Wako)
- 3 mL 1M Tris-HCl/pH7.4
- 12 mL distilled water

実験手順-4 (NADH-TR 染色)

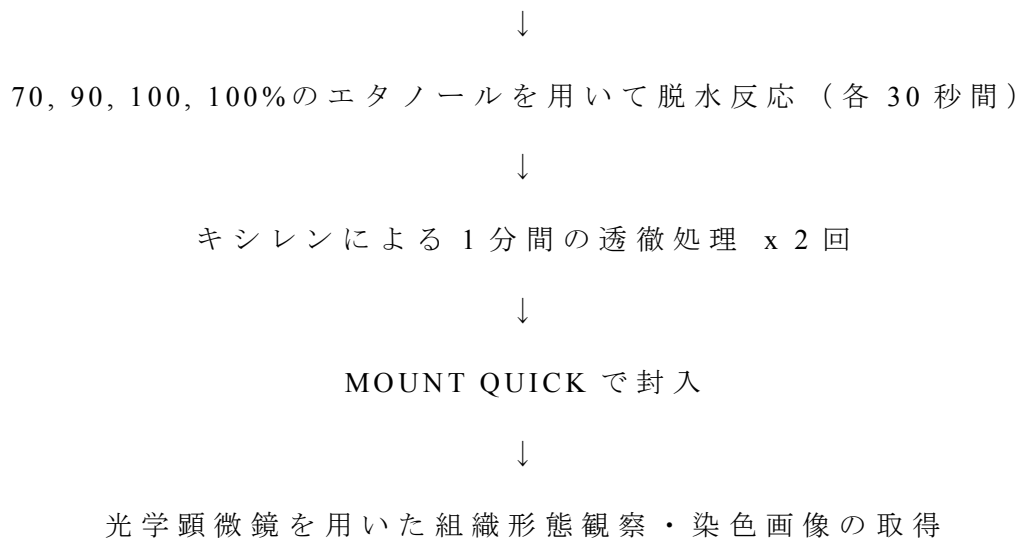
凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄

↓

37 °C の温度条件で NADH-TR 染色反応液と 30 分間反応

↓

蒸留水で 90 秒間洗浄



3-7. ゴモリトリクローム変法 (modified gomori trichrome staining, mGT)

本染色は、ミトコンドリアミオパチーの筋病理診断に用いられる組織化学染色の一つとして知られており、異常に増殖したミトコンドリアを赤色に染色することができる染色法である[13,42]。加齢筋におけるミトコンドリアの形態異常の有無を評価するために、本染色を施した。凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄した後、マイヤーヘマトキシリン溶液中、室温で 10 分間反応させた。蒸留水で 5 分間の洗浄を行った後、mGT 染色反応液で室温 20 分間反応させた。その後、0.2%酢酸溶液中で 5-10 分間の洗浄を行った。70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応を順次各 30 秒間行った。その後、キシレンで 1 分間の透徹処理を 1 回行い、MOUNT QUICK を用いて封入した。光学顕微鏡で組織形態を観察し、画像を取得した。mGT 染色反応液は、以下の組成となるように調製して使用した。上述した一連の手順について、実験手順-5 に整理した。

mGT 染色反応液組成 (pH 3.4 に調製) :

- 0.6 g chromotrope 2R
- 0.3 g fast green FCF
- 0.6 g phosphotungstic acid
- 1 mL acetic anhydride, 100 mL distilled water

実験手順-5 (mGT 染色)

凍結筋切片を PBS で 1 分間洗浄

↓

室温条件でマイヤーヘマトキシリン溶液と 10 分間反応

↓

蒸留水で 5 分間洗浄

↓

室温条件で mGT 染色反応液と 20 分間反応

↓

0.2%酢酸溶液で 5-10 分間の洗浄

↓

70, 90, 100, 100%のエタノールを用いて脱水反応 (各 30 秒間)

↓

キシレンによる 1 分間の透徹処理 x 1 回

↓

MOUNT QUICK で封入

↓

光学顕微鏡を用いた組織形態観察・染色画像の取得

3-8. 筋線維数、筋線維面積の測定

各筋線維タイプに対する特異的モノクローナル抗体を使った免疫組織染色で得られた画像を基に、画像解析ソフトウェア Image J (NIH) を用いて、各筋線維タイプの数と面積を測定した。各筋線維タイプの筋線維数は総数を測定した。各筋線維タイプの筋線維面積は、約 100 本の筋線維を測定し、その平均値を筋線維面積とした。

3-9. 各筋線維タイプにおける COX 活性の測定

COX 染色で得られた画像を基に、Image J (NIH) を用いて、COX 活性 (complex IV 活性) を測定した。COX 活性は COX 染色の *intensity* を筋線維面積で補正することで、筋線維当たりの COX 活性を測定した。各筋線維タイプごとに、約 50 本の筋線維における COX 活性を測定し、その平均値を COX 活性とした。young 群における COX 活性を 100 とし、middle-aged 群および old 群における COX 活性を young 群における COX 活性の相対値として表記した。各筋線維タイプ単位で COX 活性を評価するために、各筋線維タイプに対する免疫組織染色と COX 染色の連続切片を作製することで、筋線維タイプの分別を行った。

3-10. 各筋線維タイプにおける NADH-TR 活性の測定

NADH-TR 染色で得られた画像を基に、Image J (NIH) を用いて、NADH-TR 活性 (complex I 活性) を測定した。NADH-TR 活性は NADH-TR 染色の *intensity*

を筋線維面積で補正することで、筋線維当たりの NADH-TR 活性を測定した。各筋線維タイプごとに、約 50 本の筋線維における NADH-TR 活性を測定し、その平均値を NADH-TR 活性とした。young 群における COX 活性を 100 とし、old 群における NADH-TR 活性を young 群における NADH-TR 活性の相対値として表記した。各筋線維タイプ単位で NADH-TR 活性を評価するために、各筋線維タイプに対する免疫組織染色と NADH-TR 染色の連続切片を作製することで、筋線維タイプの分別を行った。

3-11. Subsarcolemmal mitochondrial accumulation を含有する筋線維の測定

mGT 染色で得られた画像を基に、Image J (NIH) を用いて、少なくとも 200 本の筋線維を含んだ領域を解析し、subsarcolemmal mitochondrial accumulation を含有する筋線維の割合 (%) を測定した。mGT 染色と各筋線維タイプに対する免疫組織染色との連続切片を作製することで、subsarcolemmal mitochondrial accumulation を含有する筋線維の筋線維タイプを分別した。

3-12. 各筋線維タイプにおける MuRF1 (Muscle RING-Finger Protein-1) 発現の解析

MuRF1 免疫組織染色で得られた画像を基に、Image J (NIH) を用いて、MuRF1 の発現を測定した。MuRF1 の発現量は、MuRF1 免疫染色の intensity を筋線維面積で補正することで、筋線維当たりの MuRF1 発現量を測定した。各筋線維タイプごとに、約 50 本の筋線維における MuRF1 の intensity を測定し、その平

均値を MuRF1 発現量とした。young 群における MuRF1 発現量を 1 としたときの、middle-aged 群における MuRF1 発現量を相対値として表記した。各筋線維タイプ単位で MuRF1 発現量を評価するために、各筋線維タイプに対する免疫染色と MuRF1 に対する免疫染色との多重染色を行うことで、筋線維タイプの分別を行った。

3-13. 透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy, TEM) による形態観察

マウスを安楽殺後に採取した SOL を 2.5% glutaraldehyde と 2% paraformaldehyde を含む 0.1M cacodylate buffer で 2 時間固定した。その後、筋を細かく裂き、1% osmium tetroxide を含む 1M cacodylate buffer でさらに 2 時間固定し、epon に包埋した。作製した厚さ 80nm の横断および縦断切片を、1% uranyl acetate で 2 時間反応させ、TEM を用いて組織形態を観察し、画像を取得した。

3-14. Permeabilized myofibers の作製

permeabilized myofibers の作製と酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 機能の測定は、先行研究の手法に倣って実施した [17,43]。マウスを安楽殺後に、SOL と EDL を採取した。この際に、筋に対する物理的な障害を減らすために、腱と腱で筋を慎重に採取した。採取した SOL と EDL は、氷上で冷却した BIOPS buffer (2.77 mM CaK₂EGTA buffer, 7.23 mM K₂EGTA buffer,

5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM Taurine, 15 mM Na₂phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithiotreitol, 50 mM MES, 5N KOH を用いて pH 7.1 に調製) 中に移し、実態顕微鏡下で観察しながら極細ピンセット (Dumont no. 5) を用いて、筋線維束に分離した。Wet weight として、SOL は約 1 mg、EDL は約 2.5 mg となるように、筋線維束を取得した。

取得した筋線維束を 5 mg/mL の saponine を含有した BIOPS buffer 中で氷上 30 分間、攪拌させながら反応させることで膜透過処理を行い、permeabilized myofibers を取得した。その後、permeabilized myofibers を respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM Taurine, 20 mM HEPES, 60 mM Lactobionic acid, 10 mM KH₂PO₄, 110 mM Sucrose, 1 g/L BSA, 5N KOH を用いて pH 7.1 に調製) に浸し、氷上 10 分間、攪拌させながら反応させた。続いて、high-resolution oxygen sensor (Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) のチャンバー内に respiration buffer を充填し、その中に、permeabilized myofibers を入れ、下記に示すように、OXPHOS 機能 (oxygen consumption rate, O₂ flux) を測定した。

3-15. High-resolution respirometer を用いた OXPHOS 機能測定

下記の図 3 に示すように、ミトコンドリア呼吸鎖の基質および阻害剤を用いることで、respiration buffer 中における O₂ flux を測定した。complex I を介した O₂ flux は、2 mM malate, 5 mM pyruvate, 10 mM glutamate の存在下で、5 mM adenosine diphosphate (ADP) を添加することによって測定した。complex I と complex II を介した maximal O₂ flux は、10 mM succinate を添加することによ

って測定した。complex II を介した O₂ flux は、2.5 μM rotenone (complex I の阻害剤) を添加することによって測定した。complex IV を介した O₂ flux は、2.5 μM antimycin A (complex III の阻害剤) を添加した後に、complex IV の electron donor である TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) を 0.5 mM 添加することによって測定した。TMPD の自己酸化を防ぐために、2mM の ascorbic acid を添加した。測定した O₂ flux は、pmol x sec⁻¹ x mg⁻¹ wet weight of permeabilized myofibers として表記した。BIOPS buffer および respiration buffer を構成する各試薬、ミトコンドリア呼吸鎖の各基質および阻害剤は、以下のものを使用した。また、ミトコンドリア呼吸鎖の各 complex を介した O₂ flux を測定する際の各試薬の添加手順について、下記の表 2 に整理した。

BIOPS buffer を構成する試薬情報

- CaK₂EGTA buffer (5N KOH を用いて、pH 7.1 に調製) : 100 mM EGTA (ethylene glycol-bis (2-amino-ethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, E4378-100G, SIGMA-ALDRICH), 100 mM CaCO₃ (calcium carbonate, C4830-100G, SIGMA-ALDRICH)
- K₂EGTA buffer (5N KOH を用いて、pH 7.0 に調製) : 100 mM EGTA
- Na₂ATP (5N KOH を用いて、pH 7.0 に調製) : Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, A2383-1G, SIGMA-ALDRICH
- MgCl₂-6H₂O : magnesium chloride, 135-00165, Wako
- Taurine : T0625-100G, SIGMA-ALDRICH
- Na₂phosphocreatine : phosphocreatine disodium salt hydrate, P7936-5G, SIGMA-ALDRICH
- Imidazole : 000-39502, キシダ化学株式会社
- Dithiotreitol : D0632-1G, SIGMA-ALDRICH

■ MES : MES hydrate, M8250-25G, SIGMA-ALDRICH

■ KOH : potassium hydroxide, 169-20365, Wako

※8N KOH を蒸留水で 5N KOH に希釈した後、使用した。

respiration buffer を構成する試薬情報

■ EGTA, MgCl₂-6H₂O, Taurine, KOH : 上記に同じ。

■ HEPES : H3375-100G, SIGMA-ALDRICH

■ Lactobionic acid : 153516-100G, SIGMA-ALDRICH

■ KH₂PO₄ : potassium dihydrogenphosphate, 28721-55, nacalai tesque

■ Sucrose : 192-0012, Wako

■ BSA : A6003-5G, SIGMA-ALDRICH

ミトコンドリア呼吸鎖の各基質および阻害剤情報

■ Malate : M1000, SIGMA-ALDRICH

■ Pyruvate : sodium pyruvate, 193-03065, Wako

■ Glutamate : G1626, SIGMA-ALDRICH

■ ADP (5N KOH を用いて、pH 7.0 に調製) : adenosine diphosphate, A2383-1G,
SIGMA-ALDRICH

■ Succinate : S2378, SIGMA-ALDRICH

■ Rotenone : R8875, SIGMA-ALDRICH

■ AntimycinA : A8674, SIGMA-ALDRICH

■ TMPD : N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine, T3134, SIGMA-ALDRICH

■ L-ascorbic acid; A0537, Tokyo Chemical Industry (TCI)

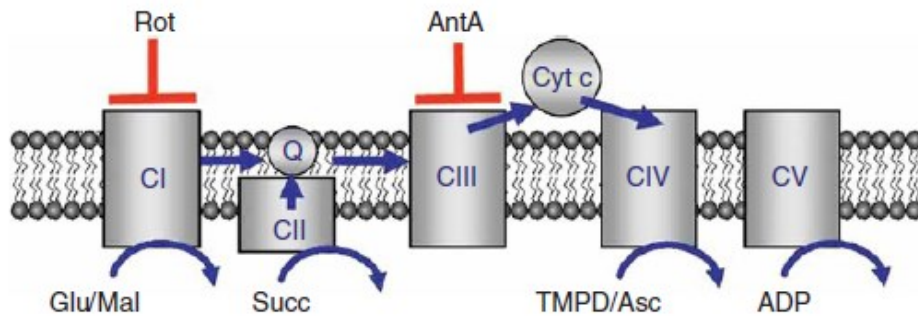


図 3. ミトコンドリア呼吸鎖の基質および阻害剤を用いた O_2 flux の測定

(Nature Protocols volume 3, pages965–976(2008) より引用)

Rot; rotenone, Glu; glutamate, Mal; malate, Succ; succinate, AntA; antimycinA, Asc; ascorbic acid, CI; complex I, CII; complex II, CIII; complex III, CIV; complex IV, CV; complex V

表 2. High-resolution respirometer を用いた OXPHOS 機能測定における、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の基質・阻害剤の添加手順

添加手順	基質・阻害剤	最終濃度
Step-1	0.8 M Malate 5 μ L	2 mM
Step-2	1 M Pyruvate 10 μ L	5 mM
Step-3	2 M Glutamate 10 μ L	10 mM
Step-4	0.5 M ADP 20 μ L 1 M MgCl ₂ -6H ₂ O 6 μ L	5 mM (ADP)
Step-5	1 M Succinate 20 μ L	10 mM
Step-6	1 mM Rotenone 5 μ L	2.5 μ M
Step-7	5 mM AntimycinA 1 μ L	2.5 μ M
Step-8	200 mM TMPD* 5.5 μ L 1 M Ascorbic acid 11 μ L	0.5 mM (TMPD)

上記の基質または阻害剤を 2 mL の respiration buffer 中にハミルトンシリンジを用いて順次添加した。

*200 mM TMPD は、10 mM ascorbic acid を含有した蒸留水を用いて調製した。

3-16. real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) による mRNA 発現解析

マウスを安楽殺後、SOL と EDL を採取し、液体窒素中で急速凍結したサンプルを使用した。Trizol (15596026, Invitrogen) と RNeasy Mini Kit (74106, QIAGEN) を用いて、SOL および EDL から RNA を精製した。RNA から complementary DNA (cDNA) を、オリゴ dT プライマーと逆転写酵素 (4387406, Applied Biosystems) を用いて合成した。続いて、PrimeTime gene expression master mix (1055771, Integrated DNA Technology, IDT) と標的遺伝子に対するプライマーを用いて、RT-PCR を行うことで、mRNA の定量的な発現解析を行った。本研究で使用したプライマーは、IDT または Applied Biosystems より購入した既製品を用いた。ハウスキーピング遺伝子としては、 β -actin を用いて、それぞれの標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を算出した。そして、young 群におけるそれぞれの標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle-aged 群における発現量を相対値として算出した。以下に、使用したプライマーの詳細について、表 3 に記した。

