

# 身体的不活動時における PGC-1 $\alpha$ の発現量維持が 筋萎縮の進行に及ぼす影響

岡本 武志\*

(受付 2017 年 10 月 7 日)

(受理 2017 年 11 月 25 日)

PGC-1 $\alpha$  expression does not change in response to immobilization-induced atrophy of fast and slow muscles of mice

by  
Takeshi OKAMOTO\*

## Abstract

In many catabolic conditions, including fasting, cancer, diabetes, the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) is reduced. However, there are no available data on whether the expression kinetics of PGC-1 $\alpha$  is muscle fiber specific in response to immobilization-induced muscle atrophy. We tested the hypothesis that long-term immobilization would reduce PGC-1 $\alpha$  expression in both oxidative (slow-twitch) and glycolytic (fast-twitch) muscles. Male C57BL/6 mice were subjected to hindlimb immobilization. Basal PGC-1 $\alpha$  protein and mRNA in the slow-twitch soleus was markedly higher than that in the fast-twitch plantaris muscles. Unexpectedly, PGC-1 $\alpha$  protein and mRNA expression did not decrease following immobilization in both muscles. In addition, PGC-1 $\alpha$  protein expression positively correlated with the atrophied muscle mass only in soleus muscle at late stage of immobilization. These data suggest that PGC-1 $\alpha$  content may be a key mediator controlling muscle mass following immobilization.

**Keywords :** PGC-1 $\alpha$ , immobilization, skeletal muscle atrophy

## 1. 緒言

近年、ミトコンドリア新生および遅筋の形成などのマスター調節遺伝子として知られている転写補助因子 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )<sup>1)</sup> は、フォークヘッドタンパク (forkhead box O; FOXO) の転写活性を抑制することにより筋萎縮を抑制することが報告されている<sup>2)</sup>。Sandri et al.<sup>2)</sup>は、トランスジェニックマウスや遺伝子導入法によって骨格筋内において PGC-1 $\alpha$  を過剰に発現させた場合、除神経、絶食、FOXO3a の過剰発現による筋萎縮を抑制できることを報告している。また、彼らは、PGC-1 $\alpha$  の過剰発現により筋特異的ユビキチンリガーゼ (E3) 遺伝子の発現、オートファジー関連遺伝子の発現が抑制されることも示している<sup>2)</sup>。そして、PGC-1 $\alpha$  は、糖尿病、尿毒症、ガンによる悪液質、慢性心臓病など速筋線維優位に萎縮する様々なモデルにおいて、遺伝子およびタンパク質の両方で発現が低下することが報告されている<sup>2), 3)</sup>。さらに、ギブ

ス固定や尾部懸垂といった身体的不活動状態においても PGC-1 $\alpha$  の発現量が低下することが報告されている<sup>4)-7)</sup>。しかしながら、不活動による筋萎縮に伴う内因性 PGC-1 $\alpha$  の発現量低下が、筋萎縮の進行に寄与するか、また、FOXO 転写活性の抑制効果と関連するかについてはこれまでに明らかにされていない。

そこで、本研究では不活動に伴う筋萎縮時において PGC-1 $\alpha$  の発現応答が筋萎縮の進行に寄与するか否かを明らかにすることを目的とし、PGC-1 $\alpha$  の発現が顕著なヒラメ筋 (遅筋) およびその半量の発現を示す足底筋 (速筋) を用いて、PGC-1 $\alpha$  遺伝子およびタンパク質の発現量、PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と筋萎縮度および PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と FOXO の活性 (リン酸化状態) の相関関係について検討した。

## 2. 方法

### 〈2・1〉 実験動物

実験には 11 週齢の C57BL/6 雄性マウス (n=16) (日本 SLC) を用いた。飼育環境へ適応させるために実験開始前の 1 週間を予備飼育期間とした。実験期間中、12 時間の明暗サイクルの照明下で飼育し、餌 (MF, オリエンタル酵母工業) と水 (水道水) は自由摂取とした。本研究における全ての実験は、東海大学実験動物委員会の倫理的要件を順守して行われた。

### 〈2・2〉 ギプス固定法

マウス下肢へのギプス固定処置は、ジエチルエーテル麻酔下によって弛緩した状態にて、両下肢を足関節底屈位にし、キャストリングテープ (Scotchcast™ Plus-J, 3M Health Care) を用いて行った。この時、Machida & Booth<sup>8)</sup>の方法に基づいて、足関節 30° 屈曲位、膝関節 75° 屈曲位になるよう固定処置を行った。装着したキャストリングテープの重さは約 3.0g であった。固定処置後、1 ケージにつき 2 匹ずつ飼育した。なお、マウスは前肢にてケージ内を移動でき、餌および水の摂取に不自由がないことを確認した。マウスの齧破によってキャストリングテープが損傷を受けていないか毎日観察し、必要に応じて再度ギプステープの巻き直し、または補強によって対処した。ギプス固定の期間は、7 日間 (n=4)、14 日間 (n=4)、21 日間 (n=4) とした。コントロールには、ギプス固定前 (ギプス固定 0 日間, n=4) の群を用いた。

