

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01373

研究課題名(和文)サルコペニアの病態解明と予防法・治療法確立のための研究

研究課題名(英文) Study for elucidation of the pathology of sarcopenia and establishment of preventive and therapeutic methods

研究代表者

樋口 逸郎 (HIGUCHI, Itsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80183573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：老化促進マウス(SAMP1)を50週齢まで飼育し、運動をさせた高齢SAMP1群と運動を行わない高齢SAMP1群に分け8週後(58週齢)に屠殺し筋病理検査を実施した。運動群でLC3、p62などのオートファジー関連因子発現が増加していた。筋重量は有意差を認めなかった。サルコペニアの予防のためにはより早期からの運動が必要と思われる。患者生検筋の検査では転倒により大腿骨近位部骨折を呈した高齢女性の中殿筋の筋病理で、type 2筋線維萎縮が著明に認められた2症例においてLC3の著明な亢進、縁取り空胞、リソソーム活性亢進が認められた。サルコペニアとオートファジー異常の関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Senescence-Accelerated Mouse Prone 1 (SAMP 1) were raised until 50 weeks of age, divided into exercise and non-exercise group, and were sacrificed 8 weeks later (58 weeks old) and muscle pathological examination was performed. Expression of autophagy related factors such as LC3, p62 was increased in exercise group. There was no significant difference in muscle weight between the two groups. For prevention of sarcopenia, it seems necessary to exercise from younger age. In muscle pathology of the gluteus medius of the elderly woman who had a femoral proximal fracture due to fall, in 2 cases in which type 2 muscle fiber atrophy was markedly observed, upregulation of LC3, rimmed vacuoles, and increased lysosomal activity were observed. It is suggested that sarcopenia and autophagy abnormality are related.

研究分野：筋病理学

キーワード：サルコペニア オートファジー 老化促進マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) サルコペニアの原因としては、加齢に伴う筋原性変化、神経原性変化、栄養障害、ホルモン異常など多くの因子の関与が推定されているが、多因子の中でどれが相対的に最も重要で、早期変化であるのか、最も有効である運動方法などに関しては不明な点が多い。また一次性サルコペニアと廃用性筋萎縮が混同されて議論されることがある。両者とも白筋 (type 2 筋線維) に変化が強いという共通点があるが、萎縮の軽度な赤筋 (type 1 筋線維) 機能の相違点などについての検討は十分になされていない。type 2 筋線維萎縮とミトコンドリア酵素活性の低下が高齢者骨格筋の代表的な所見とされているが、サルコペニアにおける両者の関連は明らかではない。我々は以前から type 2 筋線維萎縮の病態研究を続けており、Fas 抗原が Type 2 筋線維に見られ、Bcl-2 抗原はみられないことを報告し、筋萎縮にアポトーシスが関与することを証明した。また、二次性サルコペニアと考えられる高度のいそを呈する肺気腫患者の筋病理を報告した。さらに血中ビタミン D 濃度が低いグループが type 2 筋線維萎縮の程度が著明であり、筋力低下による転倒のリスクになっている可能性があることを明らかにした。

(2) 筋再生に重要な役割を担う組織幹細胞である筋衛星 (サテライト) 細胞の増殖能および筋分化能が加齢に伴い変化することや、高齢期の再生筋では脂肪蓄積が顕著に認められることが報告されており、骨格筋の再生能や幹細胞であるサテライト細胞の機能はサルコペニアの研究でも注目されている。我々は世界で初めてウールリッヒ病における collagen VI 欠損を明らかにし、本症において筋再生異常が見られることを明らかにしたが、最近骨格筋の幹細胞である筋サテラ

イト細胞のニッチ (微小環境) に collagen VI が不可欠であり、筋サテライト細胞の自己再生と増殖に重要であることが報告されている。今後 collagen VI などの細胞外マトリックスと筋再生の関連を詳細に検討する必要がある。