表 3. 使用したプライマーの一覧表

Target gene	Primer information
peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α)	Mm01208835 (Applied Biosystems)
PGC-1 β	Mm00504730 (Applied Biosystems)
peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ)	Mm.PT.58.6994542 (IDT)
protein Kinase AMP-Activated catalytic subunit alpha 1 (AMPK α 1)	Mm.PT.58.6718297 (IDT)
mitofusin-1 (Mfn1)	Mm.PT.58.13531330 (IDT)
mitofusin-2 (Mfn2)	Mm.PT.58.6479342 (IDT)
dynamin related protein 1 (Drp1)	Mm.PT.58.32328364 (IDT)
optic atrophy protein 1 (Opa1)	Mm.PT.58.7956692 (IDT)
PTEN-induced kinase 1 (Pink1)	Mm.PT.58.23711353 (IDT)
parkin	Mm.PT.58.42742441 (IDT)
thioredoxin reductase 1 (Txnrd1)	Mm.PT.58.12348361 (IDT)
glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (Gclc)	Mm.PT.58.30656560 (IDT)
sulfiredoxin-1 (Srxn1)	Mm.PT.58.32142727 (IDT)
hypoxia inducible factor-1 α (HIF1 α)	Mm00468869 (Applied Biosystems)

pyruvate kinase muscle isozyme (PKM)	Mm.PT.58.6642152 (IDT)
3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)	Mm.PT.58.10680444 (IDT)
muscle RING-Finger protein-1 (MuRF1)	Mm01185221_m1 (Applied Biosystems)
F-box only protein 32 (Atrogin1)	Mm00499523_m1 (Applied Biosystems)
forkhead box protein O1 (Foxo1)	Mm00490672_m1 (Applied Biosystems)
Cbl proto-oncogene B (Cblb)	Mm01343092_m1 (Applied Biosystems)
insulin-like growth factor 1 (IGF1)	Mm00439560_m1 (Applied Biosystems)
β -actin (Actb)	Mm.PT.39a.22214843 (IDT)

3-17. 統計解析

本研究で得られた結果は、平均値 (mean) \pm 平均値の標準誤差 (standard error of the mean) として表記した。統計分析は、KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA) および Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation) を使用して解析した。2 群間 (young 群と middle-aged 群、young 群と old 群) の有意差検定は、Student's t-test を用いて検討した。3 群間 (young 群、middle-aged 群、old 群) の有意差検定は、One-way analysis of variance with Tukey's test を用いて検討した。すべての検定において有意水準は 5%未満とした。

4. 結果

4.1 SOL および EDL における、加齢に伴う筋線維タイプ単位の筋萎縮様式

げっ歯類（マウスおよびラット）を用いた先行研究において、筋線維の萎縮を伴う下肢骨格筋量の減少は、サルコペニアの筋病理学的特徴の1つとされている[16,17,21,22,29,44]。そこで、本研究で使用した老齢マウスがサルコペニアの特徴を示すかどうかを確認するために、筋重量を測定した。old 群における SOL, EDL ともに、young 群および middle-aged 群に比較して有意な筋重量の減少を認めた(図 4A, D)。筋重量の減少は、筋線維数または筋線維面積の減少、あるいは、その両方を伴うことが知られている。そこで、各筋線維タイプに対する免疫染色を行い、筋線維タイプ単位の筋萎縮様式を解析した。その結果、SOL においては、young 群と middle-aged 群の両者に比較して、old 群において type IIA および IIX/IIB 線維数の減少を認めた(図 4B)。一方で、type I および IIA 線維の筋線維面積は、各群間で有意な変化は認められなかった(図 4C)。SOL における type I 線維は、筋線維数および筋線維面積ともに、加齢による変化は認められず、加齢に伴う筋線維萎縮に対して耐性を示す結果であった(図 4B, C)。EDL においては、young 群に比較して、old 群において type IIB 線維の数の減少を認め、middle-aged 群および old 群において type IIB 線維の面積の減少を認めた(図 4E, F)。このような筋線維タイプ単位の筋線維数の減少あるいは面積の低下が、SOL および EDL における筋重量の減少に寄与していると考えられた。また、本研究に使用したマウスは、加齢に伴う筋量減少を示した点において、サルコペニアの特徴を有する動物モデルであると考えられた。本研究では、SOL, EDL ともに、type II 線維が萎縮を示す結果であった。この

ことは、前述のとおり、type II 線維は加齢に伴う筋線維萎縮を起こしやすいという点において、先行研究の結果と一致した[4]。

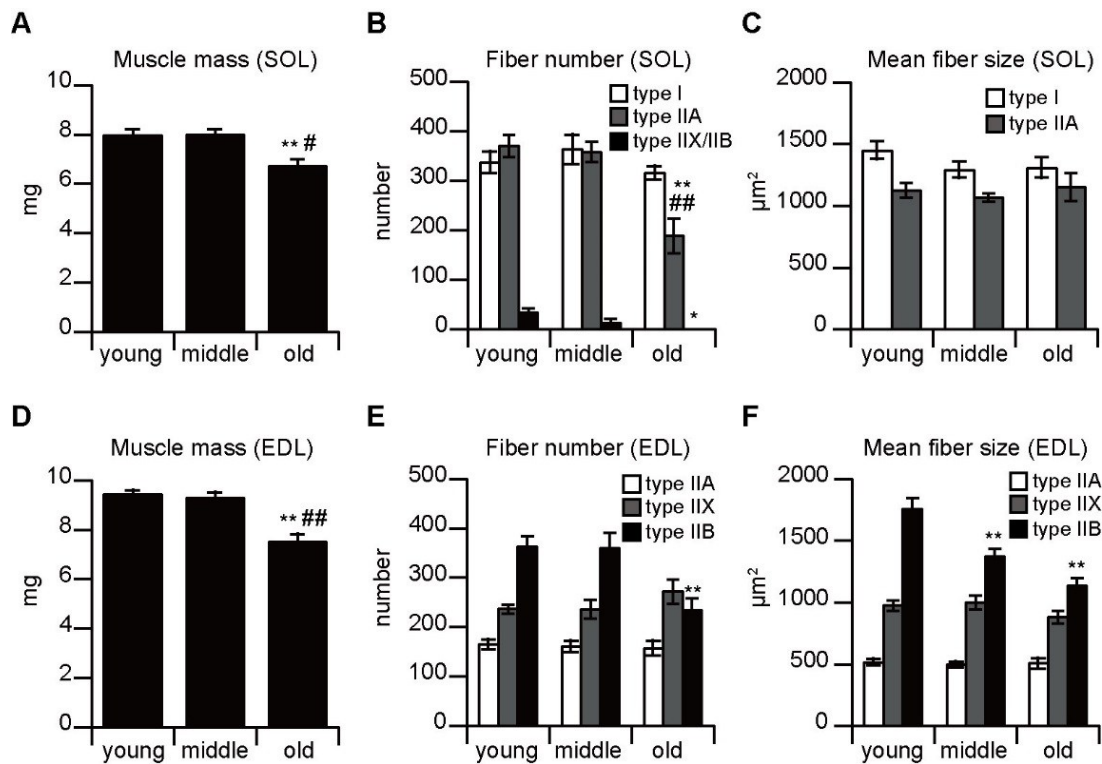


図 4. 老齡マウスの SOL と EDL における筋線維の形態変化

(A, D) SOL および EDL における筋重量を示した。筋重量は、wet weight を測定した。(B, C) SOL における、type I 線維（白色）、type IIA 線維（灰色）、type IIX/IIB 線維（黒色）の数または面積を示した。(E, F) EDL における、type IIA 線維（白色）、type IIA 線維（灰色）、type IIB 線維（黒色）の数または面積を示した。n=6-10/group, one-way analysis of variance with Tukey's test, **P < 0.01 vs. the young group, #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. the middle-aged group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

4-2. 老齡マウスの SOL における type I 線維特異的なミトコンドリア呼吸酵素活性の減少

高齢者や老齡動物（マウスやラット）の骨格筋において、ミトコンドリア呼吸酵素活性が減少することが、これまでに多くの先行研究から報告されており [17,18,25,27]、加齢に伴うミトコンドリア呼吸酵素活性の低下はサルコペニアの主要な要因の 1 つとなっている可能性が指摘されている [11,28]。しかしながら、多くの先行研究では、筋のホモジネートサンプルを用いた解析を行っていることから、加齢に伴うミトコンドリア呼吸酵素活性の変化と筋線維萎縮との詳細な因果関係に関するエビデンスは不十分であった。そこで、本研究では、筋病理学的手法を用いて、ミトコンドリア呼吸酵素の COX (complex IV)、NADH-TR (complex I)、SDH (complex II) の活性を評価し、ミトコンドリア呼吸酵素活性と各筋線維タイプにおける筋線維萎縮との関連性を解析した。

本研究では、まず、ミトコンドリア呼吸酵素の律速酵素として知られている COX 活性の加齢変化に着目し、COX 活性染色を実施した。その結果、middle-aged 群の SOL は、young 群に比較して、顕著な COX 活性の低下が認められた (図 5A)。この結果から、SOL における筋重量減少に先行して、ミトコンドリア COX 活性が低下することが明らかとなった。一方で、EDL においては、young 群と old 群との間において、COX 活性の顕著な変化は認められなかった (図 5B)。これらの結果は、遅筋優位筋である SOL の方が、速筋優位筋である EDL に比較して、ミトコンドリア COX 活性の低下が顕著であった点において、筋ホモジネートサンプルを用いた先行研究と一致した結果であった [17]。

図 5A に示すように、老齡マウスの SOL において認められた COX 活性の低下は、全ての筋線維に均一に観察されたわけではなく、モザイク状に COX 活性の低下が認められた。そこで、SOL における COX 活性の低下は筋線維タイプ間で異なるとの仮説を立てた。連続切片を用いた病理学的解析において、COX 染色および筋線維タイプ免疫染色を行うことで各筋線維タイプを分別した後に、SOL における主要な構成筋線維である type I 線維と type IIA 線維における COX 活性を定量評価した (図 5C, D)。その結果、興味深いことに、middle-aged 群と old 群の SOL は、young 群と比較して、type I 線維特異的に COX 活性が有意に低下することが明らかとなった (図 5D)。また、ミトコンドリア complex I の活性を反映する NADH-TR 染色の結果、加齢した SOL において、COX 活性と同様に、type I 線維特異的に NADH-TR 活性 (complex I 活性) も減少することが明らかとなった (図 6A, B)。一方、SDH 染色においては、young 群と old 群との間に明確な違いは認められなかった (図 7A, B)。以上の結果から、加齢に伴うミトコンドリア呼吸酵素 (complex I, complex IV) 活性の低下は、筋線維タイプで異なるだけでなく筋線維の萎縮と相関しないことが明らかとなった (表 4)。

次に、老齡マウスの SOL において認められたミトコンドリアの病理学的変化が筋に及ぼす影響を調べるために、High-resolution respirometer (Oxygraph-2K) を用いて、OXPHOS 機能を解析した。前述した筋病理学的解析の結果から、middle-aged 群の時点において、SOL におけるミトコンドリア呼吸酵素活性の低下は顕在化していたことから、young 群と middle-aged 群の 2 群間の OXPHOS 機能変化を解析することとした。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (complex) それぞれに対する特異的な基質や阻害剤を用いることで、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体を介した O₂ flux (oxygen consumption rate) を測定し

た。その結果、middle-aged 群の SOL は young 群に比較して、complex I、complex II、complex I+II、complex IV を介した O₂ flux の有意な減少を認めた（図 5E）。これらの結果と筋病理解析の結果から、middle-aged 群の SOL において認められた complex I および complex IV を介した O₂ flux の低下は、type I 線維特異的な complex I および complex IV 酵素活性の低下に起因するものであると考えられた（図 5C, D, E）。SOL における SDH（complex II）染色の結果（図 7）と、complex II を介した O₂ flux の結果は一致しなかったが、その要因としては、解析方法が異なる点にあると考えられた。本研究で使用した high-resolution respirometer は高感度のミトコンドリア呼吸機能の解析法であり、病理学的変化に先行してミトコンドリア機能変化を検出したことが考えられる。EDL においては、young 群と middle-aged 群との間において、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体を介した O₂ flux の明確な変化は認められなかった（図 5F）。以上の結果から、加齢に伴う type I 線維特異的なミトコンドリア呼吸酵素（complex I, complex IV）活性の減少は、筋線維の萎縮を誘導するのではなく、OXPHOS 機能低下を促進し、筋における酸化的代謝機能障害を引き起こす可能性が示された。

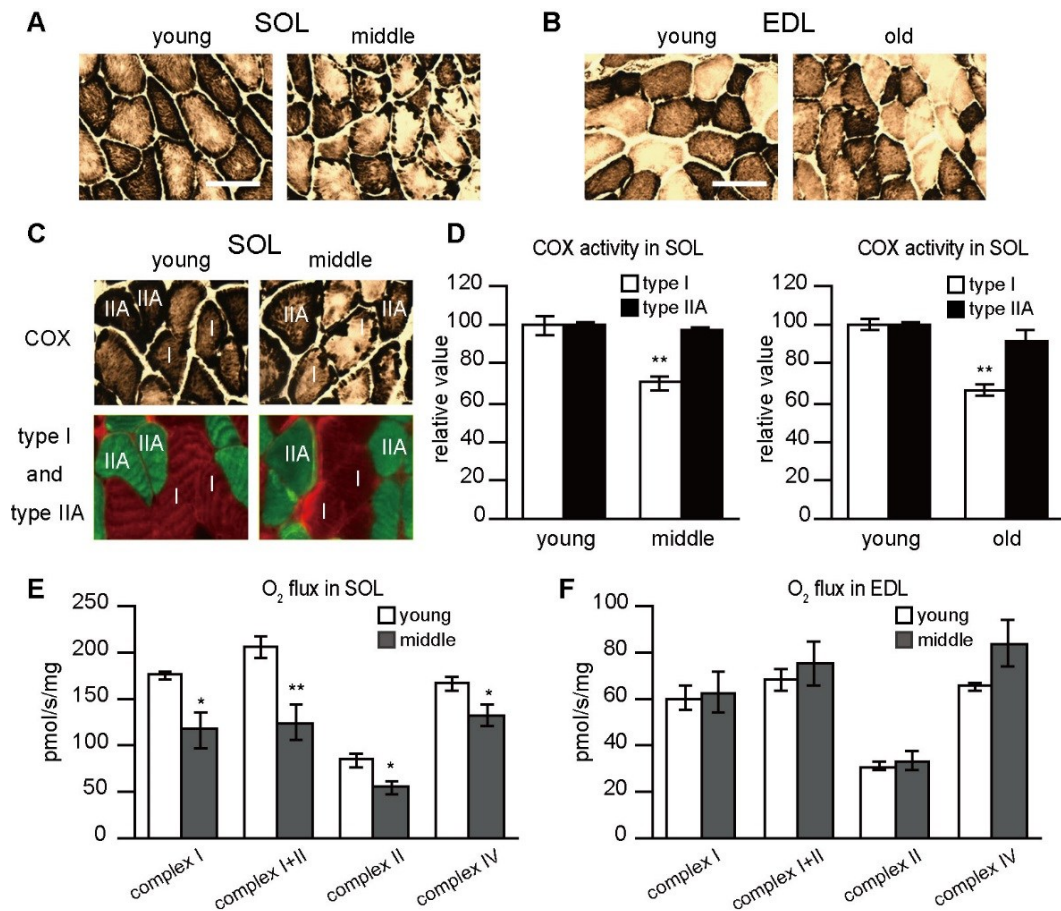


図 5. SOL と EDL におけるミトコンドリア呼吸機能の加齢変化

(A, B) SOL (young 群および middle-aged 群) と EDL (young 群および old 群) における COX 染色像を示した。Scale bar = 100 μ m. (C) SOL における COX 染色と type I 線維 (red) および type IIA 線維 (green) に対する免疫染色の連続切片画像を示した。(D) young 群、middle-aged 群、old 群の SOL における、筋線維タイプ単位の COX 活性を示した。young 群における COX 活性値を 100 としたときの相対値として、middle-aged 群および old 群における COX 活性値を示した。n=3/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group. (E) young 群と middle-aged 群の SOL における O₂ flux を示した。n=5/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group. (F) young 群と middle-aged 群の EDL における O₂ flux を示した。n=5/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