実験期間終了後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) にて、左右下肢のヒラメ筋 (SOL)、足底筋 (PLA) を摘出し、湿重量を測定した。左右の筋サンプルの湿重量の平均値を算出し、筋重量として用いた。本研究で用いたギプス固定により、不活動 21 日目において SOL (-34.3%) および PLA (-31.4%) 共に有意な筋重量の低下が生じていることが確認されている<sup>9)</sup>。左右下肢のうち片方の脚の筋サンプルは Total RNA 抽出に用い、もう一方の脚の筋サンプルはタンパク質抽出または組織切片作成に用いた。Total RNA およびタンパク質抽出に用いるサンプルは、湿重量測定後、直ちに液体窒素にて急速凍結し、分析を行うまで -80°C にて保存した。また、免疫組織染色に用いるサンプルは、組織切片作成用に凍結ブロックを作成し、イソペンタン中で急速凍結し、分析まで -80°C にて保存した。

### 〈2・3〉 Total RNA 抽出

摘出した SOL および PLA を 1ml の TRIzol (Invitrogen Japan) 中にて、ホモジナイザー (PRO200 Homogenizer, PRO Scientific) を用いて均質化した。5 分間室温で放置した後に、0.2 ml のクロロホルムを加え、15 秒間かけて混和し、2 - 3 分間室温にて放置した後に、遠心分離機 (Eppendorf, Centrifuge 5417R) により遠心分離 (4°C, 15 分間, 14,000 g) を行った。遠心分離によって得られた上清 (約 0.5 ml) を別のチューブに移し、微量試料での

RNA 回収率低下を防ぐために 2  $\mu$ l のグリコーゲンを加えた。さらに、0.5 ml のイソプロパノールを加え、10 分間室温にて放置した後、遠心分離 (4°C, 30 分間, 20,000 g) し、Total RNA を沈殿させた。上清を取り除き、1 ml の 75% エタノールを加え沈殿を洗浄し、続けて遠心分離 (4°C, 5 分間, 20,000 g) を行った。Total RNA のペレットを室温で 5 分間乾燥させた後、RNase free 水に溶解した。ゲノム DNA を除去するために、DNase (Invitrogen Japan) による処理を行った。分光光度計にて吸光度を測定し、260 nm と 280 nm の吸光度比から Total RNA の純度を確認した。Total RNA の濃度は 260 nm の吸光度から算出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用して、1 mg の Total RNA から cDNA を合成した。逆転写は、25°C 10 分、37°C 120 分、そして 85°C 5 秒という条件で行った。

### 〈2・4〉 タンパク質抽出

摘出した後 -80°C で保存していた筋を氷冷しながらホモジナイズバッファー [50 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 15 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O, 100 mM beta-glycerophosphate, 25 mM NaF, protease inhibitor (Roche Diagnostics), phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics)] 中にて、ホモジナイザー (PRO200 Homogenizer, PRO Scientific) を用いて均質化し、遠心分離 (4°C, 最大回転数, 30min) 後、上清を回収し、BCA protein assay kit (PIERCE) によりタンパク質濃度を測定した。その後、タンパク質濃度が 1.75 mg/ml となるように、Sodium-Dodecylsulfate (SDS) Sample Buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% b-mercaptoethanol, 0.025% bromphenol blue) を用いて調整し、95°C で 5 分間熱処理を行った。

### 〈2・5〉 Real-time PCR 法

Real-time PCR は、Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて PGC-1 $\alpha$  mRNA について検討した。PCR 反応は、5  $\mu$ l の TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5  $\mu$ l のプライマー・プローブミックス, 4.5  $\mu$ l の cDNA を用いて、全量 10  $\mu$ l にて行った。PCR 反応は、95°C で 10 分間、その後、Denaturation step を 95°C で 15 秒間、annealing/extension step を 63°C で 1 分間を 40 サイクルという条件にて行った。実験結果は、比較 Ct 法 ( $\Delta\Delta$ Ct 法) を用いて定量した。Ct 値 (Threshold Cycle) は、任意の閾値 (Threshold) を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点におけるサイクル数のことを表している。 $\Delta$ Ct 値は、ターゲット遺伝子の Ct 値から内因性リファレンス遺伝子の Ct 値を差し引いて求められる。本研究において、内因性リファレンス遺伝子として 18s rRNA を用いた。ターゲット遺伝子の発現レベルの相対変化 ( $\Delta\Delta$ Ct 値) は、不活動群 (7, 14, 21 日) の  $\Delta$ Ct 値からコントロール群の SOL

