

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19280

研究課題名(和文)サルコペニアのメカニズム解明と治療可能性の検討

研究課題名(英文) Possible treatment for sarcopenia by inhibition of inflammation

研究代表者

矢可部 満隆 (YAKABE, Mitsutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10747265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアは全身の筋量と筋量減少を呈する症候群で、高齢者に多く見られるが、そのメカニズムは明らかになっておらず、治療法も確立されていない。我々は炎症と筋萎縮の関連に着目し、HMB(ロイシンの代謝産物)、ビタミンD、補中益気湯の効果を検討した。HMBとビタミンDには、筋萎縮モデルマウスの筋萎縮を軽減し、筋萎縮関連因子の上昇を抑制し、血中インターロイキン6の上昇を抑制する効果を認め、また補中益気湯が過酸化水素による筋細胞の炎症、障害を抑えることを示した。HMB、ビタミンD、補中益気湯が炎症抑制効果を介してサルコペニア治療に有益である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is an aging-related debilitating condition which is characterized by progressive loss of skeletal muscle mass and strength. The mechanism of sarcopenia is not elucidated and the treatment has not been established. We examined the involvement of inflammation in inducing muscle atrophy and how this involvement was affected by HMB (a metabolite of leucine), vitamin D and TJ-41 (a traditional herbal medicine). In tail suspended mice, which is a mouse model bearing muscle atrophy, HMB and vitamin D inhibited muscle atrophy, expression of atrophy-related genes, and elevation of the serum interleukin-6 level. TJ-41 ameliorated reactive oxygen-induced damage in myoblasts by inhibiting inflammation. We conclude that anti-inflammatory effects of HMB, vitamin D and TJ-41 might be therapeutic to sarcopenia.

研究分野：サルコペニア

キーワード：炎症 サルコペニア 筋萎縮 HMB ビタミンD 補中益気湯

## 1. 研究開始当初の背景

(1) サルコペニア (加齢性筋減少症) は高齢者でしばしば見られる症候群で、全身の筋肉量減少と筋力低下により特徴付けられる。サルコペニアは activities of daily living (ADL) の低下、身体機能障害をもたらす、死亡率の上昇につながる。未曾有の超高齢社会を迎えた日本では、サルコペニアの予防、治療法の確立は喫緊の課題である。

(2) サルコペニアの発症には下記のような様々なメカニズムの関与が示唆されているが、詳細は明らかになっていない。

### 1. タンパク合成能の低下

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) は Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) およびその下流の Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR) の細胞内シグナル伝達系を活性化させ、タンパク合成系を亢進させる。この IGF-1/Akt/mTOR 系は加齢により活性が低下する<sup>1</sup>。

### 2. 筋分解能亢進

Muscle-specific RING finger protein 1 (MuRF1) と Atrogin-1 は、筋特異的ユビキチンリガーゼとして 2001 年に同定された<sup>2</sup>。これらは筋萎縮因子とも呼ばれ、ノックアウトマウスでは筋萎縮をきたしにくい。高齢者や高齢ラットの骨格筋では筋萎縮因子が増加していることが報告されている。

### 3. 慢性炎症の関与

2000 年、Francesch らは "inflammaging (inflammation + aging)" という概念を提唱した<sup>3</sup>。これは、加齢と炎症には密接な関連があるという考え方である。加齢によりマクロファージから放出される炎症性サイトカインが増加し、全身性の low-grade な炎症が生じ、様々な老化関連疾患を引き起こす。サルコペニア発症にも inflammaging が関与している可能性がある。

### 4. 酸化ストレスの関与

サルコペニア発症には、活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) による筋衛生細胞の機能不全が関与していることが示唆されている。体内に取り込まれた酸素の一部は代謝の過程で ROS となる。細菌感染時、ROS は好中球、マクロファージからも産生され、細菌などの異物除去を助ける。一方、酸化作用と抗酸化作用の不均衡な状態は酸化ストレスと呼ばれ、周辺の細胞に機能障害を起こす。ROS は骨格筋からも産生され、特に superoxide, hydroxy radical, 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) が重要である。加齢、不活動のいずれも酸化ストレスの増加をもたらす<sup>4</sup>。