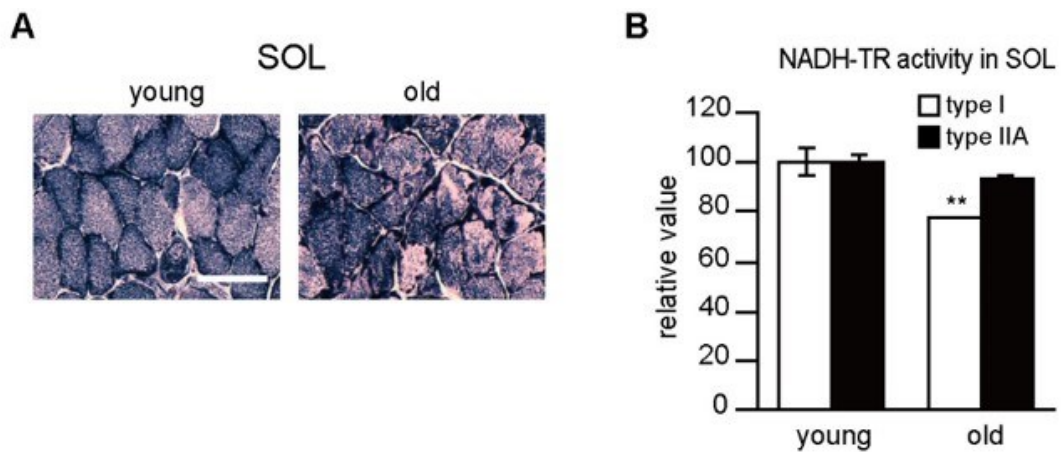


図 6. SOL における NADH-TR 染色

(A) young 群と old 群の SOL における NADH-TR 染色像。Scale bar = 100 μ m.

(B) young 群と old 群の SOL における、筋線維タイプ単位の NADH-TR (complex I) 活性を示した。young 群における NADH-TR 活性値を 100 としたときの相対値として、old 群における NADH-TR 活性値を示した。n=3/group, Student's t-test, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

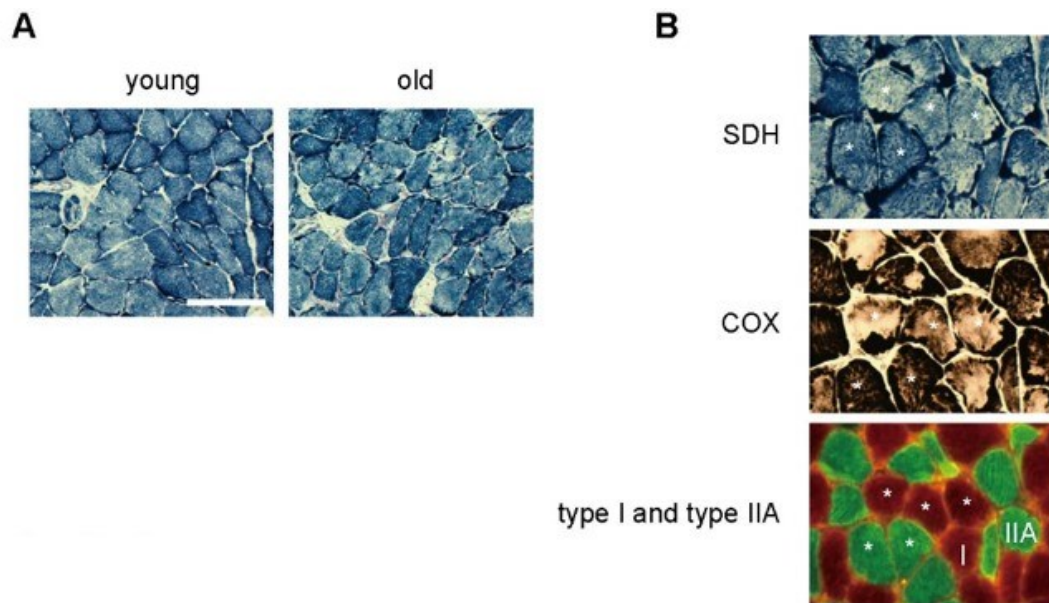


図 7. SOL における SDH 染色

(A) young 群と old 群の SOL における SDH 染色像。Scale bar = 100 μ m.

(B) old 群の SOL における、SDH 染色、COX 染色、type I 線維 (red) および type IIA 線維 (green) の免疫染色の連続切片像を示した。*印は、対応する筋線維を示す。

※ T. Fukunaga et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

4-3. 老齡マウスの SOL における subsarcolemmal 領域のミトコンドリア蓄積

老齡マウスの SOL における COX 染色像は、subsarcolemmal 領域に特徴的な高密度の顆粒染色パターンを示しており、ミトコンドリアが蓄積していることが示唆された(図 5A)。そこで、本研究では、ゴモリトリクローム変法(modified gomori trichrome staining, mGT)を施し、ミトコンドリア形態の加齢変化について解析を行った。mGT 染色は、ミトコンドリアミオパチー患者の筋病理診断の手法として用いられている染色であり、ミトコンドリアの凝集像を赤色に染色する[42,45]。mGT 染色の結果、加齢した SOL において、subsarcolemmal 領域に赤色に染色された蓄積像が検出された(図 8A)。一方で、このような病理所見は、old 群の EDL において観察されなかった(図 8B)。

次に、SOL において観察された subsarcolemmal 領域の蓄積像がミトコンドリアであることを検証するために、連続切片を用いて、mGT 染色、COXIV (cytochrome c oxidase subunit IV) の免疫染色、COX 染色、および SDH 染色を施した。その結果、mGT 染色で認められた蓄積像に一致して、COXIV の免疫染色、COX 染色、および SDH 染色が陽性反応を示した(図 8C, D)。これらの結果から、ミトコンドリアが subsarcolemmal 領域に蓄積していることが示された。さらに、透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscopy, TEM)を用いた観察においても、老齡マウスの SOL において、subsarcolemmal 領域におけるミトコンドリアの蓄積像が認められることを確認した(図 8E, F)。続いて、SOL において観察されたミトコンドリア蓄積を含有する筋線維の割合を mGT 染色画像をもとに定量した結果、young 群に比較して、middle-aged 群および old 群において、その筋線維の割合が有意に増加することが明らかとなった(図 8G)。また、ミトコンドリア蓄積を示す筋線維の筋線維タイプ特異性に

ついて解析を行った結果、SOL における type I 線維と type IIA 線維の両方に同程度の割合でミトコンドリア蓄積が認められることを明らかにした(図 8H)。以上の結果と図 4 に示した筋線維形態の加齢変化の結果とを考え併せると、加齢に伴う subsarcolemmal 領域のミトコンドリアの蓄積は、必ずしも筋線維の萎縮を伴うわけではないことが示された(表 4, 5)。

ミトコンドリアミオパチー患者の骨格筋で観察される典型的な筋病理像として、筋横断面の mGT 染色、COX 染色、および SDH 染色によって観察される ragged red fibers (RRFs, 赤色ぼろ線維) の存在が知られている[13,19,20,45]。また、老齢動物を用いた先行研究の結果から、大腿直筋 (rectus femoris muscle) や外側広筋 (vastus lateralis muscle) において、低頻度ではあるものの、加齢に伴い RRFs が認められることが報告されている[19,20]。RRFs の病理学的な特徴としては、mGT 染色において、subsarcolemmal 領域あるいは筋線維内の全体に赤色に染色されることに加えて、COX 活性は筋線維全体で欠失し、それに代償して高度な SDH 活性を伴うことが報告されている[13,19,45]。本研究において観察された、老齢マウスの SOL におけるミトコンドリア蓄積像は、subsarcolemmal 領域に限局してミトコンドリアが蓄積していた。加えて、COX 活性および SDH 活性はともに、subsarcolemmal 領域に限局して高度な活性化を示した。以上の結果から、老齢マウスの SOL で認められたミトコンドリア蓄積は、ミトコンドリアの細胞内局在および酵素活性の染色性が RRFs とは全く異なる病理所見であることが示された。

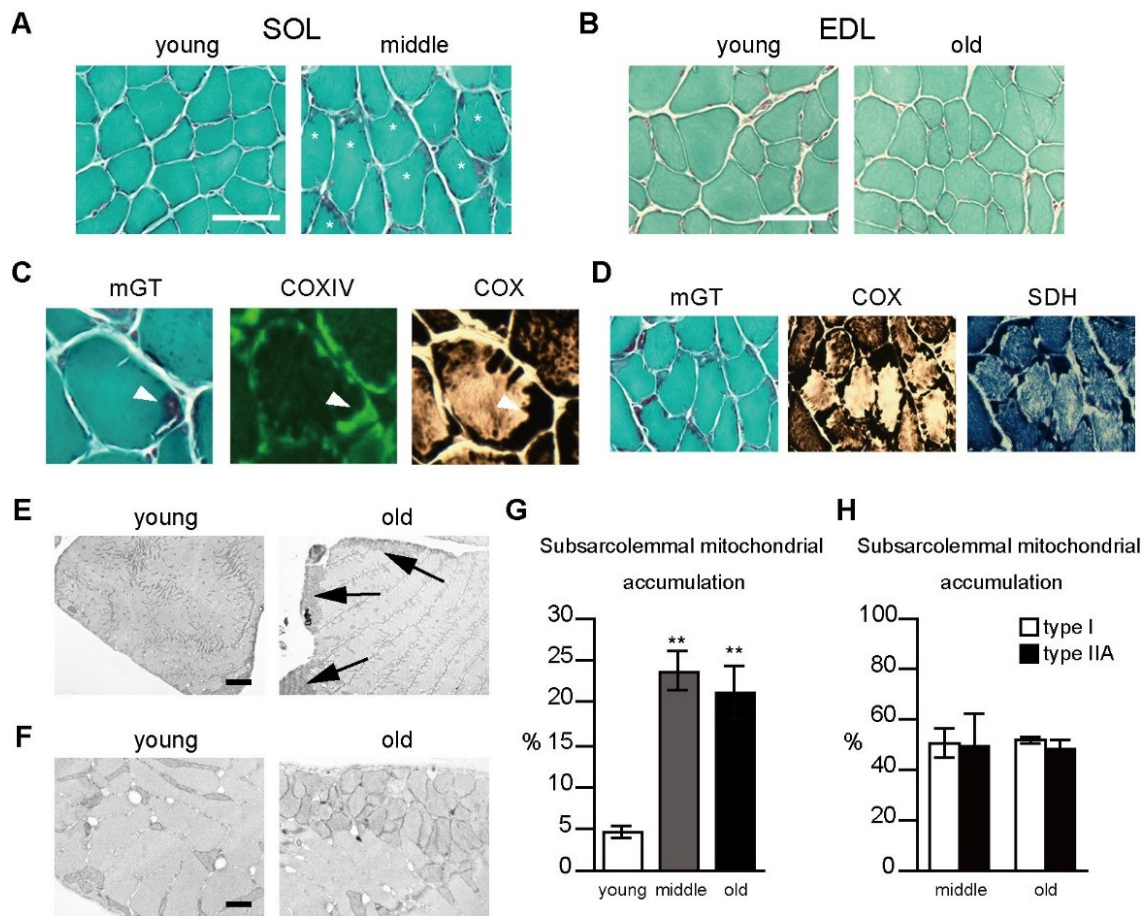


図 8. subsarcolemmal 領域におけるミトコンドリア蓄積像

(A) young 群と middle-aged 群の SOL における mGT 染色像を示した。*印は、subsarcolemmal 領域における蓄積像を示した。Scale bar = 100 μ m. (B) young 群と old 群の EDL における mGT 染色像を示した。Scale bar = 100 μ m. (C) old 群の SOL における、mGT 染色、COXIV 免疫染色、COX 染色を施した連続切片画像を示した。Arrowhead は、mGT 染色、COXIV 免疫染色、COX 染色における陽性反応を示す。(D) middle-aged 群の SOL における、mGT 染色、COX 染色、SDH 染色を施した連続切片画像を示した。いずれの染色においても濃染された蓄積像は、subsarcolemmal 領域に局在していた。(E) young 群と old 群の SOL における TEM 画像を示した。矢印は、subsarcolemmal 領域におけるミトコンドリア蓄積像を示す。Scale bar = 5 μ m. (F) (E) で示した画像の拡大像を示す。

した。Scale bar = 1 μ m. (G) SOL における mGT 染色で得られた画像をもとに、subsarcolemmal 領域におけるミトコンドリア蓄積を含有した筋線維の割合を定量し、測定した筋線維数に対する割合を%として表記した。(H) SOL の type I 線維と type IIA 線維における、subsarcolemmal 領域のミトコンドリア蓄積を含有する筋線維の割合を%として表記した。

n=6-10/group, Student's t-test, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

表 4. 加齢に伴う、SOL における筋病態の変化

Parameter	young	middle-aged	old
筋重量	Baseline	No change	Reduction
type I 線維数		No change	No change
type IIA 線維数		No change	Reduction
type IIX/IIB 線維数		No change	Reduction
type I 線維面積		No change	No change
type IIA 線維面積		No change	No change
type I 線維における COX 活性		Reduction	Reduction
type IIA 線維における COX 活性		No change	No change
OXPHOS 機能		Reduction	ND
type I と type IIA 線維 における subsarcolemmal 領域に おけるミトコンドリア 蓄積		Increase	Increase

young; 6-8 ヶ月齢、 middle-aged; 19-20 ヶ月齢、 old; 29-32 ヶ月齢、 ND; not determined

表 5. 加齢に伴う、EDL における筋病態の変化

Parameter	young	middle-aged	old
筋重量	Baseline	No change	Reduction
type IIA 線維数		No change	No change
type IIX 線維数		No change	No change
type IIB 線維数		No change	Reduction
type IIA 線維面積		No change	No change
type IIX 線維面積		No change	No change
type IIB 線維面積		Reduction	Reduction
COX 活性		ND	No change
OXPPOS 機能		No change	ND
subsarcolemmal 領域に おけるミトコンドリア 蓄積		ND	No change

young; 6-8 ヶ月齢、 middle-aged; 19-20 ヶ月齢、 old; 29-32 ヶ月齢、 ND; not determined

表 6. 老齡マウスの SOL において認められたミトコンドリア蓄積像と RRFs との違い

Mitochondrial morphology	SOL in this study	RRFs
Subcellular mitochondria	Subsarcolemmal 領域	Subsarcolemmal 領域 と筋線維内全体
mGT staining	Subsarcolemmal 領域	Subsarcolemmal 領域 と筋線維内全体
COX staining	Subsarcolemmal 領域 に局限して高活性	筋線維内全体に 活性欠損
SDH staining	Subsarcolemmal 領域 に局限して高活性	筋線維内全体に 高活性

