骨格筋の恒常性維持に関する最新知見

奥津 光晴^{1,2}, 山田 麻未²

New insight in skeletal muscle homeostasis

Mitsuharu Okutsu^{1,2} and Mami Yamada²

¹名古屋市立大学総合生命理学部総合生命理学科, 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1 (School of Biology and Integrated Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan)

²名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科, 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1 (Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan)

Received: March 29, 2018 / Accepted: April 5, 2018

Abstract Cancer, congestive heart failure, chronic obstructive pulmonary disease, type 2 diabetes and aging induce skeletal muscle atrophy. These diseases and aging promote the formation of reactive oxygen species (ROS), which in turn regulate catabolic pathways involved in muscle atrophy. The first line of antioxidant defense system from ROS is comprised of superoxide dismutase (SOD), which scavenges superoxide ($O_2^{\cdot-}$) to produce the less reactive hydrogen peroxide (H_2O_2). Mammalian skeletal muscle expresses cytosolic copper/zinc-containing SOD (CuZnSOD or SOD1), manganese SOD (MnSOD or SOD2), and extracellular SOD (EcSOD or SOD3). In this review, we provide an overview of 1) oxidative stress and antioxidants, 2) EcSOD ameliorates skeletal muscle abnormalities, cachexia, and exercise intolerance, 3) muscle-derived EcSOD protects against organ dysfunction, and 4) role of the Keap1-Nrf2 signaling pathway in the regulation of antioxidant defense system.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 67(3): 245-249 (2018)

Keywords : skeletal muscle, antioxidants, exercise

はじめに

近年、我が国では食の欧米化にともなう過剰な栄養摂取や身体活動量の減少による健康の悪化が社会問題となっている。食の欧米化や身体活動量の減少は、肥満、糖尿病、心筋疾患、脳卒中、慢性閉塞性肺疾患や癌などの様々な疾病の発症に関与することから、これらの慢性疾患が身体の健康に及ぼす影響を理解することは重要である。また、我が国は超高齢化社会を迎えている。65歳以上の高齢者は2020年には29.1%、2030年には31.6%に達すると予測されており、近い将来、3人に1人が高齢者という時代を迎えると推測されている¹⁾。加齢によるロコモティブシンドロームやフレイルなどは寝たきりや代謝異常の原因でもあることから、加齢が身体の健康に及ぼす影響を理解することも重要である。

これらの慢性疾患や加齢は骨格筋の恒常性を破綻し、骨格筋量の減少（筋萎縮）を引き起こすことはよく知られている。骨格筋は体重の約40%を占める哺乳類において最大の器官であり、収縮や伸張により生体の身体運動を生み出す重要な役割を果たしている。また、骨格筋は身体の体温調節や外部からの衝撃に対する防御の他、近

年ではマイオカインと呼ばれるホルモンを血中に放出することで筋肉以外の臓器や器官の機能や形態を維持する役割も果たしている。したがって、骨格筋の量や機能を維持するメカニズムを解明し健康科学や予防医学に応用することは、健康な身体の獲得、健康寿命の延伸や医療費の削減などの観点から重要な課題である。

骨格筋の量や機能の維持にはタンパクの合成と分解のバランスの保持が必要不可欠である。慢性疾患や加齢による筋萎縮は、悪液質（カヘキシー）の増大によりそのバランスが不均衡になり、全身が衰弱状態となることで引き起こされる。カヘキシーの増大は、活性酸素種や炎症性サイトカインによる酸化ストレスの増大が要因と考えられており、これらの働きを抑制することで筋萎縮の予防や軽減が期待できる。本稿では、筋萎縮の予防や軽減に対する抗酸化機能の役割について、酸化ストレスを軽減する抗酸化物質の特徴とその調節機序を概説する。

酸化ストレス

酸化ストレスは活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）と抗酸化作用のバランスとして定義されている。したがって、酸化ストレスが増大した状態とは、活性酸