における $\Delta$ Ct値を差し引いて求めた。mRNAの発現量は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ によって算出された値を、コントロール群のSOLの値を1となるよう正規化して求めた値である。増幅曲線の傾きに各グループ間で差は認められず、ターゲット遺伝子と内因性リファレンス遺伝子のPCR効率はほぼ等しいことが確認された。Real-time PCRに使用したTaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)は次の通りである：PGC-1 $\alpha$  (Mm01208835)。

#### 〈2・6〉 ウエスタンブロット法

タンパク質 20 $\mu$ g相当量を8%ポリアクリルアミドゲルの各レーンにロードし、分子量に応じて分離後、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。ボンソーS染色液にて染色を行い、Klein et al.<sup>10)</sup>の方法に従って定性的(視覚的)および定量的に評価を行い、ニトロセルロース膜へのタンパク質の転写および各レーンへの等量のロードに問題がないことを確認した。1次抗体には次に示したものを使用した：PGC-1 $\alpha$  (Chemicon International, AB3242), total-FOXO3a (Cell Signaling Technology Japan, #2497S), phospho-Ser253-FOXO3a (Cell Signaling Technology Japan, #9466S)。転写したニトロセルロース膜をTBST (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween)で軽く洗浄し、5%スキムミルク/TBSTにて1時間のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、4°Cで16時間の条件で1次抗体反応を行った。1次抗体は次に示したとおり希釈し使用した：total-FOXO3a (1:1000 in 5% BSA-TBST), phospho-FOXO3a (1:1000 in 5% BSA-TBST), PGC-1 $\alpha$  (1:1000 in 5% milk-TBST)。1次抗体反応終了後、ニトロセルロース膜をTBSTで数回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体 [anti-rabbit IgG (1:2000) (GE Healthcare Japan)] と HRP 標識抗ビオチン抗体 [HRP-linked anti-biotin antibody (1:10000) (Cell Signaling)] をブロッキングバッファーで希釈した溶液中にて1時間の二次抗体反応を行った。二次抗体反応終了後、ニトロセルロース膜をTBSTで数回洗浄し、ECL Plus (GE Healthcare Japan) を用いて発光させた。ECL plusによって増強されたシグナルは、冷却 CCD カメラ [Light-Capture II (AE-6981, ATTO)] によって検出され、画像解析ソフト (CS Analyzer ver 3.0, ATTO) を用いて定量した。定量後、コントロール群のSOLの値を1となるよう正規化した。

#### 〈2・7〉 免疫組織染色

摘出した筋は、凍結ブロックを作製するために、筋腹部が残るようにカットしコルク片の上に垂直に固定し、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結を行い、その後-80°Cに保存した。その後、10 $\mu$ mの切片を作製し、免疫組織染色に用いた。切片を4% paraformaldehyde (PFA) で10分間固定した後、phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) で洗浄した。次に、膜透過性を上げる為に10分間の

0.3% Triton X-100 処理を行った後、非特異的反応を防ぐためにブロッキング溶液 [5% normal goat serum (NGS) /PBS] で1時間インキュベートした。続けて、5%NGS/PBS液にて希釈した一次抗体で2時間の抗体反応を行った。一次抗体には、Type I, IIa, IIb 線維にそれぞれ BA-F8, SC-71, BF-3 (Developmental studies Hybridoma Bank) を用いた。いずれの抗体にも染色されない筋線維を Type II d/x とした。一次抗体の希釈率は次に示す通りである：Type I (BA-F8) 1:25, Type IIa (SC-71) 1:25, Type IIb (BF-F3) 1:25。一次抗体反応後、PBSで洗浄し、次いで5%NGS/PBS液にて希釈した二次抗体で1時間の抗体反応を行った。二次抗体は、Type I (BA-F8) および Type IIa (SC-71) に対しては goat anti-mouse IgG (GE Healthcare) (1:250) を、Type IIb (BF-F3, 1:25) に対しては goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch) (1:100) を用いた。二次抗体の希釈率は次に示す通りである：goat anti-mouse IgG 1:250, goat anti-mouse IgM 1:100。二次抗体反応後、PBSで洗浄し、DAB (3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride) により発色させ、メチルグリーンにより核染色を行い封入した。染色した試料は、光学顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon) に接続されたデジタルカメラで撮影した。