RRFs; ragged red fibers、mGT; ゴモリトリクローム変法

4-4. SOL および EDL における、ミトコンドリア関連遺伝子発現の加齢変化

筋病理および OXPHOS 機能評価の結果、SOL において、middle-aged 群の時点から、ミトコンドリア病理変化と機能低下が認められた。一方で、EDL においては、SOL で認められたような加齢に伴うミトコンドリアの形態および機能の顕著な変化は認められなかった（図 5-8）。そこで、ミトコンドリア病態変化が顕在化した middle-aged 群におけるミトコンドリア関連遺伝子発現の変動について、young 群のそれと比較解析することで、SOL において認められたミトコンドリア病態変化の背景にあるメカニズムおよび、SOL と EDL のミトコンドリア病態変化の違いを説明するメカニズムを探索することとした。本研究では、ミトコンドリア生合成関連遺伝子、ミトコンドリアダイナミクス関連遺伝子、そして、加齢に伴うミトコンドリア障害との密接な関連性が示唆されている酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現変動を RT-PCR によって解析した。

まず、ミトコンドリア生合成関連遺伝子として、PGC-1 α 、PGC-1 β 、PPAR δ 、AMPK α 1 の mRNA 発現を解析した（図 9）。その結果、我々の予想に反して、ミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターとして知られている PGC-1 α の mRNA レベルは、young 群と比較して、middle-aged 群の SOL と EDL において、有意な発現上昇を認めた（図 9A）。middle-aged 群の EDL においては、young 群と比較して 1.2 倍程の発現上昇であったのに対して、middle-aged 群の SOL においては、young 群と比較して 2.5 倍程の発現上昇が認められ、PGC-1 α の発現上昇の程度は、SOL において顕著であった（図 9A）。

PGC-1 β は PGC-1 α のホモログであり、組織発現分布や機能の面において、PGC-1 α と重複する点が多いことが知られている一方で、生理的な刺激に対す

る応答性の観点で PGC-1 α とは異なり、基底状態のミトコンドリア生合成や OXPHOS 機能を制御する役割を担うと考えられている [46]。PGC-1 β の mRNA 発現は、young 群と比較して、middle-aged 群の SOL と EDL において、有意な発現減少が認められ、その発現変動の程度は SOL においてより顕著であった (図 9B)。PPAR δ は、骨格筋に存在する PPAR ファミリーの中で最もドミナントに発現しているアイソフォームであり、PPAR δ のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた表現型解析の結果から、ミトコンドリア生合成や筋の酸化的代謝能を制御していることが知られている [47]。PPAR δ の mRNA 発現は、young 群と比較して、middle-aged 群の SOL において有意な発現減少を認め、EDL においては有意な変化は認められなかった (図 9C)。

AMPK は、細胞内のエネルギーセンサーとして作用し、PGC-1 α の活性化を誘導してミトコンドリア生合成を促進することが報告されている [48,49]。AMPK の活性型サブユニットである AMPK α 1 の mRNA 発現を解析した結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL において有意な発現上昇を認めた。一方、EDL においては有意な AMPK α 1 の mRNA 発現変化は認められなかった (図 9D)。これらの結果から、ミトコンドリア病理や OXPHOS 機能の加齢変化と同様に、ミトコンドリア生合成関連遺伝子発現は、加齢した SOL において大きく発現変動することが示された。また、一連の RT-PCR の結果、老齡マウスの SOL において、AMPK/PGC-1 α axis が関与している可能性が示唆された。

ミトコンドリアは、融合と分裂を絶えず繰り返すことでミトコンドリアネットワークを形成し、また、傷害を受けたミトコンドリアはオートファジー系によって分解されることでミトコンドリア品質が保たれる。このようなミトコンドリアダイナミクスは、ミトコンドリアの健全な形態を維持するとともに、細

胞内のミトコンドリア局在の恒常性を維持していると言われている [50-52]。本研究では、図 8 に示したように、mGT 染色の結果、老齢マウスの SOL において、subsarcolemmal 領域におけるミトコンドリア蓄積像が観察され、細胞内におけるミトコンドリア局在が変化していることが示唆された。そこで、ミトコンドリアダイナミクス関連遺伝子発現の変化について解析を行った。その結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL および EDL において、ミトコンドリアの分裂マーカーとして知られている Drp1 発現が僅かながら有意な上昇を認めたものの、ミトコンドリアの融合マーカーとして知られている Mfn1、Mfn2、Opa1 における有意な発現変動は認められなかった (図 10A-D)。また、ミトコンドリア品質管理に関与している Pink1 および Parkin における遺伝子発現においても、有意な変化は認められなかった (図 10E, F) 以上のように、本研究において、middle-aged 群の SOL と EDL とともに、ミトコンドリアダイナミクスの代表的なマーカー遺伝子における顕著な発現変動は認められなかった。

加齢に伴う酸化ストレスの蓄積は、ミトコンドリアの傷害に密接に関与していると考えられている [53]。実際に、先行研究の結果では、加齢した骨格筋において、酸化ストレスの蓄積に伴いミトコンドリア機能低下が認められることが報告されている [54]。本研究では、酸化ストレスのマーカー遺伝子として、Txnrd1、Srxn1、および Gclc の mRNA 発現変動を解析した。その結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL において、上記の酸化ストレス関連遺伝子発現の有意な上昇が認められた (図 11)。一方で、EDL においては、young 群と middle-aged 群との間において、酸化ストレス関連遺伝子発現の変化は認められなかった (図 11)。これらの結果から、加齢に伴う酸化ストレスの蓄積が、SOL におけるミトコンドリア病態変化に関与している可能性が示唆された。

低酸素状態の誘導は、酸化ストレスの産生を亢進することが報告されている [55]。そこで、低酸素状態を反映するマーカー遺伝子として、HIF1 α の発現変化に着目した。遺伝子発現解析の結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL において、HIF1 α の有意な発現上昇を認めた (図 12A)。一方で、EDL における HIF1 α の発現変化は認められなかった (図 12A)。この結果は、加齢した SOL において、低酸素状態が誘導されたことを示唆しており、低酸素状態が関与した酸化ストレスの亢進が、老齢マウスの SOL において認められたミトコンドリア病態変化に関与している可能性が考えられた。

低酸素状態の誘導は、酸化的代謝に代償して嫌氣的代謝 (解糖系代謝) を亢進することが報告されている [56]。そこで、HIF1 α による制御を受けることが知られている解糖系代謝のマーカー遺伝子として、PKM および PDK1 の mRNA 発現変化を解析した。PKM は、解糖系代謝の最終段階に位置する酵素であり、ホスホエノールピルビン酸と ADP からピルビン酸と ATP を産生する [56]。PDK1 は、ピルビン酸をアセチル CoA に変換するミトコンドリアのクエン酸回路の酵素である PDH (pyruvate dehydrogenase) をリン酸化して不活化する酵素である [56]。遺伝子発現解析の結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL において、PKM および PDK1 の有意な発現上昇が認められた (図 12B, C)。一方の EDL においては、middle-aged 群において、軽度な PDK1 mRNA の発現減少が認められたものの、PKM の mRNA 発現は young 群と比較して有意な差は認められなかった (図 12B, C)。これらの結果から、加齢した SOL において、ミトコンドリア機能低下に伴う酸化的代謝の機能不全に代償して、骨格筋内の ATP ホメオスタシスを維持するために、解糖系代謝が誘導されていることが示唆された。

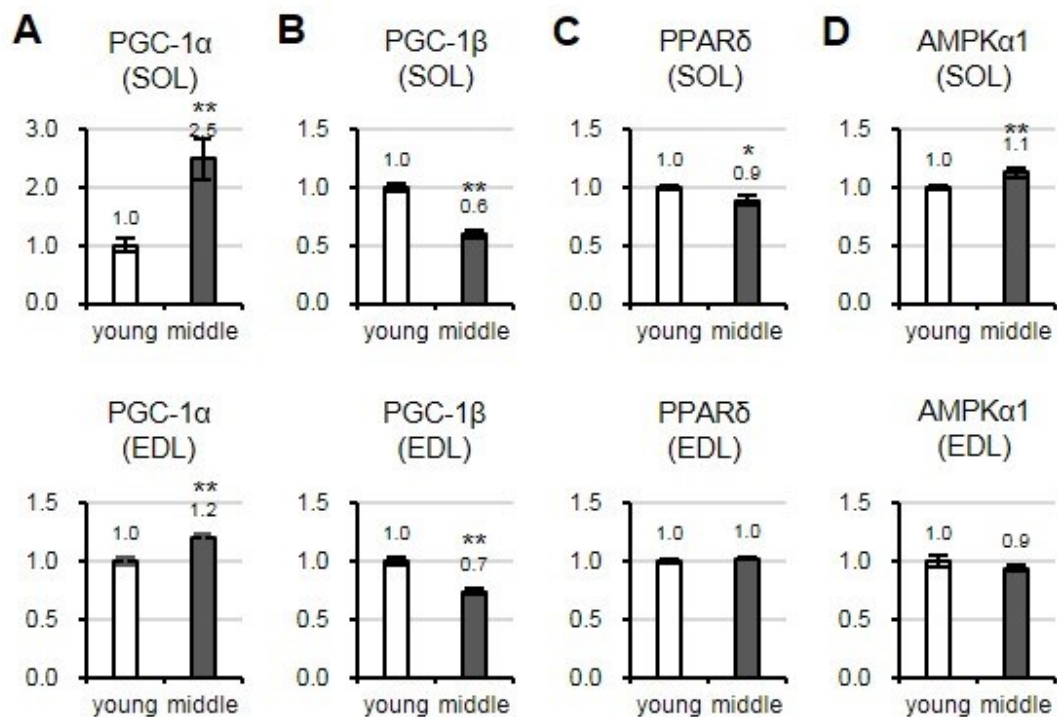


図 9. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における、ミトコンドリア生合成関連遺伝子発現の変化

(A) PGC-1 α の発現変化を示した。(B) PGC-1 β の発現変化を示した。(C) PPAR δ の発現変化を示した。(D) AMPK α 1 の発現変化を示した。ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

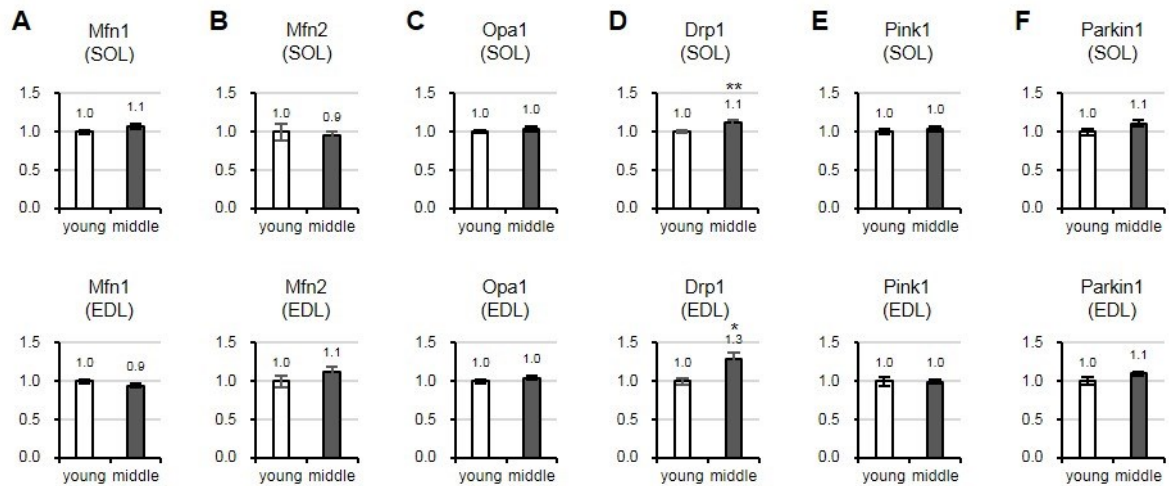


図 10. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における、ミトコンドリアダイナミクス関連遺伝子発現

(A) Mfn1 の発現変化を示した。(B) Mfn2 の発現変化を示した。(C) Opa1 の発現変化を示した。(D) Drp1 の発現変化を示した。(E) Pink1 の発現変化を示した。(F) Parkin の発現変化を示した。ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

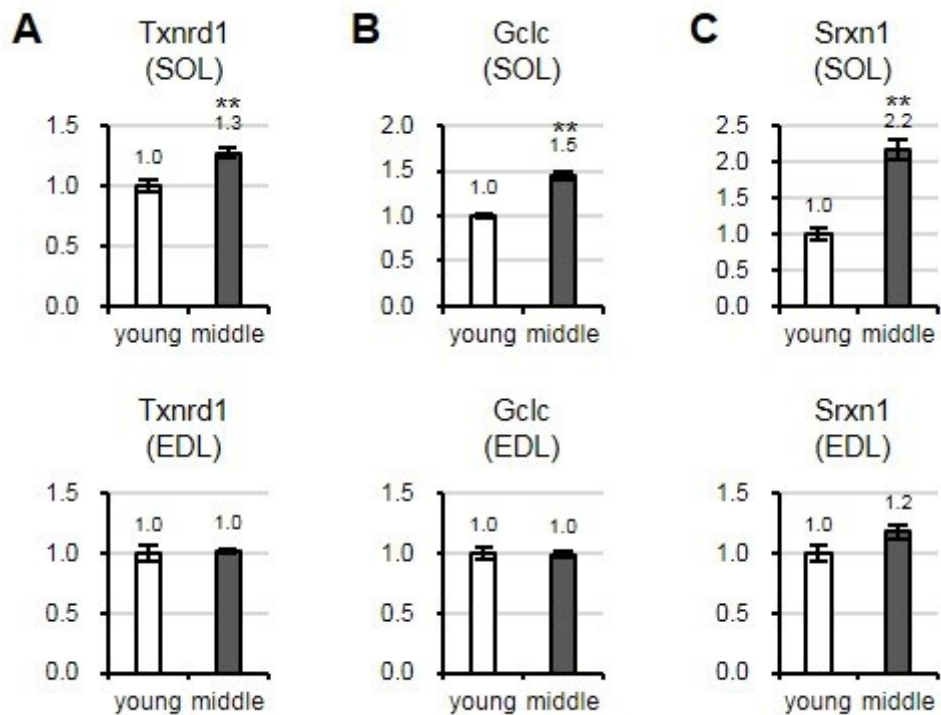


図 11. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における、酸化ストレス関連遺伝子発現

(A) Txnrd1 の発現変化を示した。(B) Gclc の発現変化を示した。(C) Srxn1 の発現変化を示した。ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

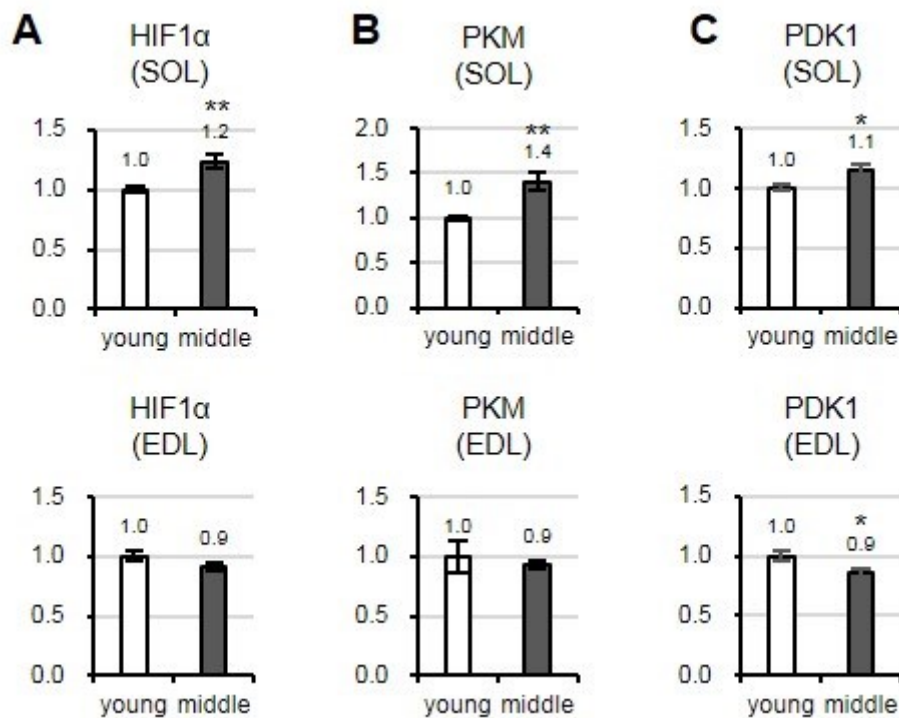


図 12. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における、HIF1 α および解糖系代謝関連遺伝子発現