2. 研究の目的

サルコペニア (加齢性筋肉減弱症) は高齢者の転倒、死亡と関連することで注目されているが、発症メカニズムについては不明な点が多い。豊かな高齢化社会を実現するためには、要介護高齢者を減らし健康寿命を延ばすことが重要であり、サルコペニアのメカニズムの解明は高齢者の安全で有効な運動療法開発のために不可欠である。老化促進マウスなどのモデル動物の筋病理を解析し、また廃用性筋萎縮との違いを明らかにするために、ヒトの生検筋での解析も行い、サルコペニアの治療法と予防法の確立を目指す。関節拘縮や関節過伸展を伴う原因不明の症例についても遺伝子解析を行い診断確定する。

(1) 老化促進マウスを用いて、サルコペニアの筋病理を解析し、アポトーシスやオートファジーの関与の有無、サテライト細胞の機能、サテライト細胞のニッチである細胞外マトリックスの変化、筋成長因子の発現異常の有無などを解析する。

(2) 老化促進マウスを用いて、運動療法によるサルコペニアの予防効果を検討する。

(3) 筋生検の凍結標本を用いて、type 2 筋線維萎縮が主要病理所見である症例について、臨床的に再分類し、筋病理学的特徴を明らかにする。また年齢による筋病理所見の違いを明らかにする。

(4) 廃用性筋萎縮や悪性腫瘍に伴う筋萎縮などの二次性サルコペニアの症例を抽出し一次性サルコペニアとの相違点を明らかにする。

(5) 高齢者に多い封入体筋炎の中に比較的若年で発症する症例があり、通常の高齢発症例と比較することにより加齢による発症因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 老化促進マウス (SAMP1) を購入し、動物実験施設にて 50 週齢まで飼育する。

これらの SAMP1 マウスを無作為に、1 日 2 回、20 分のトレッドミル走行を行った強制運動高齢 SAMP1 群、ランニングホイールを用いた自発運動高齢 SAMP1 群、運動を行わない高齢 SAMP1 群に分け 8 週後 (58 週齢) に屠殺する。また、対照として 12 週齢の SAMP1 (若年 SAMP1 群) と 12 週齢 (若年 ICR 群) および 58 週齢 (高齢 ICR 群) の ICR マウスを用いる。各群はそれぞれ 5 匹を予定する。飼育中に経時的に体重測定や行動学的分析 (open-field test や物体認識テスト、1 時間の活動量計測など) を行う。骨格筋はヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋を採取し、通常組織化学的染色とともに各種抗体 (collagen VI, GDF11, PGC1- α , irisin, FNDC5, mTOR, IGF-1, PI3K, atrogen-1, PDGF receptor α , Pax7, MyoD, myogenin, beclin1, LC3, p62 など) を用いた免疫組織化学的染色および Western blotting などを行う。

(2) 各種筋疾患生検筋の凍結標本を用いて、type 2 筋線維萎縮が主要病理所見である症例について、臨床的に再分類し原因不明の一次性サルコペニアの症例を抽出し、筋病理学的な特徴を明らかにする。また年齢による筋病理所見の違いを検討する。また、廃用性筋萎縮や悪性腫瘍に伴う筋萎縮などの二次性サルコペニアの症例を抽出し一次性サルコペニアとの相違点を明らかにする。高齢者の骨格筋に目立つミトコンドリア異常を検索するため COX 染色、SDH 染色、電子伝達系

complex I-V の免疫染色などを行う。また増殖因子 (VEGF, FGF-1, FGF-2, TGF- β , GDF11) 筋衛星細胞 (Pax7, MyoD, myogenin, NCAM ほか)、細胞外マトリックス (collagen VI, heparan sulfate proteoglycan, tenascin ほか)、オートファジー関連因子 (LC3, beclin 1 ほか)、アポトーシス関連因子 (Fas, bcl-2 ほか) の変化についても検索する。