素種の増加あるいは抗酸化作用の低下により酸化と抗酸化作用のバランスが不均衡になり酸化が亢進した状態のことを意味している。活性酸素種には複数の異なる種類があり、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル ($HO^{\cdot}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 (1O_2) などに分類することができる。これまでの酸化ストレスに関する文献では、フリーラジカルという単語を頻繁に目にするが、これはラジカルについていない活性酸素種の総称である。つまり、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルは活性酸素種でありフリーラジカルでもあるが、過酸化水素や一重項酸素は活性酸素種であるもののフリーラジカルではない。多くの活性酸素種は半減期が秒単位と極めて短い、強い作用を持っているため短時間の作用でも生体に存在する様々な物質と反応し、細胞、タンパク質やDNAなどを変性、活性や損傷することができる。とりわけヒドロキシルラジカルなどのフリーラジカルは半減期が1秒以下と極めて短いとその作用は非常に強い。また活性酸素種の半減期は短くても継続的に産生される状況であれば、生体は酸化ストレスの影響を長時間受ける環境にあると推測できる。一方、過酸化水素などのフリーラジカルではない活性酸素種は、活性酸素種の中では半減期が長いものの作用は比較的弱い。酸化ストレスに関する培養細胞を用いた実験では過酸化水素を添加する方法が酸化ストレスモデルとして頻繁に用いられており、筋管細胞に分化したマウス骨格筋由来の培養細胞に過酸化水素を添加し24時間培養すると筋管細胞の直径が減少し、筋萎縮と類似した現象が観察される。このことは、活性酸素種としての作用が比較的弱くても長時間作用することで生体に影響を及ぼす可能性を示唆している。

抗酸化物質の種類と重要性

酸化ストレスを軽減する方法として抗酸化酵素や解毒代謝酵素の産生の促進があげられる。抗酸化酵素（スーパーオキシドディスムターゼ：superoxide dismutase (SOD)）はスーパーオキシドアニオンを過酸化水素に分解することで酸化ストレスの軽減に貢献する²⁾。抗酸化酵素は、細胞質に発現するcopper zinc SOD (CuZn-SOD)、ミトコンドリアに発現するmanganese SOD (Mn-SOD)、細胞外に分泌されるextracellular SOD (EcSOD)などが同定されている。抗酸化酵素は発現する場所などの違いから異なる名称で分類されているが、スーパーオキシドアニオンを過酸化水素に分解する機能自体には違いがないと考えられている。抗酸化酵素の働きで生じた過酸化水素はカタラーゼ (catalase) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) とグルタチオン (GSH) により水と酸素に分解される (Fig. 1)²⁾。これらの一連の働きによりスーパーオキシドアニオンは無毒化される。一方、第二相解毒代謝酵素は酸化ストレスの除去の他解毒作用もっており、NAD (P) H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) や glutathione S-transferase (GST) などが同定されている。これらの抗酸化酵素や解毒代謝酵素は状況に応じてそれぞれの抗酸化物質がバランスよく機能することで酸化ストレスを除去し生体の恒常性維持に貢献している。先行研究では、MnSOD欠損マウスは拡張性心筋症の発症により生後まもなく死亡する他、代謝異常や神経変性を発症することが報告されている³⁾。また、CuZnSOD欠損マウスは死亡することなく成長するものの加齢にともなう筋萎縮が顕著に見られることその他、脳や肝臓などの臓器で病態を示すことが報告されて

Fig. 1 Antioxidant defence mechanism against damage by ROS.

いる⁴⁾。これらの報告は、抗酸化物質が生体の恒常性維持に重要なことを科学的に立証している。

骨格筋の筋量維持に対する EcSOD の役割

EcSOD は細胞外に放出される唯一の抗酸化酵素である。EcSOD はその特性から細胞内で産生される酸化ストレスの他、隣接する細胞が放出する酸化ストレスから細胞自身を防御することもできる。したがって、骨格筋のように筋線維や毛細血管が密に接する組織では重要な役割を果たしていると考えられている。デキサメサゾン投与はカヘキシーによる筋萎縮の特徴である酸化ストレスの増加と速筋の筋萎縮を誘導する⁵⁾。デキサメサゾン投与は骨格筋の EcSOD を低下するが CuZnSOD や MnSOD は低下しないことから、デキサメサゾンによる筋萎縮は EcSOD の減少による酸化ストレスの増加が一因である可能性がある⁵⁾。この可能性は EcSOD の機能や発現量を増強することで立証できる。EcSOD プラスミドを前脛骨筋に導入すると導入部位の EcSOD の発現を増強できる。我々は、EcSOD プラスミドを前脛骨筋に導入したマウスにデキサメサゾンを投与すると、デキサメサゾンによる筋線維径の減少が抑制することを報告した⁵⁾。この結果は骨格筋の EcSOD を増加することで筋萎縮を抑制できる可能性を示唆している。前脛骨筋へのプラスミドの導入は目的とするタンパクの発現を比較的簡便にかつ短時間に増強できるが、この発現の増強は導入部位のみ