(A) HIF1 α の発現変化を示した。(B) PKM の発現変化を示した。(C) PDK1 の発現変化を示した。ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

※ T. Fukunaga et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 540 (2021) 116e122, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.071> より引用。

4-5. SOL および EDL における、筋蛋白質分解関連遺伝子発現の加齢変化

本研究において、加齢に伴うミトコンドリア病態の変化は、SOL において主に認められたが、筋線維の萎縮との明確な関連性は示さなかった（表 4）。加えて、老齢マウスの EDL においては、筋線維萎縮が認められたものの、SOL において観察されたようなミトコンドリア病態の変化は認められなかった（表 5）。これらの結果から、老齢マウスの SOL と EDL において認められた筋線維の萎縮において、ミトコンドリア病態変化とは異なる他の要素の関与が考えられた。骨格筋は、筋蛋白質の分解と合成のバランスによって、筋量のホメオスタシスが保たれている。加齢に伴い筋蛋白質の分解が亢進することが、筋線維萎縮の要因の 1 つとして考えられている [4]。骨格筋を構成する蛋白質は、主にユビキチンプロテアソーム経路を介して分解される [30]。先行研究において、ユビキチンプロテアソームのマーカージンとして用いられている E3 ユビキチンリガーゼの MuRF1 の発現は、加齢した前脛骨筋などの速筋優位筋において主に誘導されることが報告されており [33]、加齢に伴う筋蛋白質分解の亢進は筋線維タイプ特異性を有する可能性が示唆されている。しかしながら、筋線維タイプ単位における、MuRF1 をはじめとした筋蛋白質分解関連マーカーの加齢変化についてはよく分かっていない。

そこで、SOL と EDL における筋蛋白質分解の指標として、MuRF1 をはじめとした筋蛋白質分解関連遺伝子の mRNA 発現変化を解析した。本研究において、加齢に伴う筋重量の減少が顕在化する以前の時点である middle-aged 群における遺伝子発現を young 群のそれと比較解析した。その結果、young 群と middle-aged 群の SOL においては、MuRF1、Atrogin1、および Cblb の mRNA 発現に有意な変化は認められなかった（図 13A-C）。一方、middle-aged 群の EDL

は、young 群に比較して、MuRF1 および Cblb mRNA 発現の有意な上昇が認められた (図 13A-C)。これらの結果は、加齢した EDL では、ユビキチンプロテアソームによる筋蛋白質分解の亢進が筋線維の萎縮に関与する可能性を示すものと考えられ、先行研究の知見と同様に速筋優位筋において筋蛋白質分解の関与が大きいことを支持する結果であった。次に、MuRF1 および Cblb の発現上昇に関与するメカニズムを解析するために、Foxo1 発現変化に着目した。Foxo1 は、坐骨神経切除による除神経誘導性の筋萎縮モデルなどにおける筋萎縮した骨格筋において、発現上昇することが知られている [57]。また、Foxo1 のトランスジェニックマウスは、MuRF1 や Cblb 発現上昇を伴い、骨格筋の萎縮を誘導することが報告されている [58]。本研究において、young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における Foxo1 mRNA 発現を解析した結果、young 群に比較して、middle-aged 群の SOL および EDL において有意な発現上昇が認められた (図 13D)。middle-aged 群の SOL においては、young 群と比較して 1.5 倍の発現上昇を示したのに対して、middle-aged 群の EDL では、young 群と比較して 2.9 倍の発現上昇を示しており、加齢に伴う Foxo1 発現上昇の程度は、EDL においてより顕著であった (図 13D)。このことは、加齢した EDL において、Foxo1 を介した筋蛋白質分解が顕著に誘導されていることが示唆された。

middle-aged 群の EDL において認められた MuRF1 発現変化の筋線維タイプ特異性を調べるために、筋横断切片を用いて MuRF1 に対する免疫染色を行った。MuRF1 免疫染色によって得られた画像の intensity をもとに、MuRF1 蛋白質の発現を評価した。その結果、MuRF1 の遺伝子発現解析の結果と同様に、SOL における MuRF1 の蛋白質発現は、young 群と middle-aged 群との間に明確な変化は認められなかった (図 14A)。一方で、middle-aged 群の EDL においては、young 群に比較して、MuRF1 蛋白質発現の上昇が認められ、type IIX 線

維と type IIB 線維において有意に、その発現上昇が認められることを明らかにした(図 14B)。最近の先行研究によると、type II 線維の中で type IIB 線維は、定常状態における筋蛋白質の合成能が最も低いことが報告されている[38]。本研究では、EDL において、加齢に伴い type IIB 線維の面積低下と数の減少を認めしたが、この要因として、type IIB 線維は筋蛋白質分解の影響を受けやすい可能性が考えられた。

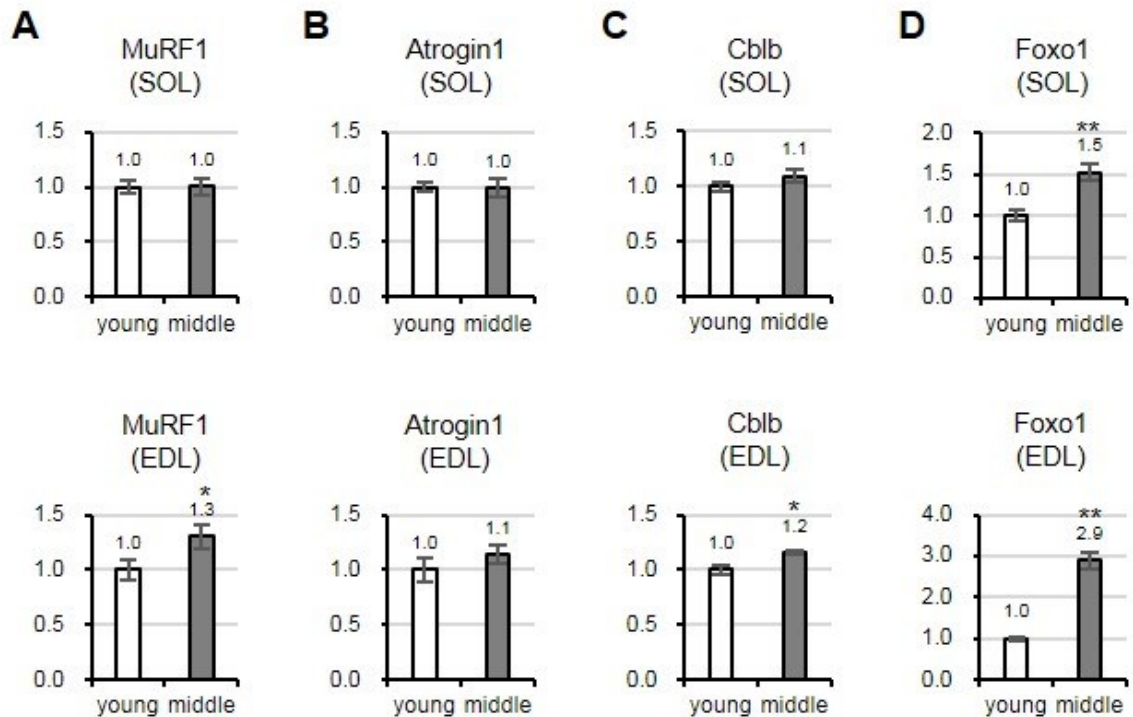


図 13. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における、筋蛋白分解関連遺伝子発現

(A) MuRF1 の発現変化を示した。(B) Atrogin1 の発現変化を示した。(C) Cblb の発現変化を示した。(D) Foxo1 の発現変化を示した。ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the young group.

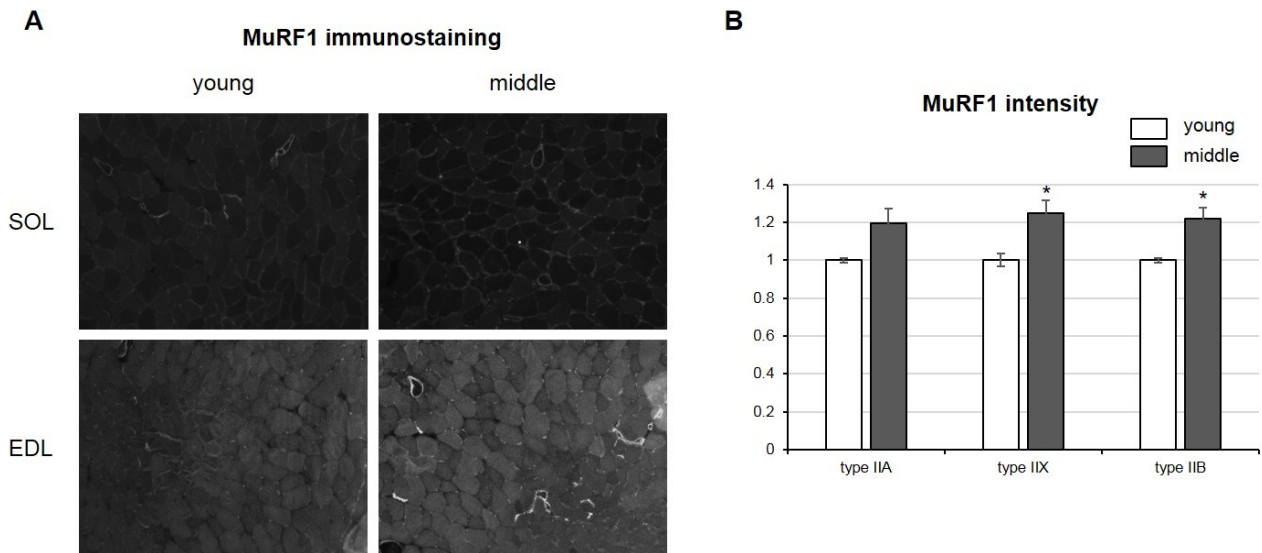


図 14. young 群と middle-aged 群の SOL および EDL における MuRF1 に対する免疫染色

(A) SOL と EDL における免疫染色像を示した。(B) (A) に示した画像をもとに、young 群と middle-aged 群の EDL における筋線維タイプ単位の MuRF1 発現を示した。young 群における MuRF1 の intensity を 1 としたときの、middle 群における MuRF1 の intensity を相対値として表記した。n=4-6/group, Student's t-test, *P < 0.05 vs. the young group.

4-6. SOL および EDL における、IGF1 遺伝子発現の加齢変化

老齢動物を用いた先行研究では、加齢による骨格筋量の減少を伴う筋において、筋蛋白質合成シグナルが低下することが報告されている[4,31]。筋蛋白質合成シグナルにおいて、IGF1/PI3K/Akt/mTOR axis が主に関与していることが知られている[31]。老齢動物における筋萎縮に対して、IGF1 を投与すると、筋萎縮に対して拮抗作用を示すことから、加齢した骨格筋における IGF1/PI3K/Akt/mTOR axis の低下は、筋萎縮において重要な役割を担っていると考えられている[59]。IGF1 は、成長ホルモンの刺激によって主に肝臓から分泌されるポリペプチドであり、IGF1 受容体に結合すると、PI3K/Akt/mTOR 経路を活性化することで同化作用を促進することが知られている。IGF1 は運動時に誘導されるマイオカインとして骨格筋からも分泌されており、オートクライン作用によって、骨格筋における筋蛋白質合成を制御していることが知られている[60]。そこで、本研究では、筋蛋白質合成の指標として、IGF1 mRNA の発現解析を行った。その結果、middle-aged 群の SOL において、young 群と比較して、IGF1 mRNA レベルの有意な減少が認められた（図 15A）。一方で、middle-aged 群の EDL においては、young 群に比較して、IGF1 mRNA レベルの減少傾向が認められたものの有意な変化は認められなかった（図 15B）。これらの結果から、老齢マウスの SOL で認められた筋線維萎縮において、骨格筋の IGF1 発現低下に伴う筋蛋白質合成能の減少が関与している可能性が示唆されたが、IGF1 発現低下が筋線維タイプ特異的に認められるのかについての検証は今後の検討課題である。

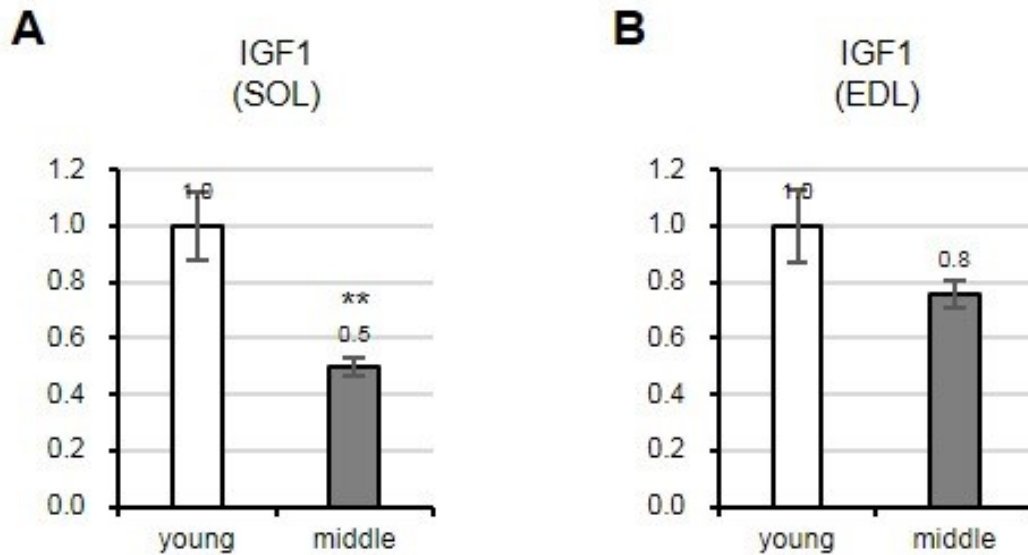


図 15. young 群 middle-aged 群の SOL および EDL における、IGF1 遺伝子発現

(A) SOL における IGF1 発現変化を示した。(B) EDL における IGF1 発現変化を示した。

ハウスキーピング遺伝子は β -actin を用いた。各々の標的遺伝子の mRNA 発現量を β -actin の発現量で補正した値を表記した。young 群における標的遺伝子の発現量を 1 としたときの、middle 群における発現量を相対値として表記した。n=6/group, Student's t-test, **P < 0.01 vs. the young group.