#### 〈2・8〉 統計処理

得られたデータは、全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。等分散性の検定 (Levene's test) の結果に基づいて、適切な検定方法を選択した。不活動に伴う遺伝子およびタンパク質の発現量に関しては、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、下位検定として Dunnett 法による多重比較検討を行った。この時、等分散性が保証されなかった場合には、Kruskal-Wallis の H 検定を行った。Kruskal-Wallis の H 検定において有意差が認められた場合、下位検定として、Mann-Whitney の U 検定で対比較し、有意水準を対比較の総数で除すことによって調整する (Bonferroni の方法による部分順位法) 方法にて検定を行った。PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と筋重量変化、PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と FOXO タンパク質の発現量、PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と phospho-FOXO3a タンパク質の発現量の相関関係についてはピアソンの相関係数の検定を行った。Bonferroni の方法による部分順位法を除いて、全ての検定における有意水準は5%未満とした。

### 3. 結果

#### 〈3・1〉 不活動に伴う筋萎縮時における PGC-1 $\alpha$ 遺伝子およびタンパク質の発現量

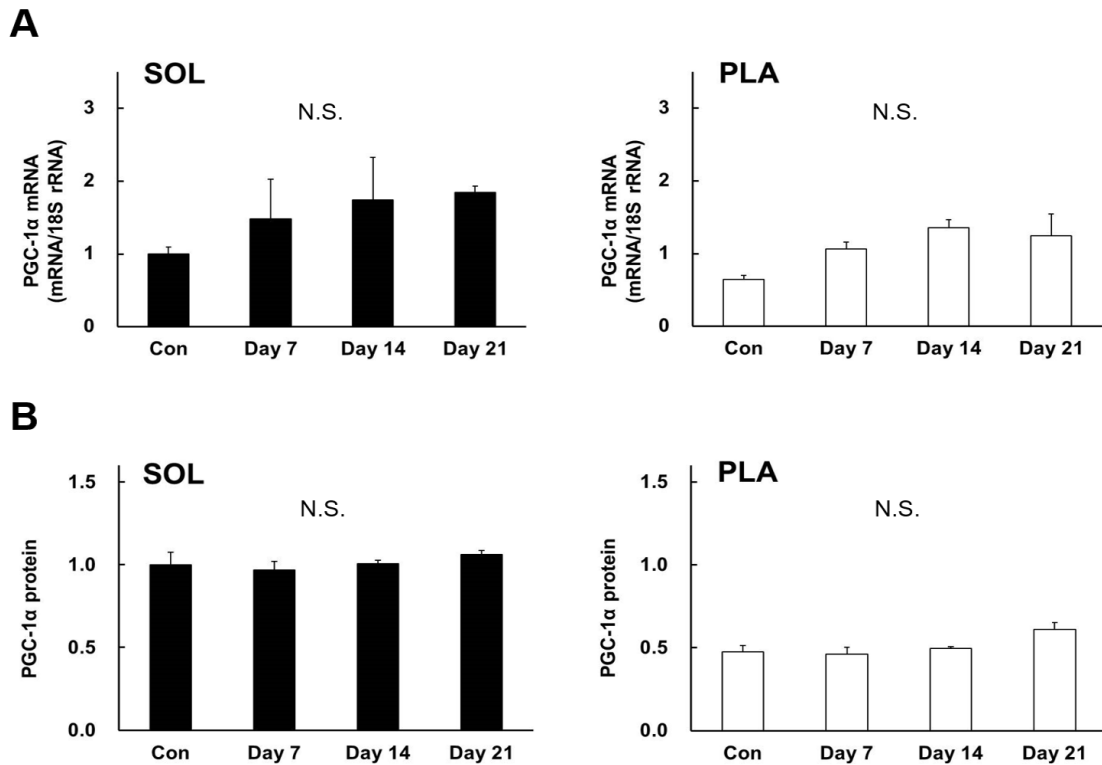


Fig. 1 Effects of 7, 14 and 21 days of hindlimb immobilization on PGC-1 $\alpha$  mRNA (A) and protein (B) expressions in soleus and plantaris muscles. SOL Soleus muscle, PLA plantaris muscle, Con control, Day 7, 14, 21 periods of hindlimb immobilization. The data are shown as the relative values to those of soleus muscle in the control group. Each bar represents the mean  $\pm$  SE (n=4/group).