であるため全身性の評価を行うことはできない。全身性の評価は筋特異的に EcSOD の発現を増強したトランスジェニックマウスを作成することで実施できる。我々は、筋特異的 EcSOD トランスジェニックマウスにデキサメサゾンを投与すると、デキサメサゾンによる筋重量の減少が抑制されることを報告した⁵⁾。この結果は骨格筋の EcSOD を増加することで筋萎縮を軽減できることを示唆している。トランスジェニックマウスの利点は他のモデルマウスと交配することで様々な種類の疾患により発症する筋萎縮の抑制効果を立証できる点である。心不全は筋萎縮を引き起こすことが知られており、心不全モデルマウスでも顕著な筋萎縮が観察される⁶⁾。この心不全モデルマウスと筋特異的 EcSOD トランスジェニックマウスを交配すると、筋特異的に EcSOD の発現を増強した心不全モデルマウスを作成できる。作成したマウスは、EcSOD を全身の筋組織で増加しているため、プラスミド投与での筋線維径のみの評価とは異なり、筋重量の他、最大筋力や筋持久力の評価、さらには病態の評価も可能となる。我々は、心不全モデルマウスの EcSOD を筋特異的に増強すると、心不全による筋萎縮、最大筋力の低下および筋持久力の低下を抑制することを報告した⁵⁾。これらの結果は、骨格筋の EcSOD の増加は疾患による筋萎縮を抑制できることを示唆している (Fig. 2)⁵⁾。しかしながら、EcSOD はすべての疾患による筋萎縮を抑制できるわけではない。筋萎縮性側索硬化症

Fig. 2 Schematic presentation of the working hypothesis for EcSOD-mediated protection against congestive heart failure-induced catabolic muscle wasting and exercise intolerance.

(amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は重篤な筋肉の萎縮と筋力低下をきたす神経変性疾患である。1993年にALSの原因遺伝子の一つがSOD1 (CuZnSOD) であり、SOD1 遺伝子に突然変異を起こしたマウスはヒトのALSの病態と類似することが報告された⁷⁾。SOD1の突然変異は抗酸化活性の低下が直接的な原因ではないと考えられているが、悪化の一因は酸化ストレスの増大であることから筋特異的EcSODトランスジェニックマウスとALSモデルマウスを交配したところ、骨格筋のEcSODを増強しても、ALSによる生存期間の減少、体重の減少、筋力の減少ともに抑制はできなかった⁵⁾。この結果は骨格筋のEcSODを増加しても筋萎縮を抑制できない場合もあることを示唆している。

骨格筋から分泌されるEcSODの多彩な役割

上述の通り、EcSODは細胞外に放出される唯一のSODである。細胞外に放出されたEcSODは血管内を循環し他の臓器に再分布する。筋特異的EcSODトランスジェニックマウスのEcSODは、骨格筋のみならず、血中、肺、肝臓や脂肪組織でも野生型マウスに比べ顕著に増加している⁸⁾。この再分布したEcSODは再分布した臓器の恒常性維持にも貢献する。筋特異的にEcSODを増強したマウスにストレプトゾトシン (Streptozocin) 投与によりI型糖尿病を発症させると心臓機能が低下するが、筋特異的EcSODトランスジェニックマウスは心臓機能の低下を抑制する⁹⁾。また高濃度のリポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) を投与すると全身性の炎症を引き起こし死亡するが、筋特異的にEcSODを増強したマウスに投与すると生存率が延長する⁸⁾。さらに、高濃度のLPSを投与された野生型マウスの肺は損傷を受け液体中では沈殿するが、筋特異的にEcSODを増強したマウスの肺は損傷を受けないため沈殿せず浮遊する⁸⁾。これらの結果は、骨格筋から分泌されるEcSODは他の組織に再分布し、分布先の組織の恒常性維持に貢献することを示唆している。EcSODは抗酸化酵素として同様、マイオカインとしての役割も果たしているのかもしれない。

運動による骨格筋の抗酸化機能の変化

骨格筋の抗酸化機能を改善する効果的な方法として運動があげられる¹⁰⁾。抗酸化物質は運動で増加することが知られており、特に定期的な持久的運動を行うと骨格筋の抗酸化物質は顕著に増加する。運動による抗酸化物質の増加は、身体運動による筋収縮が初期刺激となり、物理的刺激や体内の内分泌系因子の変動が誘導する¹⁰⁾。また、抗酸化物質は速筋に比べ遅筋で多いことから、持久的な運動による抗酸化物質の増加は運動による筋線維タイプの遅筋化も原因の一つと考えられている¹⁰⁾。