4. 研究成果

(1) 老化促進マウス (SAMP1) の検索では運動を行った群で beclin 1, LC3, p62 などのオートファジー関連因子発現が増加していた。筋重量は運動群と非運動群で有意差は認めなかった。SAMP1 マウスの定期的な行動解析 (open-field test や物体認識テスト、1 時間の活動量計測など) も実施した。その結果高齢 SAMP1 の物体認識テストでは物体認識回数に有意な低下がみられ、海馬を含む広範囲の領域で脳機能低下が示唆された。運動の脳機能に及ぼす効果については今後の検討が必要である。

(2) 患者生検筋の検索では転倒により大腿骨近位部骨折を呈した高齢女性の中殿筋の筋病理で、8 症例すべてにおいて type 2 筋線維萎縮が認められ、サルコペニアが存在する可能性が高いと考えられた。特に type 2 筋線維萎縮が著明に認められた 2 症例においては LC3 の著明な亢進と縁取り空胞が認められ、酸フォスファターゼ染色においては著明なリソソーム活性の亢進が認められた。これらのことより、サルコペニアとオートファジー異常の関連性が示唆された。

(3) 加齢の影響を受けた骨格筋において、オートファジーの異常がみられ、SAMP1 における運動は基底のオートファジー活性を高め、細胞内のクリアランスを保つ可能性が示唆された。運動による明らかな筋量の増加が見られなかったため、サルコペニアの予防のため

めにはより早期からの運動が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Yoshida T, Yoshida M, Kinjo M, Jonosono M, Higuchi I. Dropped head syndrome and the presence of rimmed vacuoles in a muscle biopsy in scleroderma-polymyositis overlap syndrome associated with anti-Ku antibody. Intern Med 57:887-891, 2018 (査読あり)

Hamano T, Matsunaga A, Yamamura O, Nakamura M, Kawamura Y, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y. Influenza A (H3N2)-induced rhabdomyolysis complicating anterior compartment syndrome: Serial changes in muscle MRI T2 fat suppression imaging. eNeurologicalSci 7:15-17, doi:10.1016, 2017 (査読あり)

Ueda Y, Suwazono S, Maedo S, Higuchi I. Profile of cognitive function in adults with Duchenne muscular dystrophy. Brain Dev. 39(3):225-230, 2017 (査読あり)

Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. Orphanet J Rare Dis. 11(1):146, 2016 (査読あり)

Hayashi K, Hamano T, Kawamura Y, Kimura

H, Matsunaga A, Ikawa M, Yamamura O, Mutoh T, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y. Muscle MRI of the Upper Extremity in the Myotonic Dystrophy Type 1. Eur Neurol, 76(1-2):87-94, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

高齢者骨折患者の筋量に関する研究

中村裕樹, 佐田直哉, 早田善幸, 石田 俊, 末永亮太, 松元 朗, 前島武蔵, 樋口逸郎, 窪田正大, 第19回日本骨粗鬆症学会 2017年10月(大阪)

中村裕樹, 中村彩乃, 窪田正大, 樋口逸郎, 入院骨折患者の骨格筋量測定の有用性, 第3回日本転倒予防学会学術集会, 2016年10月(名古屋)

園田 真祐美, 樋口逸郎, 松田 史代, 老化促進マウスを用いた加齢によるサルコペニアのオートファジー関与について, 第51回日本理学療法学会学術大会 2016年5月(札幌)

吉田尚弘, 遠藤 仁, 木内謙一郎, 林地のぞみ, 森本 聡, 樋口逸郎, 高嶋 博, 福田恵一, 佐野元昭, 市原淳弘, 加齢性骨格筋減少症における(プロ)レニン受容体 Wnt シグナルを介した新規分子機構, 第53回日本臨床分子医学会学術総会, 2016年4月, (東京)

樋口逸郎, 平松 有, 橋口昭大, 岡本裕嗣, 松浦英治, 高嶋 博, 次世代シーケンサーを用いた封入体筋炎のミトコンドリア異常の検索, 希少難治性筋疾患に関する調査研究班 IBM 分科会, 2016年2月(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 逸郎 (HIGUCHI Itsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80183573

(2)研究分担者

榊間 春利 (SAKAKIMA Hrutoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10325780

松田 史代 (MATSUDA Fumiyo)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：70437953