## (3) サルコペニアの薬物治療の可能性

### 1. アミノ酸

臨床・疫学研究から、タンパク質摂取がサルコペニアの予防、治療に有益な可能性が示唆されている。タンパク質摂取量の多い高齢者は摂取量の低い高齢者と比べて、骨格筋量

低下をきたしにくかった。ロイシンを含む必須アミノ酸製剤は、高齢者の筋力、身体機能を改善させた。ロイシンの代謝産物である  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) は、IGF-1/Akt/mTOR 系の強力な活性化作用を持つとされている。しかし摂取したロイシンの 5%程度からしか合成されず、食事のみでは十分量を摂取することは困難である。HMB 製剤は高齢者において筋力、身体機能を改善させたことが報告されている。

### 2. ビタミン D

血中 25(OH)D 濃度は体内のビタミン D 量を反映する。高齢者ではしばしば血中 25(OH)D 濃度の低値を認めるが、血中 25(OH)D 濃度低値はサルコペニアや死亡リスクを増大させることが報告されている。ビタミン D 摂取は転倒リスクを減少させることがメタ解析で示されており、筋力増加と関連がある可能性が示唆される。

### 3. 漢方薬

サルコペニアを東洋医学的に捉え、漢方薬で加療するという試みがなされている。

牛車腎気丸は SAMP8 マウスの骨格筋において、PGC1 $\alpha$  を介したミトコンドリア活性化作用、Akt 系を介した MuRF1 抑制作用を持ち、骨格筋量を改善させる。

補中益気湯 (TJ-41) は東洋医学の概念である「気虚」に対して用いられる。TJ-41 は LOH 症候群の患者で遊離テストステロンを増加させ、コルチゾールを低下させた。C2C12 筋芽細胞は、成熟した筋繊維の周囲に存在する衛生細胞に類似した性質を持つと考えられる。

しかし、漢方薬がサルコペニアを改善させる効果は明らかでなく、そのメカニズムは十分に解明されていない。

テストステロンを高齢男性に投与することで、筋力とタンパク合成能が増加したという報告がある。一方テストステロンには前立腺癌などの副作用があり、補充療法を行いにくい一因となっている。漢方薬またはその構成成分で、骨格筋においてテストステロンと同様の作用を持つ物質を発見できれば、サルコペニア治療に有益な可能性がある。

(4) Interleukin-6 (IL-6) はマイオカインと炎症性サイトカインの両方の側面を持つとされる。運動により筋収縮が起きると、筋肉から IL-6 が分泌され、血中濃度が大きく増加する。一方高齢者で、血清 IL-6 濃度と筋肉量の間には逆相関を認めたとする報告がある。骨格筋が炎症性サイトカインである IL-6 に慢性的に暴露されることで、サルコペニアの発症に関与する可能性が示唆される。しかし IL-6 と筋萎縮の関連、そのメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1) サルコペニアモデルマウスに薬剤を投与して骨格筋量の改善効果を検討し、そのメカ

ニズムを明らかにする。

(2)C2C12 筋芽細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与し、筋衛生細胞が酸化ストレスで障害された状態のモデルとする。ここに薬剤を投与することにより、酸化ストレスからの細胞保護効果を検討し、その分子レベルでのメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 後肢懸垂モデルマウスは、マウスの後肢に負荷がかからない状態にすることで廃用性筋萎縮を生じさせるモデルであり、簡便な筋萎縮モデルとして利用されてきた。ケージの上部に針金で作ったクロスバーを設置した。マウスの尾全体を包むように医療用紙テープを貼り付け、その先端にクリップを止め、クリップをクロスバーに取り付けた。これによりマウスは、後肢を挙上した状態で自由にケージ内を移動し、餌や水にアクセスできる状態となる。

マウスには後肢懸垂の1週間前から後肢懸垂の期間中、毎日経口的にビタミンD、HMBを投与した。所定の期間後肢懸垂を行ってから、二酸化炭素により安楽死させた。ヒラメ筋重量測定、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による筋萎縮因子の定量、Hematoxylin-Eosin(HE)染色による筋線維断面積測定を行った。また血中IL-6濃度をELISA法により測定した。他に、IL-6受容体のモノクローナル抗体を後肢懸垂マウスに投与し、その効果を検討した。

(2)TJ-41の粉末1gを水、エタノール、ジメチルスルホキシド(DMSO)の各溶媒10mLに溶解し、SONIFIER®により超音波破碎し、成分を抽出した。マウス由来の筋芽細胞であるC2C12にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を投与して2時間培養することで、炎症、アポトーシスを誘導した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与の1時間前からテストステロンやTJ-41の抽出物の前投薬を行い、これらが炎症性サイトカインの発現増加、アポトーシス、タンパク分解亢進、タンパク合成低下などに与える影響を検討した。