運動が骨格筋の抗酸化物質の発現を制御する重要な

因子として peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) と呼ばれる転写補助因子があげられる¹¹⁾。PGC-1 α のトランスジェニックマウスを用いた解析では、PGC-1 α の発現を増加すると骨格筋の抗酸化物質、遅筋線維、ミトコンドリア数や毛細血管密度が増加することが報告されている。これらの現象は、運動による骨格筋の適応と極めてよく一致している¹²⁾。実際にマウスに運動を負荷した実験では、骨格筋のp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) やAMP-activated protein kinase (AMPK) などの経路を介してPGC-1 α の発現を増加することが報告されている¹¹⁾。しかしながら、筋特異的にPGC-1 α を欠損した近年の報告では、筋特異的にPGC-1 α を欠損したマウスに運動トレーニングを実施させると、ミトコンドリアや毛細血管の増加は消失するが、筋線維の遅筋化や抗酸化物質の増加は野生型マウスとほぼ同様に観察されることが報告されている¹³⁾。これらの結果は運動による骨格筋の適応にはPGC-1 α が重要であるが、抗酸化物質の制御はPGC-1 α を介さない経路が存在する可能性を示唆している。

抗酸化物質の産生経路

細胞が抗酸化物質を合成する経路として中心的な役割を果たしているのは細胞のストレス応答センサーとしても知られるKelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) / NF-E2-related factor 2 (Nrf2) である¹⁴⁾。正常状態の細胞内では、Keap1とNrf2は結合して細胞質にとどまり、Keap1はオートファジーリソソーム系により分解されNrf2はユビキチンプロテアソーム系により分解される。一方、細胞がストレス状況下に曝されるとKeap1がストレスを感知し、Keap1とNrf2の結合が解離してNrf2の核内移行を誘導する。核内に移行したNrf2は抗酸化剤応答配列 (antioxidant response element: ARE) / 親電子性物質応答配列 (electrophile responsive element: EpRE) に結合し、抗酸化物質を産生する。先行研究では、Nrf2の発現を全身で欠損すると抗酸化物質であるNQO1の発現がほぼ消失することや加齢により抗酸化酵素であるCu-ZnSOD, MnSODやEcSODなどのmRNAの発現も顕著に減少することが報告されている。これらの結果は、抗酸化物質の産生にはNrf2の核内移行が重要であることを示唆している。今後、骨格筋におけるNrf2の発現や調節の機構を理解することで骨格筋の抗酸化機能を制御する分子機構が解明できる可能性がある。

おわりに

抗酸化物質は生体の酸化ストレスを軽減する重要な要素である。抗酸化物質は習慣的な運動で変動することから、運動は筋萎縮を抑制する一因と考えられている。これ

まで運動による抗酸化物質の変動と役割の立証を試みた研究は数多く報告されている。しかしながら、これらの大半は抗酸化物質の増減からその役割を推測した現象論に終始しており、因果関係を立証した報告は極めて少ない。近年、遺伝子組み換え技術の発達により、組織特異的な遺伝子の発現調節を必要とする週齢から開始することなども可能である。標的とする遺伝子を増強や消失したマウスや培養細胞などを効率よく使用し、健康科学で見られる現象を分子レベルから解明することが今後の本研究分野の発展に繋がると考えている。

利益相反自己申告：申告すべきものはなし

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(15H03080および16K13019)の支援を受けて行われました。

引用文献

- 1) 平成28年度版厚生労働白書。
- 2) Griendling KK and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916, 2003.
- 3) Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC and Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11: 376-381, 1995.
- 4) Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW and Snider WD. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13: 43-47, 1996.
- 5) Okutsu M, Call JA, Lira VA, Zhang M, Donet JA, French BA, Martin KS, Peirce-Cottler SM, Rembold CM, Annex BH and Yan Z. Extracellular superoxide dismutase ameliorates skeletal muscle abnormalities, cachexia, and exercise intolerance in mice with congestive heart failure. *Circ Heart Fail* 7: 519-530, 2014.
- 6) Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH and Yan Z. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol* 170: 599-608, 2007.
- 7) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B and Van den Bergh R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62, 1993.
- 8) Call JA, Donet J, Martin KS, Sharma AK, Chen X, Zhang J, Cai J, Galarreta CA, Okutsu M, Du Z, Lira VA, Zhang M, Mehrad B, Annex BH, Klibanov AL, Bowler RP, Laubach VE, Peirce SM and Yan Z. Muscle-derived extracellular superoxide dismutase inhibits endothelial activation and protects against multiple organ dysfunction syndrome in mice. *Free Radic Biol Med* 113: 212-223, 2017.
- 9) Call JA, Chain KH, Martin KS, Lira VA, Okutsu M, Zhang M and Yan Z. Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling. *Circ Heart Fail* 8: 188-197, 2015.
- 10) Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN and Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 110: 264-274, 2011.
- 11) Lira VA, Benton CR, Yan Z and Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E145-161, 2010.
- 12) 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 and Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797-801, 2002.
- 13) Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M and Yan Z. PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C572-579, 2010.
- 14) Motohashi H and Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10: 549-557, 2004.