

## 論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋における Akt の役割の解明

氏名 梅原 敏弘

今回、骨格筋における主要な Akt アイソフォームである Akt1 と Akt2 を骨格筋特異的に欠損したマウス(MLC1F-DKO)を作成し解析を行った。本研究においては、長期間にわたり MLC1F-DKO マウスの表現型を検討することができ、その結果、インスリン・IGF-1 シグナルの減弱した骨格筋が骨格筋自身や全身に及ぼす影響を検討することができた。

そもそも、インスリン依存的な末梢での糖取り込みの約 80%が骨格筋で行われているとされており、骨格筋は糖代謝において主要な臓器であると考えられる。本研究以前にも、インスリンシグナルを筋肉においてノックアウトしたマウスの報告がいくつか行われている。たとえば、インスリン受容体遺伝子を筋肉組織(心筋・骨格筋)で特異的にノックアウトした MIRKO マウスの報告が行われている。このマウスでは、95%程度のインスリン受容体発現を欠損させたにも関わらず糖代謝への影響ははっきりとは認められなかった。また、その他にも、筋肉組織特異的な IRS1/2 や PDK1 のノックアウトマウスが作成されているが、新生仔致死が認められ、糖代謝の表現型を十分に観察することができなかった。本研究においては、インスリン・IGF-1 シグナルを減弱させたマウスを長期間にわたり観察し、後述のように、高週齢において全身の耐糖能異常を呈した結果は、意義深いものであると考えられる。

MLC1F-DKO マウスの表現型の解析を行う前に、Akt の遺伝子発現について検討を行っている。定量的 RT-PCR と、ウエスタンブロットにより、MLC1F-DKO において、骨格筋特異的に Akt1、Akt2 の発現が抑制されていることを確認した。様々なタイプの骨格筋に対して、ウエスタンブロットでタンパク質の発現を確認したが、大腿四頭筋、前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、ヒラメ筋、において、Akt 量が 13~23%程度にまで低下していることが確認できた。さらに、インスリン静注後のインスリンシグナルをウエスタンブロットにより確認し、Akt より下流のシグナルも減弱していることを確認した。これらのシグナルは、8 週齢の時点で既に減弱しており、32 週齢でも引き続き減弱していることを確認した。

MLC1F-DKO の体重や、体組成の変化について調べた。体重に関しては 6 週齢より測定を開始し、32 週齢まで観察を行った。全経過中、MLC1F-DKO マウスでは、コントロールマウスに比べて 1.7~2.9g 程度の体重増加不良を認めた。体重増加不良の原因組織を確認す

るために、CTにより下腿の筋肉量の評価を行った。8週齢の時点ですでに、MLC1F-DKO マウスでは、コントロールマウスに比べて 29%の低下を認めていた。一方、脂肪組織量に関しては、DEXAにより評価を行い、全週齢にわたり MLC1F-DKO マウスでコントロールマウスより多いことが確認された。特に 24 週齢より統計学的に有意な差を認め、その差は週齢が経つに従って増大する傾向にあった。

さらに、組織学的な検討では、MLC1F-DKO マウスの筋細胞のサイズの縮小を認めた。32 週齢においては、コントロールマウスに比べて、断面積は、平均で 37%にまで縮小していた。このような筋細胞のサイズの縮小が、筋量の低下に寄与しているものと考えられた。また、32 週齢の組織では線維化が起きていることも確認された。

MLC1F-DKO マウスの耐糖能の変化を、IpGTT(腹腔内ブドウ糖負荷試験)や、ITT(インスリン負荷試験)により調べた。前述のように骨格筋におけるインスリンシグナルが減弱しているにも関わらず、8 週齢の時点では、ITT・IpGTT 共に、コントロールマウスと MLC1F-DKO マウスの間に耐糖能の差を認めなかった。しかし 24 週齢以降の ITT や、32 週齢の IpGTT において MLC1F-DKO に有意な耐糖能の悪化を認めた。インスリン分泌に差はなく、インスリン抵抗性主体の耐糖能異常と考えられた。次に、末梢での耐糖能異常の原因が骨格筋にあることを確かめるために、単離した骨格筋線維への 2-デオキシグルコースの取込み量を測定し、インスリン依存的な糖取り込みの能力を確認した。この結果も ITT・IpGTT と同様に、8 週齢ではコントロールに比較して MLC1F-DKO では有意な差は認めず、32 週齢において MLC1F-DKO の糖取り込みの低下を認めた。つまり、MLC1F-DKO マウスにおいて、加齢に伴うインスリン依存的な骨格筋の糖取り込みの悪化が通常よりも進行しており、それが全身の耐糖能異常に寄与しているものと考えられた。

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

MLC1F-DKO マウスの骨格筋における ATP 含量は、コントロールマウスと比較して、加齢に伴い減少を認めた。さらに、骨格筋中性脂肪含量に関しても、高週齢では MLC1F-DKO マウスで増加を認めたミトコンドリア機能として重要な脂肪酸  $\beta$  酸化に関連する遺伝子発現を評価したところ、PPAR  $\alpha$ 、ACS、CPT1b、CPT2 の発現量の低下を認めた。これらの結果から、MLC1F-DKO マウスにおいては、コントロールマウスに比べミトコンドリア機能が低下している可能性が示唆された。

さらに、MLC1F-DKO の骨格筋では、ミトコンドリア DNA の複製や転写に関わる Nrf1 や、mtTFA といった遺伝子の発現量の低下を認めた。これらの変化は、特に 16 週齢以降で顕著になり、共に 50%程度に発現が抑制されていた。さらに、ミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たすことが報告されている Mitofusion に関わる遺伝子も、MLC1F-DKO マウスにおいては、コントロールに比較して、30~40%程度に発現が抑制されていた。さらに、酸化ストレスを軽減する働きをする、catalase や sod2 に関しては、8 週齢の段階よりそれぞれ、60%程度に低下していた。これらのミトコンドリア機能維持に関わる遺伝子発現が低下していることも、ミトコンドリア機能低下の可能性を示唆するものと考えられた。

また、C57BL/6 マウスの 8 週齢と 55 週齢を比較し、加齢変化における Akt 活性について検討した。8 週齢・55 週齢のマウスに対してインスリンを静注後 15 分の骨格筋のリン酸化を確認したところ、Akt 活性は、8 週齢に比較して 55 週齢で 60%程度に低下していた。また、Akt より下流へのインスリンシグナルの抑制も確認された。続いて、MLC1F-DKO マウスの実験と同様に、骨格筋の遺伝子発現を確認したところ、ミトコンドリアに関連する遺伝子や、 $\beta$  酸化に関連する遺伝子発現は、8 週齢に比較して 55 週齢で低下を認めていた。

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

本研究の結果は高齢者に認められる骨格筋のインスリン抵抗性や、骨格筋量の低下が、骨格筋自身や全身に及ぼす影響を考えるうえで重要であると考えられ、高齢者の健康寿命改善に役立つものであるものとする。