5. 考察

本研究の結果、老齢マウスの SOL において、ミトコンドリアの病態変化、すなわち、type I 線維特異的なミトコンドリア呼吸酵素（NADH-TR; complex I, COX; complex IV）活性の低下、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体（complex I, complex II, complex IV）による OXPHOS 機能の低下、および、RRFs とは異なる病理学的特徴を示す subsarcolemmal 領域のミトコンドリア蓄積は、筋線維タイプで固有な変化を示すことを明らかにした。これらのミトコンドリア病態変化は、筋重量の減少に先行して顕在化したが、筋線維萎縮との明確な相関は認められなかった。また、老齢マウスの SOL では、酸化ストレスマーカー遺伝子群の発現上昇を示すことに加えて低酸素状態が誘導されることが示唆され、ミトコンドリアの病理学的および機能的変化において、低酸素状態が介在した酸化ストレスの蓄積が関与する可能性が示された。EDL においては、SOL において観察されたようなミトコンドリア病態の変化は認められなかった。筋蛋白質分解と合成の加齢変化と筋線維萎縮との関連を解析した結果、加齢した EDL において、MuRF1 をはじめとする E3 ユビキチンリガーゼの遺伝子発現上昇および、type IIX と IIB 線維における MuRF1 蛋白質発現上昇を認めた。一方、加齢した SOL においては、MuRF1 などの蛋白質分解関連遺伝子の明確な発現変化は認められず、IGF1 mRNA 発現の減少が認められた。これらの結果から、加齢に伴うミトコンドリア病態の変化は、筋線維の萎縮を誘導するというよりむしろ、筋の酸化的代謝機能の低下など筋の質的な変化に関与することが示された。SOL および EDL において認められた筋線維の萎縮に対しては、筋蛋白質分解・合成バランスの加齢変化が関与している可能性が示された。

ミトコンドリアは、融合と分裂のサイクルを繰り返すことでミトコンドリアネットワークを形成し、ミトコンドリア形態の恒常性を維持している[50,51]。最近の先行研究によると、酸化的代謝特性を有する type I 線維および type IIA 線維は、嫌氣的代謝特性を有する type IIX 線維や type IIB 線維と比較して、定常状態におけるミトコンドリアの形態が異なること示されている[39]。type I や type IIA 線維に存在するミトコンドリアは、融合したミトコンドリアの割合が高く、筋の縦断方向に伸長して連なった形態を示す。一方の type IIX や type IIB 線維に存在するミトコンドリアは、分裂したミトコンドリアの割合が低く分離した形態を示す。ミトコンドリアの形態はミトコンドリアによる代謝機能と密接に関連していることが報告されている[50]。type I 線維や type IIA 線維において ATP 産生のエネルギー産生効率がより高い融合型ミトコンドリアが分裂型のミトコンドリアよりも優位に存在していることは、筋力運動よりも持久運動に適した遅筋線維の機能を維持するために有利である。本研究の結果、加齢した SOL の type I 線維と type IIA 線維において、subsarcolemmal 領域に限局してミトコンドリア呼吸酵素 COX および SDH 活性が増強したミトコンドリア蓄積像が観察された。このミトコンドリア蓄積は、middle-aged 群の SOL において認められた OXPHOS 機能不全に対して、形態変化を伴う局所的なミトコンドリア機能亢進により ATP の供給を補っている可能性が考えられる。加齢した SOL において、type I 線維の主に中心領域でミトコンドリア呼吸酵素 (COX, NADH-TR) 活性の減少が認められたことは、この可能性を支持する。加齢した EDL においては、ミトコンドリア蓄積像は観察されなかった。これは、各筋線維タイプにおける定常状態のミトコンドリア形態の違いが関与している可能性があるが、更なる検証が必要である。本研究の結果から、COX 活性の減少は、加齢に伴う筋線維萎縮との相関は小さく、むしろ骨格筋の酸化的代謝機能の障害に伴う筋の質的变化が機能低下に関与していると考えられた。実

際に、高齢者の骨格筋において、COX 活性の低下と筋力の低下とが有意な相関関係を示すことが報告されており [25]、type I 線維特異的な COX 活性の減少が加齢に伴う筋機能の低下を引き起こしている可能性が考えられた。

PGC-1 α は、ミトコンドリア生合成を制御するマスターレギュレーターとして機能することが知られている [15]。PGC-1 α のトランスジェニックマウスは、骨格筋におけるミトコンドリア生合成関連遺伝子発現の上昇や、ミトコンドリア酵素活性の亢進、ならびに、持久力の向上などの表現型を呈することが報告されている [15]。一方、老齢動物を用いた研究によると、若齢と比較して老齢動物の骨格筋では、PGC-1 α の発現が減少すること [16,23] や、骨格筋特異的な PGC-1 α のトランスジェニックマウスは、加齢に伴う骨格筋におけるミトコンドリア機能低下に対して、拮抗を示すことが報告されている [15]。これらの結果から、加齢に伴う PGC-1 α の発現低下がミトコンドリア機能不全に寄与するものと考えられている [28]。しかしながら、興味深いことに、本研究においては、young 群に比較して middle-aged 群の SOL および EDL とともに、PGC-1 α 発現の上昇が認められた。そして、その発現変動の程度は、ミトコンドリア病態変化が著しかった SOL において大きかった。このメカニズムとしては、AMPK/PGC-1 α axis が関与している可能性が考えられる。細胞内のエネルギーセンサーである AMPK は、ATP 量に応じてその活性が制御されており、AMPK の活性化は PGC-1 α の発現を誘導する [48,49]。加齢した SOL においては、OXPHOS 機能の低下に伴い細胞内 ATP 量の減少が生じていたことが予想され、筋内の ATP ホメオスタシスを維持するために、AMPK 活性化によって代償的に PGC-1 α の発現が誘導された可能性がある。これと同様の所見は、ミトコンドリアミオパチー患者の骨格筋においても観察されている [61]。ミトコンドリアミオパチーは、ミトコンドリア DNA の変異によって、著しくミトコンドリ

ア機能不全を示す常染色体劣性筋疾患である[12,13]。ミトコンドリアミオパチー患者の骨格筋では、ミトコンドリア機能不全に代償する機構として、PGC-1 α 発現上昇を示し、このメカニズムにおいて AMPK/PGC-1 α axis が寄与していることが報告されている[61]。SOL における加齢に伴う PGC-1 α 発現変化において、老齢動物を用いた先行研究の結果と本研究の結果とでは不一致が生じたが、この要因としては、解析の対象とした加齢筋の月齢の違いが考えられる。先行研究では、6 ヶ月齢を若齢群として 36 ヶ月齢を老齢群として比較をしており、本研究により middle-aged 群と old 群では骨格筋における PGC-1 α 発現量が大きく変化する可能性が示された[23]。また、本研究では加齢した SOL において、subsarcolemmal 領域に限局して高度な COX 活性と SDH 活性の亢進を伴うミトコンドリア蓄積所見が認められた。PGC-1 α の発現は、ミトコンドリア呼吸酵素 COX や SDH の活性と正の相関を示すことが報告されており[15]、middle-aged 群の SOL における PGC-1 α 発現上昇は、SOL におけるミトコンドリア蓄積像の分子メカニズムの一旦を担っていることが示唆された。

本研究では、middle-aged 群の SOL および EDL において、young 群と比較して、PGC-1 β の有意な発現減少を示し、その発現減少の程度は SOL においてより大きい結果を示した。PGC-1 α のホモログである PGC-1 β は、N-terminal activation domain、central regulatory domain、C-terminal RNA binding domain を含み、それぞれのドメインにおける PGC-1 α との配列相同性は、40%、35%、48% である[46][62]。PGC-1 α と PGC-1 β はともに、褐色脂肪組織や心臓や骨格筋など酸化的代謝が盛んな組織に多く発現を示し、ミトコンドリア生合成や酸化的代謝機能の維持において重要な役割を担っていることが報告されている[46]。このように、PGC-1 α と PGC-1 β は、組織発現分布および機能の観点において共通点が多いが、生理的な刺激に対して異なる応答性を示す。例えば、寒冷刺

激下にある褐色脂肪組織および骨格筋、絶食下にある肝臓、運動時の骨格筋において、PGC-1 α の発現は上昇すると言われている一方で、PGC-1 β の発現は、これらの条件下において、その発現は維持されるという [46][62]。これらのことから、PGC-1 α は生理的刺激条件下にあるミトコンドリアの機能を制御する役割が大きいのに対して、PGC-1 β は定常状態におけるミトコンドリア機能の制御において重要な役割を担うと考えられている。本研究では、老齢マウスの SOL において、PGC-1 β の顕著な発現低下を示したが、このことは、SOL において認められた OXPHOS 機能低下に寄与している可能性が考えられた。実際に、PGC-1 β のノックアウトマウスの骨格筋では、OXPHOS 機能が顕著に低下することが報告されている [46]。先行研究によると、老齢マウスの大腿四頭筋 (quadriceps muscle, 主に type IIX 線維と type IIB 線維で構成される) においては、PGC-1 α と PGC-1 β の両方が発現減少を示しており [63]、本研究で得られた SOL と EDL における結果とは必ずしも一致していない結果が報告されている。このことから、加齢に伴う骨格筋における PGC-1 α と PGC-1 β の発現変化は、加齢のタイムコースに加えて、骨格筋間でもその発現制御が異なる可能性が考えられるが、このメカニズムの違いについての研究はほとんどなされておらず、今後の研究が必要である。

本研究では、加齢に伴う PPAR δ mRNA の発現低下は、SOL において認められ、EDL においては変化を示さなかった。PPAR δ は、骨格筋に存在する PPAR ファミリーの中でドミナントな発現を示し、骨格筋の OXPHOS 機能の維持において必要であることが明らかとされている。PPAR δ トランスジェニックマウスの骨格筋は OXPHOS 機能が向上することや、PPAR δ ノックアウトマウスの骨格筋はミトコンドリア生合成の減少を伴う OXPHOS 機能低下の表現型が報告されている [47,64]。これらのことから、上述した PGC-1 β の発現減少に加え

て、PPAR δ の発現低下が、加齢に伴う SOL における OXPHOS 機能低下を説明する分子メカニズムの一旦を担っている可能性が示唆されるが、これらの発現変化が type I 線維特異的に引き起こされているかどうかについての研究は今後の課題であると考えられた。

加齢に伴い、骨格筋において酸化ストレスが蓄積することは、これまでに多くの先行研究の結果から明らかにされている [14,28,53]。酸化ストレスは、細胞内における活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の量と、それに拮抗する抗酸化能とのバランスが崩れることによって、細胞内のレドックスが酸化状態へとシフトすることで誘導される [65]。蓄積された ROS は、DNA や蛋白質などの生体内に存在する高分子と反応し、DNA の変異や蛋白質の変性を引き起こすことで、組織障害を促す。ミトコンドリアは、ROS の主な発生源である一方で、ROS による障害を受けやすい細胞内オルガネラでもあり、加齢した骨格筋において、ROS の蓄積に伴いミトコンドリア機能不全が認められることが報告されている [54]。ミトコンドリアを構成する蛋白質は、核 DNA だけでなくミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) によってもコードされており、特に mtDNA は ROS による傷害を受けやすいことが知られている [53,66]。実際に、ROS 産生を促進する物質である H₂O₂ を細胞に添加した実験において、mtDNA が顕著に分解されることが報告されている [66]。mtDNA はミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成に必須である蛋白質をコードしていることから、ROS による mtDNA の損傷はミトコンドリア機能不全につながる。さらに、機能不全に至ったミトコンドリアは異常な ROS 産生を伴い、さらなるミトコンドリア障害を誘導する vicious サイクルを形成する [67]。これらのことから、加齢による酸化ストレスの蓄積は、骨格筋におけるミトコンドリア機能不全の主たる要因となっている可能性が考えられている。本研究では、顕著なミトコンド

リア病態変化を示した老齢マウスの SOL において、酸化ストレスマーカー遺伝子 (Txnrd1、Srxn1、Gclc) の発現上昇が認められた。一方で、ミトコンドリア病態変化を示さなかった EDL においては、これらの遺伝子発現の変化は認められなかった。このことから、老齢マウスの SOL で認められたミトコンドリア呼吸機能の低下やミトコンドリア蓄積において、酸化ストレスが関与している可能性が考えられた。老齢動物を用いた先行研究によると、雄の老齢ラットにおいては、骨格筋における H₂O₂ 産生量を指標とした酸化ストレスの亢進は、腓腹筋 (gastrocnemius muscle) や長内転筋 (adductor longus muscle) において認められた一方で、SOL においては変化が認められなかったとの結果を報告している [17]。先行研究の結果と本研究との不一致の要因としては、性別や動物種あるいは対象とした老齢マウスの月齢の違いが考えられ、今後は、性別、動物種、飼育環境を統一した条件下において、ミトコンドリア機能低下と酸化ストレスとの関連性を精査していく必要があると考えられた。

低酸素状態は、ミトコンドリアからの ROS 産生を促進することが報告されている [55]。本研究では、HIF1 α の遺伝子発現を低酸素状態の指標として解析し、老齢マウスの SOL で認められた酸化ストレスの亢進において、低酸素状態が関与している可能性を示した。それではなぜ、加齢した SOL において低酸素状態が誘導されたのか？ 癌の研究分野では、癌細胞が増殖しやすい環境として、細胞内の代謝環境を酸化的代謝から解糖系代謝へとシフトする metabolic reprogramming が生じ、その機構において低酸素状態が関与すると言われていている [68–70]。本研究では、middle-aged 群の SOL において、ミトコンドリアによる OXPHOS 機能低下が認められたことから、酸化的代謝による ATP 供給が減少していることが予想された。この代償反応として、低酸素状態が介在した解糖系代謝への metabolic reprogramming による ATP 供給機構が誘導されている

可能性が考えられた。解糖系代謝のマーカー遺伝子として評価した、PKM および PDK1 の mRNA 発現上昇が middle-aged 群の SOL において認められた結果は、この可能性を支持している。また興味深いことに、ミトコンドリアミオパチー患者の骨格筋では、機能不全に陥った酸化的代謝に代償して解糖系代謝が活性化するという知見もあり[12,61,71]、加齢した SOL において metabolic reprogramming が生じているという仮説を支持する。上述したように、酸化ストレス蓄積によるミトコンドリア機能低下は、vicious サイクルを形成して、ミトコンドリア障害を悪化させる[67]。これらのことから、低酸素状態が関与した酸化ストレスの亢進は、ミトコンドリア傷害を誘導するだけでなく、筋の metabolic reprogramming を誘導し、筋の質的な変化に関与している可能性が考えられる。

骨格筋への酸素供給は毛細血管を介して行われるが、酸素消費に富むミトコンドリアを多く含む酸化的代謝を主とする遅筋線維においては、解糖系代謝を主とする速筋線維に比較して、定常状態における毛細血管の量が多いと言われている[36,72]。加えて、最近の研究で、毛細血管が遅筋線維の subsarcolemmal 領域に沿って埋め込まれた様な形態で存在することが明らかとされている[72,73]。また、動脈硬化の合併症の一つとして知られている末梢動脈疾患

(Peripheral Arterial Disease, PAD)における骨格筋では、毛細血管が細くなる、あるいは詰まることによって、十分な血流が供給されず、虚血に伴うミトコンドリア機能低下やミトコンドリア凝集像が認められるとの報告もある[74-77]。これらの知見を踏まえると、SOL において認められたミトコンドリア蓄積や低酸素状態が誘導されるメカニズムとして、加齢に伴う毛細血管の形態あるいは機能の変化に関与している可能性が考えられたが、これについての研究はほとんどなされていない。低酸素状態下における metabolic reprogramming は、加齢

に伴う筋の質的な変化に対して重要な意義を持つ可能性があることから、今後は、この分子メカニズムを解明するために、更なる研究が必要であると考えられた。

RRFs はミトコンドリアの異常な増殖像を表しており、mGT 染色において筋線維内の全体が赤色に染色される特徴を持つ[42,45]。また、RRFs はミトコンドリアミオパチー患者の筋病理診断の指標となっている筋線維である。RRFs は、特徴的なミトコンドリア酵素活性染色の染色パターンを示すことが知られており、COX 活性が筋線維内全体に欠失し (COX⁻)、代償的に SDH 活性が筋線維内全体に高度に活性化する (SDH⁺⁺) [13,19,20,45]。これまでの先行研究では、COX⁻/SDH⁺⁺を示す筋線維を RRFs として部分的に定義しているケースが多く、同一の研究の中で mGT 染色および TEM の観察結果も含めて示されていない[13,19,20,45]。本研究では、COX および SDH 染色に加えて、mGT 染色と TEM による解析も加えることで、RRFs の厳密な定義に基づいて筋病理評価を行った。本研究で観察された老齢マウスの SOL におけるミトコンドリア病理像は、ミトコンドリアの蓄積が subsarcolemmal 領域に局在しており、COX 活性および SDH 活性が高度に活性化している所見を示しており、ミトコンドリアの細胞内局在およびミトコンドリア酵素活性の染色パターンの違いにおいて、従来から知られている RRFs とは異なるミトコンドリア病理所見であることが明らかとなった。RRFs は、ミトコンドリアミオパチーの骨格筋だけでなく、加齢した骨格筋においても存在することが報告されている[19][20]。加齢した骨格筋において観察された RRFs は、筋線維に沿って部分的に存在し、筋線維の萎縮（筋線維の面積低下）を伴うと言われており、大腿直筋（rectus femoris muscle）や外側広筋（vastus lateralis muscle）などの主に速筋線維で構成されている骨格筋に認められた一方で、SOL においてはほとんど観察されなかったこ