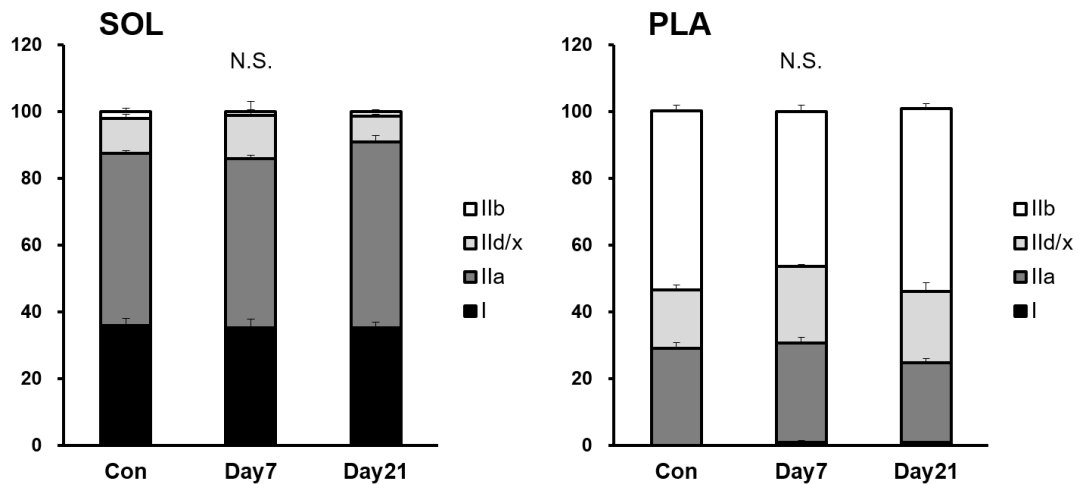


Fig. 2 Effects of 7 and 21 days of hindlimb immobilization on muscle fiber type distribution in soleus and plantaris muscles. SOL Soleus muscle, PLA plantaris muscle, Con control, Day 7, 21 periods of hindlimb immobilization. The data are shown as the relative values to those of soleus muscle in the control group. Each bar represents the mean  $\pm$  SE (n=3/group).

PGC-1 $\alpha$  mRNA の発現量は、ヒラメ筋 (SOL) および足底筋 (SOL) 共に長期間の不活動によって変化しなかった (Fig. 1A)。PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量についても、mRNA の発現量同様に、SOL および PLA 共に不活動期間中変化は認められなかった (Fig. 1B)。

### 〈3・2〉 筋線維タイプ組成

不活動状態が SOL の筋線維タイプ組成に及ぼす影響について検討したところ (Fig. 2), いずれの筋線維タイプにおいても有意な変化は認められなかった。また、PLA の筋線維タイプ組成に関しても、不活動によって有意な

Table 1. Correlation between PGC-1 $\alpha$  protein expression level and muscle mass/body mass, FOXO3a protein and phospho-FOXO3a protein expression level in soleus and plantaris muscles.

	Day 7-21 (n=12)	Day 7 & Day 14 (n=8)	Day 14 & Day 21 (n=8)
<i>PGC-1<math>\alpha</math> protein vs. Muscle mass/body mass (%change/day)</i>			
SOL	r= 0.53 p= 0.075	r= 0.33 p= 0.426	<b>r= 0.77</b> <b>p= 0.026</b>
PLA	r= -0.42 p= 0.176	r= -0.21 p= 0.619	r= -0.46 p= 0.250
<i>PGC-1<math>\alpha</math> protein vs. FOXO3a protein</i>			
SOL	r= 0.02 p= 0.948	r= 0.28 p= 0.505	r= -0.16 p= 0.708
PLA	r= -0.003 p= 0.993	r= -0.38 p= 0.349	r= 0.43 p= 0.284
<i>PGC-1<math>\alpha</math> protein vs. phospho-FOXO3a protein</i>			
SOL	r= 0.16 p= 0.617	r= -0.56 p= 0.151	<b>r= 0.83</b> <b>p= 0.010</b>
PLA	r= 0.32 p= 0.310	r= -0.10 p= 0.814	r= 0.46 p= 0.250

SOL Soleus muscle, PLA plantaris muscle, Con control, Day 7, 14, 21 periods of hindlimb immobilization.