とが報告されている[19,20,29]。また、本研究で認められたミトコンドリア蓄積は、筋線維の萎縮との直接的な関連が無かった点においても、RRFsとは異なる病理所見であることが明らかとなった。興味深いことに、本研究で認められたミトコンドリア蓄積像と類似した病理所見は、高齢者の甲状披裂筋

(thyroarytenoid muscle, 主に type I 線維と type II 線維で構成される)において観察されており[78]、筋の加齢に伴うミトコンドリア形態変化において、ヒトとの類似性を指摘することができる。

本研究では、SOLとEDLにおいて、加齢に伴う筋蛋白質合成と分解のバランスの変化が、それぞれの筋における筋線維萎縮に関与している可能性が示された。middle-aged 群のEDLでは、MuRF1の蛋白質発現の上昇が type IIX 線維と type IIB 線維において認められ、これらの線維でユビキチンプロテアソームを介した筋蛋白質の分解機構が活性化していることが示唆された。

middle-aged 群のEDLでは、type IIX 線維において形態的な変化は認められず、type IIB 線維特異的な筋線維面積の低下が認められた。先行研究では、興味深いことに、リン酸化されたりボソーム S6 蛋白質の発現量を蛋白合成能の指標として筋病理解析を行った結果、定常状態において、type IIB 線維は他の筋線維タイプに比較して、蛋白質合成能が低いという結果が報告されている[38]。

これらのことから、type IIB 線維は、蛋白質分解シグナルが入った際に、蛋白質分解と合成のバランスが崩れやすく、筋線維の萎縮が誘導された可能性が考えられた。今後は、これらの筋における詳細な筋線維萎縮メカニズムを解明するために、筋蛋白質分解や合成の変化との関連性が報告されている神経筋接合部の形態および機能の加齢変化においても焦点を当てた研究が必要であると考えられた[4,57]。

本研究は、サルコペニアの病因解明に役立つ重要な結果を得た。サルコペニアは、筋線維タイプ単位で発症メカニズムが異なる可能性が示され、予想以上に多様で複雑なメカニズムが存在していることが分かった。今後、性差の違いについての解析と一緒に、各筋線維タイプ単位でサルコペニアのメカニズムを解明することで、新規メカニズムに基づく診断法と治療標的の発見につながる可能性がある。SOLにおけるミトコンドリア呼吸機能の低下およびミトコンドリア蓄積は、middle-aged 群の時点で既に認められていた。加齢のタイムコースのどの時点からミトコンドリア病態変化が認められるのか、サルコペニアの予防として一定の効果が報告されている有酸素運動や栄養療法によって可逆的にミトコンドリア病態変化を改善することができるのか、などについての検証は今後の課題である。本研究で発見したサルコペニア動物モデルにおける筋の質的变化としての筋病理学的な所見は、今後有用な指標になると期待する。

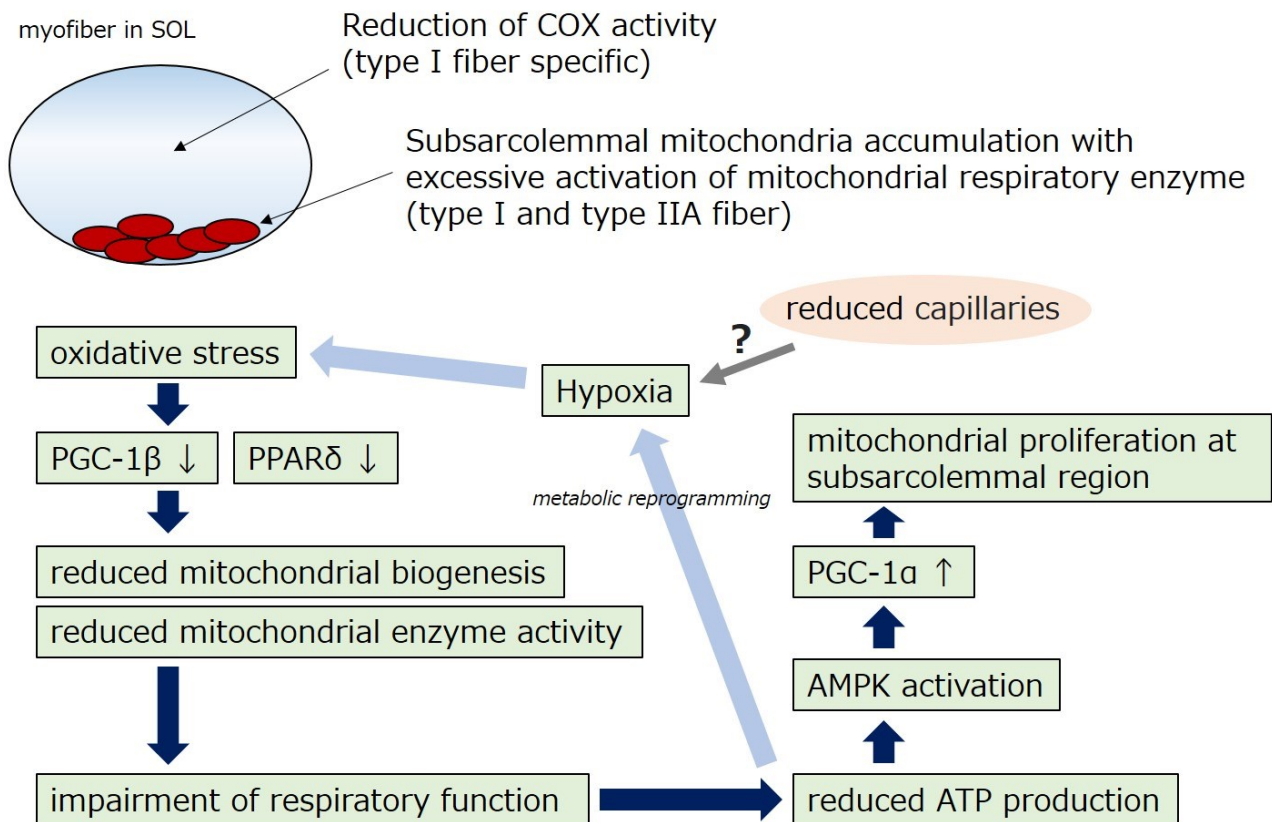


図 16. 老齢マウスの SOL において認められたミトコンドリア病態変化に関与する分子メカニズムの仮説

詳細は考察項に記載した。

6. 総括

加齢に伴うミトコンドリア機能の低下や筋蛋白質分解・合成のバランスの変化は、サルコペニア発症における主要な要因の1つとして考えられている。近年の研究から、これらの加齢変化は筋線維タイプ特異性を有する可能性が示唆されている。しかしながら、これまでの多くの先行研究では、筋ホモジネートを用いた解析を主としており、筋線維タイプ単位の筋病態の加齢変化についての知見はほとんど無かった。

そこで本研究では、3つの群（young、middle-aged、old）のマウスを使用し、遅筋優位筋の SOL と速筋優位筋の EDL における、ミトコンドリア呼吸機能および形態の加齢変化を筋線維タイプ単位で解析することで、ミトコンドリア病態の加齢変化とサルコペニアとの関連性を明らかにすることを目的とした。また、E3 ユビキチンリガーゼ MuRF1 発現の加齢変化を筋線維タイプ単位で評価し、加齢に伴う筋線維萎縮と筋蛋白質分解の変化との因果関係についての解析も行った。さらに、SOL と EDL において認められた筋病態変化の背景にあると考えられる分子メカニズムを明らかにするために、ミトコンドリア関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、筋蛋白質分解・合成関連遺伝子の発現の解析を行った。

本研究の結果、以下の点を示した。

- 加齢した SOL において、type I 線維特異的なミトコンドリア呼吸酵素活性（complex I, complex IV）の低下、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体を介した OXPHOS 機能の低下、type I および IIA 線維の subsarcolemmal 領域に局在

したミトコンドリア蓄積の増加、が認められた。これらのミトコンドリア病態変化は、筋重量の減少に先行して顕在化した。筋線維萎縮との明確な相関は認められなかった。

- 加齢した SOL において認められたミトコンドリア蓄積像は、細胞内のミトコンドリア局在およびミトコンドリア呼吸酵素活性染色パターンの違いから、従来から知られている RRFs とは異なる病理所見であることを明らかにした。
- 加齢した SOL において、酸化ストレスおよび低酸素マーカー遺伝子群の発現上昇を認め、低酸素状態が関与した酸化ストレスの蓄積が、ミトコンドリア病態の変化に関連している可能性を示した。
- EDL においては、SOL において認められたような加齢に伴うミトコンドリア病態の顕著な変化は認められなかった。
- 加齢した EDL において、MuRF1 をはじめとする E3 ユビキチンリガーゼの遺伝子発現上昇および、type IIX と IIB 線維における MuRF1 蛋白質発現上昇を認めた。加齢した SOL においては、MuRF1 などの蛋白質分解関連遺伝子の明確な発現変化は認められなかった一方で、筋蛋白質合成の指標である IGF1 mRNA 発現の減少が認められた。

以上の結果から、加齢に伴うミトコンドリア病態の変化は、筋線維の萎縮を誘導するというよりはむしろ、筋の酸化的代謝機能の低下など筋の質的な変化に関与することが示された。また、EDL における筋線維の萎縮に対しては、type IIB 線維における MuRF1 発現上昇を介した筋蛋白質分解の亢進の関与が考えられ、SOL における筋線維の萎縮に対しては、IGF1 発現減少を介した筋蛋白質合成シグナル低下の関与が考えられた。

本研究では、サルコペニアの発症メカニズムの更なる解明に向けて重要な結果を得た。サルコペニアは、筋線維タイプ単位で発症メカニズムが異なることが示され、予想以上に複雑なメカニズムが存在している可能性がある。今後、各筋線維タイプ単位でサルコペニアのメカニズムを解明することは、これまでに報告されていないような新たなサルコペニアの治療標的の発見につながる可能性があるため、更なる研究が必要である。加えて、本研究の結果は、サルコペニア動物モデルにおける筋の質的変化としての病理学的な所見として、有用な指標になると考えられた。

最後に、本研究で得られた知見が、更なるサルコペニアの基礎研究の発展と新規の創薬研究の創出の一助になれば幸いである。

7. 参考文献

- [1] T.J. Doherty, Invited review: Aging and sarcopenia, *J. Appl. Physiol.* 95 (2003) 1717–1727.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00347.2003>.
- [2] T. Hida, N. Ishiguro, H. Shimokata, Y. Sakai, Y. Matsui, M. Takemura, Y. Terabe, A. Harada, High prevalence of sarcopenia and reduced leg muscle mass in Japanese patients immediately after a hip fracture, *Geriatr. Gerontol. Int.* 13 (2013) 413–420.
<https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2012.00918.x>.
- [3] T. Lang, T. Streeper, P. Cawthon, K. Baldwin, D.R. Taaffe, T.B. Harris, Sarcopenia: Etiology, clinical consequences, intervention, and assessment, *Osteoporos. Int.* 21 (2010) 543–559. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1059-y>.
- [4] L. Larsson, H. Degens, M. Li, L. Salviati, Y. Il Lee, W. Thompson, J.L. Kirkland, M. Sandri, Sarcopenia: Aging-related loss of muscle mass and function, *Physiol. Rev.* 99 (2019) 427–511.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017>.
- [5] E. Roh, K.M. Choi, Health Consequences of Sarcopenic Obesity: A Narrative Review, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 11 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00332>.
- [6] Y. Ogawa, Y. Kaneko, T. Sato, S. Shimizu, H. Kanetaka, H. Hanyu, Sarcopenia and muscle functions at various stages of alzheimer disease, *Front. Neurol.* 9 (2018) 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00710>.

- [7] N. Chargi, S.I. Bril, M.H. Emmelot-Vonk, R. de Bree, Sarcopenia is a prognostic factor for overall survival in elderly patients with head-and-neck cancer, *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*. 276 (2019) 1475–1486.
<https://doi.org/10.1007/s00405-019-05361-4>.
- [8] A.J. Cruz-Jentoft, G. Bahat, J. Bauer, Y. Boirie, O. Bruyère, T. Cederholm, C. Cooper, F. Landi, Y. Rolland, A.A. Sayer, S.M. Schneider, C.C. Sieber, E. Topinkova, M. Vandewoude, M. Visser, M. Zamboni, I. Bautmans, J.P. Baeyens, M. Cesari, A. Cherubini, J. Kanis, M. Maggio, F. Martin, J.P. Michel, K. Pitkala, J.Y. Reginster, R. Rizzoli, D. Sánchez-Rodríguez, J. Schols, Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis, *Age Ageing*. 48 (2019) 16–31.
<https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>.
- [9] S.B. Heymsfield, M.C. Gonzalez, J. Lu, G. Jia, J. Zheng, Skeletal muscle mass and quality: Evolution of modern measurement concepts in the context of sarcopenia, *Proc. Nutr. Soc.* 74 (2015) 355–366. <https://doi.org/10.1017/S0029665115000129>.
- [10] M.A.A. Mahdy, Skeletal muscle fibrosis: an overview, *Cell Tissue Res.* 375 (2019) 575–588.
<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2955-2>.
- [11] G. Gousspillou, R.T. Hepple, Editorial: Mitochondria in Skeletal muscle health, aging and diseases, *Front. Physiol.* 7 (2016) 10–13.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00446>.
- [12] S.T. Ahmed, L. Craven, O.M. Russell, D.M. Turnbull, A.E.

Vincent, *Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies, Neurotherapeutics*. 15 (2018) 943–953.

<https://doi.org/10.1007/s13311-018-00674-4>.

- [13] S. Dimauro, E.A. Schon, *Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases*, (2003) 2656–2668.
- [14] D.Y. Seo, S.R. Lee, N. Kim, K.S. Ko, B.D. Rhee, J. Han, *Age-related changes in skeletal muscle mitochondria: the role of exercise*, *Integr. Med. Res.* 5 (2016) 182–186.
<https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.07.003>.
- [15] T. Wenz, S.G. Rossi, R.L. Rotundo, B.M. Spiegelman, C.T. Moraes, *Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 20405–20410.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911570106>.
- [16] C. Ibebunjo, J.M. Chick, T. Kendall, J.K. Eash, C. Li, Y. Zhang, C. Vickers, Z. Wu, B.A. Clarke, J. Shi, J. Cruz, B. Fournier, S. Brachat, S. Gutzwiller, Q. Ma, J. Markovits, M. Broome, M. Steinkrauss, E. Skuba, J.-R. Galarneau, S.P. Gygi, D.J. Glass, *Genomic and Proteomic Profiling Reveals Reduced Mitochondrial Function and Disruption of the Neuromuscular Junction Driving Rat Sarcopenia*, *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 194–212.
<https://doi.org/10.1128/mcb.01036-12>.
- [17] M. Picard, D. Ritchie, M.M. Thomas, K.J. Wright, R.T. Hepple, *Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy*

between muscles, *Aging Cell*. 10 (2011) 1047–1055.

<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x>.

- [18] S.E. Kruse, P.P. Karunadharma, N. Basisty, R. Johnson, R.P. Beyer, M.J. Maccoss, P.S. Rabinovitch, D.J. Marcinek, Age modifies respiratory complex I and protein homeostasis in a muscle type-specific manner, *Aging Cell*. 15 (2016) 89–99.
<https://doi.org/10.1111/accel.12412>.
- [19] E.A. Bua, S.H. McKiernan, J. Wanagat, D. McKenzie, J.M. Aiken, Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia, *J. Appl. Physiol*. 92 (2002) 2617–2624.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01102.2001>.
- [20] J. WANAGAT, Z. CAO, P. PATHARE, J.M. AIKEN, Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia, *FASEB J*. 15 (2001) 322–332. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0320com>.
- [21] A. del Campo, I. Contreras-Hernández, M. Castro-Sepúlveda, C.A. Campos, R. Figueroa, M.F. Tevy, V. Eisner, M. Casas, E. Jaimovich, Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice, *Aging (Albany, NY)*. 10 (2018) 34–55. <https://doi.org/10.18632/aging.101358>.
- [22] J.P. Leduc-Gaudet, M. Picard, F.S.J. Pelletier, N. Sgarioto, M.J. Auger, J. Vallée, R. Robitaille, D.H. St-Pierre, G. Gouspillou, Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice, *Oncotarget*. 6 (2015) 17923–17937.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4235>.

- [23] B. Chabi, V. Ljubicic, K.J. Menzies, J.H. Huang, A. Saleem, D.A. Hood, Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle, *Aging Cell*. 7 (2008) 2–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x>.
- [24] A.J. Santanasto, N.W. Glynn, S.A. Jubrias, K.E. Conley, R.M. Boudreau, F. Amati, D.C. Mackey, E.M. Simonsick, E.S. Strotmeyer, P.M. Coen, B.H. Goodpaster, A.B. Newman, Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Fatigability in Older Adults, *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 70 (2015) 1379–1385. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu134>.
- [25] A. Safdar, M.J. Hamadeh, J.J. Kaczor, S. Raha, J. deBeer, M.A. Tarnopolsky, Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults, *PLoS One*. 5 (2010) 31–33.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010778>.
- [26] P.M. Coen, S.A. Jubrias, G. Distefano, F. Amati, D.C. Mackey, N.W. Glynn, T.M. Manini, S.E. Wohlgemuth, C. Leeuwenburgh, S.R. Cummings, A.B. Newman, L. Ferrucci, F.G.S. Toledo, E. Shankland, K.E. Conley, B.H. Goodpaster, Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults, *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 68 (2013) 447–455.
<https://doi.org/10.1093/gerona/gls196>.
- [27] K.R. Short, M.L. Bigelow, J. Kahl, R. Singh, J. Coenen-Schimke, S. Raghavakaimal, K.S. Nair, Decline in skeletal muscle

mitochondrial function with aging in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5618–5623.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0501559102>.

[28] P.M. Coen, R. V. Musci, J.M. Hinkley, B.F. Miller, Mitochondria as a target for mitigating sarcopenia, *Front. Physiol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01883>.

[29] S.L. Rowan, F.M. Purves-Smith, N.M. Solbak, R.T. Hepple, Accumulation of severely atrophic myofibers marks the acceleration of sarcopenia in slow and fast twitch muscles, *Exp. Gerontol.* 46 (2011) 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.03.005>.

[30] V. de O.N. Teixeira, L.I. Filippin, R.M. Xavier, Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia, *Rev. Bras. Reumatol.* 52 (2012) 247–253. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042012000200009>.

[31] R.D. Barclay, N.A. Burd, C. Tyler, N.A. Tillin, R.W. Mackenzie, The Role of the IGF-1 Signaling Cascade in Muscle Protein Synthesis and Anabolic Resistance in Aging Skeletal Muscle, *Front. Nutr.* 6 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00146>.

[32] M. Gaugler, A. Brown, E. Merrell, M. DiSanto-Rose, J.A. Rathmacher, T.H. Reynolds IV, PKB signaling and atrogene expression in skeletal muscle of aged mice, *J. Appl. Physiol.* 111 (2011) 192–199. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00175.2011>.

[33] S. Clavel, A.S. Coldefy, E. Kurkdjian, J. Salles, I. Margaritis,

- B. Derijard, Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle, *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 794–801.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.07.005>.
- [34] S. Schiaffino, C. Reggiani, Fiber types in Mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1447–1531.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.
- [35] D. Bloemberg, J. Quadrilatero, Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis, *PLoS One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>.
- [36] S. Murakami, H. Fujinoc, I. Takeda, R. Momota, K. Kumagishi, A. Ohtsuka, Comparison of capillary architecture between slow and fast muscles in rats using a confocal laser scanning microscope, *Acta Med. Okayama.* 64 (2010) 11–18.
<https://doi.org/10.18926/AMO/32859>.
- [37] G.R. Scott, T.S. Elogio, M.A. Lui, J.F. Storz, Z.A. Cheviron, Adaptive Modifications of Muscle Phenotype in High-Altitude Deer Mice Are Associated with Evolved Changes in Gene Regulation, *Mol. Biol. Evol.* 32 (2015) 1962–1976.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msv076>.
- [38] C.A. Goodman, J.A. Kotecki, B.L. Jacobs, T.A. Hornberger, Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis, *PLoS One.* 7 (2012).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037890>.

- [39] P. Mishra, G. Varuzhanyan, A.H. Pham, D.C. Chan, Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization, *Cell Metab.* 22 (2015) 1033–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.027>.
- [40] R.J. Chai, J. Vukovic, S. Dunlop, M.D. Grounds, T. Shavlakadze, Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle, *PLoS One.* 6 (2011).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028090>.
- [41] P.W. Sheard, R.D. Anderson, Age-related loss of muscle fibres is highly variable amongst mouse skeletal muscles, *Biogerontology.* 13 (2012) 157–167.
<https://doi.org/10.1007/s10522-011-9365-0>.
- [42] J.M. Bourgeois, M.A. Tarnopolsky, Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders, *Mitochondrion.* 4 (2004) 441–452.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.036>.
- [43] A. V. Kuznetsov, V. Veksler, F.N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter, W.S. Kunz, Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 965–976.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>.
- [44] M.R. Deschenes, M.A. Roby, M.K. Eason, M.B. Harris, Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers, *Exp. Gerontol.* 45 (2010) 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>.

- [45] J. A. Kouyoumdjian, C. R. Graça, V. F. M. Ferreira, Quantitation of muscle pathology abnormalities in 18 patients with mitochondrial disorders, *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 54 (2018) 325–332. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20180054>.
- [46] C. J. Lelliott, G. Medina-Gomez, N. Petrovic, A. Kis, H. M. Feldmann, M. Bjursell, N. Parker, K. Curtis, M. Campbell, P. Hu, D. Zhang, S. E. Litwin, V. G. Zaha, K. T. Fountain, S. Boudina, M. Jimenez-Linan, M. Blount, M. Lopez, A. Meirhaeghe, M. Bohlooly-Y, L. Storlien, M. Strömstedt, M. Snaith, M. Orešič, E. D. Abel, B. Cannon, A. Vidal-Puig, Ablation of PGC-1 β results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance, *PLoS Biol.* 4 (2006) 2042–2056. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040369>.
- [47] Y. X. Wang, C. L. Zhang, R. T. Yu, H. K. Cho, M. C. Nelson, C. R. Bayuga-Ocampo, J. Ham, H. Kang, R. M. Evans, Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ , *PLoS Biol.* 2 (2004). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020294>.
- [48] S. Jäer, C. Handschin, J. St-Pierre, B. M. Spiegelman, AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12017–12022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>.
- [49] C. Cantó, J. Auwerx, PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure, *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2009) 98–105.

<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0a4>.

- [50] P. Mishra, D.C. Chan, Metabolic regulation of mitochondrial dynamics, *J. Cell Biol.* 212 (2016) 379–387.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>.
- [51] L. Pernas, L. Scorrano, Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function, *Annu. Rev. Physiol.* 78 (2016) 505–531.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011>.
- [52] H. Chen, M. Vermulst, Y.E. Wang, A. Chomyn, T.A. Prolla, J.M. McCaffery, D.C. Chan, Mitochondrial fusion is required for mtdna stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations, *Cell.* 141 (2010) 280–289.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.026>.
- [53] M.J. Gomes, P.F. Martinez, L.U. Pagan, R.L. Damatto, M.D.M. Cezar, A.R.R. Lima, K. Okoshi, M.P. Okoshi, Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise, *Oncotarget.* 8 (2017) 20428–20440.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14670>.
- [54] G.K. Sakellariou, T. Pearson, A.P. Lightfoot, G.A. Nye, N. Wells, I.I. Giakoumaki, A. Vasilaki, R.D. Griffiths, M.J. Jackson, A. McArdle, Mitochondrial ROS regulate oxidative damage and mitophagy but not age-related muscle fiber atrophy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep33944>.
- [55] E.J. Yeo, Hypoxia and aging, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>.

- [56] L. Schito, S. Rey, Cell-Autonomous Metabolic Reprogramming in Hypoxia, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 128–142.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.006>.
- [57] A.K. Fjällström, K. Evertsson, M. Norrby, S. Tågerud, Forkhead box O1 and muscle RING finger 1 protein expression in atrophic and hypertrophic denervated mouse skeletal muscle, *J. Mol. Signal.* 9 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-9-9>.
- [58] Y. Kamei, S. Miura, M. Suzuki, Y. Kai, J. Mizukami, T. Taniguchi, K. Mochida, T. Hata, J. Matsuda, H. Aburatani, I. Nishino, O. Ezaki, 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.* 279 (2004) 41114–41123.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400674200>.
- [59] F. Ascenzi, L. Barberi, G. Dobrowolny, A. Villa Nova Bacurau, C. Nicoletti, E. Rizzuto, N. Rosenthal, B.M. Scicchitano, A. Musarò, Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia, *Aging Cell.* 18 (2019).
<https://doi.org/10.1111/accel.12954>.
- [60] J.H. Kwon, K.M. Moon, K.-W. Min, Exercise-Induced Myokines can Explain the Importance of Physical Activity in the Elderly: An Overview, *Healthcare.* 8 (2020) 378.
<https://doi.org/10.3390/healthcare8040378>.
- [61] D.S. Lin, S.H. Kao, C.S. Ho, Y.H. Wei, P.L. Hung, M.H. Hsu, T.Y. Wu, T.J. Wang, Y.R. Jian, T.H. Lee, M.F. Chiang, Inflexibility

of AMPK-mediated metabolic reprogramming in mitochondrial disease, *Oncotarget*. 8 (2017) 73627–73639.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20617>.

- [62] J. Lin, C. Handschin, B.M. Spiegelman, Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators, *Cell Metab*. 1 (2005) 361–370.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>.

- [63] T. Kadoguchi, K. Shimada, T. Miyazaki, K. Kitamura, M. Kunimoto, T. Aikawa, Y. Sugita, S. Ouchi, T. Shiozawa, M. Yokoyama-Nishitani, K. Fukao, K. Miyosawa, K. Isoda, H. Daida, Promotion of oxidative stress is associated with mitochondrial dysfunction and muscle atrophy in aging mice, *Geriatr. Gerontol. Int*. 20 (2020) 78–84. <https://doi.org/10.1111/ggi.13818>.

- [64] W. Fan, W. Waizenegger, C.S. Lin, V. Sorrentino, M.X. He, C.E. Wall, H. Li, C. Liddle, R.T. Yu, A.R. Atkins, J. Auwerx, M. Downes, R.M. Evans, PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose, *Cell Metab*. 25 (2017) 1186–1193.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.006>.

- [65] A. García-Sánchez, A.G. Miranda-Díaz, E.G. Cardona-Muñoz, The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- And Antioxidant Properties in Chronic Diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2020 (2020).

<https://doi.org/10.1155/2020/2082145>.

- [66] O. Rothfuss, T. Gasser, N. Patenge, Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run

- real-time PCR approach, *Nucleic Acids Res.* 38 (2009).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1082>.
- [67] A. Hiona, C. Leeuwenburgh, The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia, *Exp. Gerontol.* 43 (2008) 24–33.
- [68] M. Miranda-Galvis, Y. Teng, Targeting hypoxia-driven metabolic reprogramming to constrain tumor progression and metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155487>.
- [69] C. V. Dang, Links between metabolism and cancer, *Genes Dev.* 26 (2012) 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>.
- [70] H. Harada, Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance, *J. Radiat. Res.* 57 (2016) i99–i105. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw012>.
- [71] T.D. Jeppesen, M.C. Orngreen, G. Van Hall, J. Vissing, Lactate metabolism during exercise in patients with mitochondrial myopathy, *Neuromuscul. Disord.* 23 (2013) 629–636.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.05.007>.
- [72] B. Glancy, L.Y. Hsu, L. Dao, M. Bakalar, S. French, D.J. Chess, J.L. Taylor, M. Picard, A. Aponte, M.P. Daniels, S. Esfahani, S. Cushman, R.S. Balaban, In Vivo microscopy reveals extensive embedding of capillaries within the sarcolemma of skeletal muscle fibers, *Microcirculation.* 21 (2014) 131–147.
<https://doi.org/10.1111/micc.12098>.
- [73] B. Glancy, L.M. Hartnell, D. Malide, Z.X. Yu, C.A. Combs, P.S.

- Connelly, S. Subramaniam, R.S. Balaban, Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle, *Nature*. 523 (2015) 617–620. <https://doi.org/10.1038/nature14614>.
- [74] M. Mohiuddin, N.H. Lee, J.Y. Moon, W.M. Han, S.E. Anderson, J.J. Choi, E. Shin, S.A. Nakhai, T. Tran, B. Aliya, D.Y. Kim, A. Gerold, L.M. Hansen, W.R. Taylor, Y.C. Jang, Critical Limb Ischemia Induces Remodeling of Skeletal Muscle Motor Unit, Myonuclear-, and Mitochondrial-Domains, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45923-4>.
- [75] T.E. Ryan, D.J. Yamaguchi, C.A. Schmidt, T.N. Zeczycki, S.R. Shaikh, P. Brophy, T.D. Green, M.D. Tarpey, R. Karnekar, E.J. Goldberg, G.C. Sparagna, M.J. Torres, B.H. Annex, P.D. Neuffer, E.E. Spangenburg, J.M. McClung, Extensive skeletal muscle cell mitochondriopathy distinguishes critical limb ischemia patients from claudicants, *JCI Insight*. 3 (2018). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123235>.
- [76] C.R. Hart, G. Layec, J.D. Trinity, Y. Le Fur, J.R. Gifford, H.L. Clifton, R.S. Richardson, Oxygen availability and skeletal muscle oxidative capacity in patients with peripheral artery disease: Implications from in vivo and in vitro assessments, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 315 (2018) H897–H909. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00641.2017>.
- [77] C.B. Ueta, K.S. Gomes, M.A. Ribeiro, D. Mochly-Rosen, J.C.B. Ferreira, Disruption of mitochondrial quality control in peripheral artery disease: New therapeutic opportunities,

Pharmacol. Res. 115 (2017) 96–106.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.016>.

- [78] W. Kersing, F.G.I. Jennekens, Age-related changes in human thyroarytenoid muscles: A histological and histochemical study, Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology. 261 (2004) 386–392.
<https://doi.org/10.1007/s00405-003-0702-z>.

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究全般にわたり多大なるご指導を頂きました、東京都健康長寿医療センター研究所 自然科学系副所長 老年病態研究チーム 研究部長 東京農工大学 客員教授 重本和宏先生ならびに、当研究所 老年病態研究チーム 森秀一先生に深く御礼申し上げます。

動物実験に関して、東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム 研究員 大村卓也先生ならびに、動物実験施設 研究助手 野田義博先生に多大なるご協力を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

High-resolution respirometer を用いた骨格筋の呼吸機能測定実験に関して、実験手技をはじめ有用なご助言を賜りました、東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 研究副部長 大澤郁朗先生ならびに、研究員 藤田泰典先生に深く御礼申し上げます。

本論文の審査をして頂き有用なご助言とご指導を賜りました、東京農工大学 農学研究院応用生命化学部門 教授 西河淳先生、茨城大学 農学部 食生命科学科 教授 上妻由章先生、宇都宮大学 農学部 応用生命科学科 教授 蕪山由己人 教授、東京都健康長寿医療センター研究所 分子機構研究チーム 研究副部長 東京農工大学 客員准教授 萬谷博先生に深く御礼申し上げます。

本論文が完成するまでに、ご協力およびご指導頂きました皆様方に、心より感謝、御礼申し上げます。