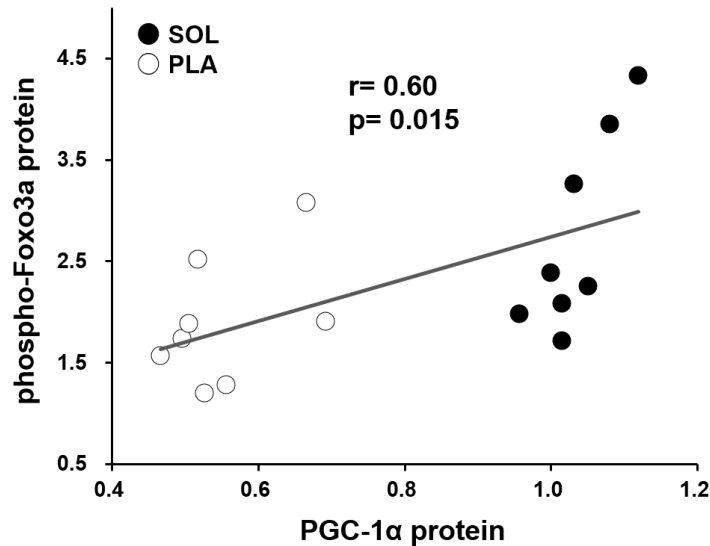


Fig. 3. Correlation between PGC-1 $\alpha$  protein expression level and phospho-FOXO3a protein expression level in soleus and plantaris muscles at late stage (Day 14 and Day 21) of immobilization.

変化は認められなかった (Fig. 2)。

### 〈3・3〉 PGC-1 $\alpha$ タンパク質の発現量と筋重量変化の相関関係

PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と筋重量変化 (コントロール群の体重補正した筋重量からの変化率を 1 日当たりに

換算した値) の相関関係に関して検討したところ、不活動後期 (14 日目および 21 日目) の SOL においてのみ、高い正の相関関係が認められた (r= 0.77, p=0.026) (Table 1)。

### 〈3・4〉 PGC-1 $\alpha$ タンパク質の発現量と FOXO タンパク質の発現量の相関関係

PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と FOXO3a タンパク質の発現量には有意な相関関係は認められなかった (Table 1)。

PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と phospho-FOXO3a タンパク質の発現量の相関関係に関して検討したところ、不活動後期の SOL においてのみ、高い正の相関関係が認められた ( $r=0.83, p=0.010$ ) (Table 1)。同様の検討を PGC-1 $\alpha$  の発現が顕著な SOL とその半量の発現を示す PLA を併せて行ったところ、不活動後期において有意な正の相関関係が認められた ( $r=0.60, p=0.015$ ) (Fig. 3)。

#### 4. 考察

本研究では、不活動に伴う筋萎縮時において PGC-1 $\alpha$  の発現応答が筋萎縮の進行に寄与するか否かを明らかにすることを目的とし、PGC-1 $\alpha$  遺伝子およびタンパク質の発現量、PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と筋萎縮度および PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量と FOXO の活性 (リン酸化状態) の相関関係について検討した。

##### 〈4・1〉 不活動に伴う PGC-1 $\alpha$ の発現応答

ギプス固定や尾部懸垂といった身体的不活動状態において、骨格筋 PGC-1 $\alpha$  の発現量は低下することが多くの先行研究で報告されている<sup>4)7)</sup>。一方で、不活動によって PGC-1 $\alpha$  の発現量は低下しない<sup>11)</sup>、または増加するという報告も一部で見られる<sup>12)</sup>。また、筋線維タイプによる PGC-1 $\alpha$  の発現応答の差異も報告されており、Cnavino et al. は、3 日間の尾部懸垂によって、遅筋であるヒラメ筋 (SOL) の PGC-1 $\alpha$  の発現量は顕著に低下し<sup>13)</sup>、速筋である腓腹筋においては低下しないことを示している<sup>14)</sup>。しかしながら、本研究において PGC-1 $\alpha$  の発現量は、遅筋である SOL および速筋である足底筋 (PLA) のいずれにおいても、遺伝子およびタンパク質共に不活動期間中低下せず、コントロール群の発現レベルを維持していた。

身体的不活動の他にも慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、慢性心臓病、糖尿病、尿毒症、ガンによる悪液質など疾病と関連する様々な萎縮モデルにおいて、遺伝子およびタンパク質の両方で PGC-1 $\alpha$  の発現が低下することが報告されている<sup>2), 3), 14)</sup>。そして、Remels et al.<sup>14)</sup> は、COPD 患者の骨格筋において、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  遺伝子の発現が高いほど、PGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現が低下していることを報告している。また、C2C12 細胞の筋間細胞に対する TNF- $\alpha$  処理によって PGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現量が低下することも併せて報告しており、TNF- $\alpha$  によって PGC-1 $\alpha$  の発現が調節されている可能性を示している<sup>14)</sup>。Tang et al.<sup>15)</sup> は、C2C12 細胞を用いて、TNF- $\alpha$  処理による PGC-1 $\alpha$  の遺伝子およびタンパク質発現抑制は TNF- $\alpha$  の濃度依存的に亢進することを報告している。ギプス固定や尾部懸垂といった身体的不活動状態においても TNF- $\alpha$  や IL-6 等の炎症性サイトカインの発現が増加することが知られている<sup>6), 16), 17)</sup>。不活動による筋萎縮時にお

いて、TNF- $\alpha$  と PGC-1 $\alpha$  の発現を同時に検討した研究では、TNF- $\alpha$  の発現が増加するのに対して、PGC-1 $\alpha$  の発現低下が認められている<sup>4), 6)</sup>。これらのことから、不活動において増加する炎症性サイトカインが PGC-1 $\alpha$  の発現に対して抑制的に作用している可能性が考えられる。

不活動に伴う筋萎縮時において、TNF- $\alpha$  や IL-6 等の炎症性サイトカインは比較的早期に発現することが報告されている<sup>4), 16)</sup>。しかしながら、我々のギプス固定モデルにおいては、TNF- $\alpha$  および IL-6 の遺伝子発現はギプス固定 14 日目においてはコントロール群と同等の発現レベルを示し (未発表データ)、21 日目において初めて顕著な増加を示していた<sup>9)</sup>。本研究において、PGC-1 $\alpha$  の発現量が不活動期間中も維持されたのは、他の先行研究で認められた早期での炎症性サイトカインの発現増加が、後期に至るまで生じなかったことが一つの要因である可能性が考えられる。

不活動によって筋線維タイプの速筋化が生じることが多くの先行研究で報告されている<sup>18)-21)</sup>。PGC-1 $\alpha$  は、遅筋の形成のマスター調節遺伝子としても知られており、不活動による PGC-1 $\alpha$  の発現低下はこの現象に寄与することが考えられる。また、C2C12 細胞への TNF- $\alpha$  処理によっても同様に速筋化が生じることが報告されている<sup>14)</sup>。これらのことから、不活動に伴う TNF- $\alpha$  の発現増加および PGC-1 $\alpha$  の発現低下が、速筋化に寄与している可能性が考えられる。本研究では筋線維タイプの組成は不活動によって変化しなかった。このことには、本研究で用いたギプス固定モデルでは、TNF- $\alpha$  の発現増加が不活動後期まで認められないこと、PGC-1 $\alpha$  の発現量が維持されたことが影響している可能性が考えられる。

##### 〈4・2〉 PGC-1 $\alpha$ の発現量維持が筋萎縮に及ぼす影響

PGC-1 $\alpha$  を骨格筋特異的に過剰発現させると、除神経、絶食、FOXO3a の過剰発現による筋萎縮を抑制できることが報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、不活動期間中に PGC-1 $\alpha$  タンパク質の発現量は低下を示さず、コントロール群の発現レベルを維持していた。このことが、萎縮の進行度に影響しているか検討したところ、不活動後期 (ギプス固定 14 日目および 21 日目) の SOL においてのみ有意な正の相関関係が認められた。筋タンパク質分解系の亢進は不活動早期において顕著であり、その後は徐々に緩やかな応答を示すことが知られている<sup>22), 23)</sup>。本研究では、PGC-1 $\alpha$  の発現量は維持されたものの、不活動早期においては PGC-1 $\alpha$  の萎縮抑制効果を分解系の亢進が上回ったため相関関係が認められなかったと考えられる。そして、不活動後期で SOL においてのみ有意な相関関係が認められたことから、萎縮の抑制効果に対する PGC-1 $\alpha$  の発現レベルの閾値が存在する可能性が考えられる。一過性の有酸素運動や一定期間のトレーニングにより PGC-1 $\alpha$  の発現量が遅筋および速筋共に顕著な増加を示すことが知られている<sup>24), 25)</sup>。また、不活動前の一過性の有酸素運動が尾部懸垂による筋萎縮を軽減すること

も報告されている<sup>26)</sup>。したがって、不活動前の有酸素運動によって遅筋および速筋における PGC-1 $\alpha$  の発現量を高めておくことは、筋萎縮の抑制または軽減に寄与する可能性が考えられる。

Sandri et al.<sup>2)</sup> は、筋タンパク質の分解に重要な筋特異的ユビキチンリガーゼ遺伝子やオートファジー関連遺伝子の転写因子である FOXO の転写活性を PGC-1 $\alpha$  が抑制することを報告している。さらに、Geng et al.<sup>27)</sup> は、慢性心疾患による筋萎縮モデルにおいて PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させたところ筋萎縮が抑制されたが、これは Akt の発現増加による FOXO の不活性化（リン酸化の亢進）が生じ、FOXO の核外移行が促進されることによって転写活性が抑制されることを報告している。本研究において、PGC-1 $\alpha$  の発現量と phospho-FOXO3a タンパク質の発現量について検討したところ、SOL においてのみ高い正の相関関係が認められた。さらに、同様の検討を、SOL と PLA を併せて検討したところ有意な正の相関が認められた。これらのことから、PGC-1 $\alpha$  の発現量をより高く維持しておくことが、FOXO のリン酸化を介して筋萎縮に対して抑制的に働く可能性が考えられる。

#### 〈4・3〉 結論

本研究では、不活動期間中においても発現量が維持された PGC-1 $\alpha$  が筋萎縮に対して、その発現量依存的に抑制的に作用している可能性が示唆された。不活動前にプレコンディショニングとして、一過性の運動や継続されたトレーニングによって PGC-1 $\alpha$  の発現量を高めておくことが筋萎縮の軽減に寄与する可能性があることを示している。今後、不活動に伴う筋萎縮における PGC-1 $\alpha$  の役割を解明していくことで、筋萎縮の予防・改善のための適切かつ効果的な運動方法の確立に繋がることが期待される。

#### 参考文献

- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM: Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, 418, 797-801, 2002.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM: PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (44), 16260-16265, 2006.
- Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, Yan Z: Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice, *Am J Pathol*, 170 (2), 599-608, 2007.
- Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G: A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse, *J Appl Physiol*, 106(6), 2049-2059, 2009.
- Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, Yoshikawa T: The microRNA miR-696 regulates PGC-1 $\alpha$  in mouse skeletal muscle in response to physical activity, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (4), E799-806, 2010.
- Kang C, Ji LL: Muscle immobilization and remobilization downregulates PGC-1alpha signaling and the mitochondrial biogenesis pathway, *J Appl Physiol*, 115, 1618-1625, 2013.
- Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS, Szeto HH, and Powers SK: Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant, *J Appl Physiol*, 115, 529-538, 2013.
- Machida S, Booth FW: Changes in signalling molecule levels in 10-day hindlimb immobilized rat muscles, *Acta Physiol Scand*, 183(2), 171-179, 2005.
- Okamoto T, Machida S: Changes in FOXO and proinflammatory cytokines in the late stage of immobilized fast and slow muscle atrophy, *Biomedical Research*, 38(6), 2017.
- Klein D, Kern RM, Sokol RZ: A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes, *Biochem Mol Biol Int*, 36(1), 59-66, 1995.
- Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Grassi B, Bottinelli R, Pellegrino MA: The role of alterations in mitochondrial dynamics and PGC-1 $\alpha$  over-expression in fast muscle atrophy following hindlimb unloading, *J Physiol*, 593(8), 1981-1995, 2015.
- Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R: Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading, *Mol Cell Biochem*, 350(1-2), 1-11, 2011.
- Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA: PGC1- $\alpha$  over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice, *J Physiol*, 592(20), 4575-4589, 2014.
- Remels AH, Gosker HR, Schrauwen P, Hommelberg PP, Sliwinski P, Polkey M, Galdiz J, Wouters EF, Langen RC, Schols AM: TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?, *FASEB J*, 24(12), 5052-5062, 2010.
- Tang K, Wagner PD, Breen EC: TNF-alpha-mediated reduction in PGC-1alpha may impair skeletal muscle function after cigarette smoke exposure, *J Cell Physiol*, 222(2), 320-327, 2010.
- Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N: TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading, *J Appl Physiol*, 104, 170-177, 2008.
- Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D: Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading, *Am J Physiol Cell Physiol*, 299, C307-315, 2010.
- Yajid F, Mercier JG, Mercier BM, Dubouchaud H, Préfaut C: Effects of 4 wk of hindlimb suspension on skeletal muscle mitochondrial respiration in rats, *J Appl Physiol*, 84(2), 479-485, 1998.
- Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D: Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat, *Am J Physiol*, 277 (6 Pt 1), C1044-1049, 1999.
- Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, Pette D: Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat, *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(5), C1558-1563, 2000.
- Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, Reggiani C: Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus, *Am J Physiol Cell Physiol*, 285 (3), C575-583, 2003.
- Okamoto T, Torii S, Machida S: Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx/Atrogin-1 and MuRF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles, *J Physiol Sci*, 61, 537-546, 2011.
- Bertaggia E, Coletto L, Sandri M: Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation, *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, C587-596, 2012.
- Terada S, Tabata I: Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286(2), E208-216, 2004.
- Ikeda S, Kawamoto H, Kasaoka K, Hitomi Y, Kizaki T, Sankai Y, Ohno H, Haga S, Takemasa T: Muscle type-specific response of PGC-1 alpha and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle, *Acta Physiol (Oxf)*, 188(3-4), 217-223, 2006.
- Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Yasuhara T, Kondo H, Mohri S, Takeda I, Roy RR: Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle, *Acta Physiol (Oxf)*, 197(1), 65-74, 2009.
- Geng T, Li P, Yin X, Yan Z: PGC-1 $\alpha$  promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice, *Am J Pathol*, 178(4), 1738-1748, 2011.