またヒト前立腺癌由来の細胞であるLNCaPにPSA luciferase vectorのトランスフェクションを行い、テストステロンおよびTJ-41の作用を検討した。

### 4. 研究成果

(1)後肢懸垂モデルマウスでは2週間の懸垂により後肢の萎縮、筋重量の低下をきたしたが、HMB、ビタミンDの投与はこれらを有意に抑制した(Fig 1)。後肢懸垂モデルマウスでは血中IL-6濃度の増加を認めたと、HMB、ビタミンDはその濃度上昇を抑制した。後肢懸垂モデルマウスでは懸垂開始後3日目の時点でMuRF1、Atrogin-1の発現増加を認めるが、HMB、ビタミンDはその発現を有意に抑制した(Fig. 2)。IL-6受容体のモノクローナル抗体は、後肢懸垂による筋萎縮を有意に抑制した。

以上より、後肢懸垂による筋萎縮発症にはIL-6が関与していることが示唆された。またHMB、ビタミンDはIL-6の発現を抑制することにより、筋萎縮を軽減すると考えられた。

Fig. 1

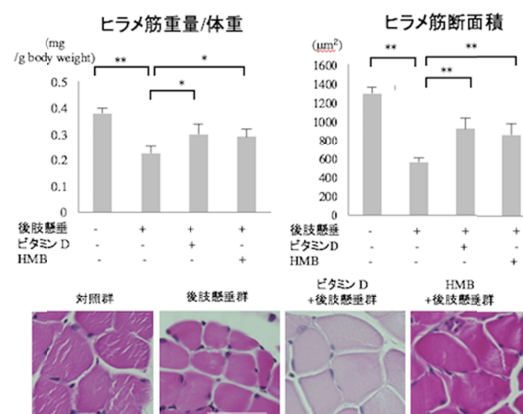
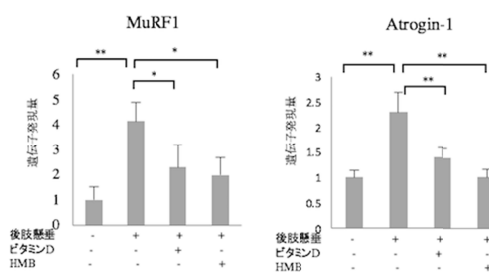


Fig. 2



(2)C2C12 筋芽細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与すると IL-6 の発現が誘導されたが、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現は増加しなかった。そのため我々は IL-6 の動態に着目した。TJ-41 の水抽出物、エタノール抽出物は IL-6 の発現を抑制しなかったが、DMSO 抽出物は発現を有意に抑制した。TJ-41 は 10 種類の生薬から構成されている。我々はその 1 つであるオウギの主要成分の astragaloside-4 (As-4) に着目した。As-4 は、マウスのマクロファージ様細胞である RAW264.7 に LPS を投与することで誘導された IL-6 と MCP-1 の発現を、濃度依存性に抑制した。しかし C2C12 に誘導された IL-6 の発現は、As-4 によって抑制されなかった。そのため、TJ-41 には As-4 以外にも抗炎症効果のある成分を含む可能性が示唆された。さらに、TJ-41 の水抽出物はテストステロンと同様、分化誘導した C2C12 筋管の myogenin 発現を増加させた。

LNCaP を用いた luciferase assay で、テストステロン投与により PSA luciferase 活性が上昇したが、TJ-41 の抽出物はいずれも活性を上昇させなかった。

以上より TJ-41 は、前立腺癌を増悪させることなく、酸化ストレスで生じる炎症を抑制する効果、筋分化マーカーの上昇効果を持ち、

サルコペニア予防、改善につながる多面的な作用を持つ可能性が示唆された。

研究者番号： 20323579

(3) 以上の通り、我々は、HMB、ビタミン D が抗炎症効果により筋萎縮を抑制すること、TJ-41 が筋を酸化ストレスによる障害から保護することが示した。そしてこれらの薬剤がサルコペニア治療に有益である可能性が示唆された。

<引用文献>

<sup>1</sup>Parkington JD *et al.* J Appl Physiol 2004; 97: 243-248.

<sup>2</sup>Gomes MD *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:14440-14445

<sup>3</sup>Franceschi C *et al.* Ann N Y Acad Sci. 2000; 908: 244-254.

<sup>4</sup>Derbré F *et al.* Eur J Sport Sci. 2014; 14: S98-108

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sumito Ogawa, Mitsutaka Yakabe, Masahiro Akishita “Age-related sarcopenia and its pathophysiological bases” Inflammation and Regeneration 2016; 36: 17

Mitsutaka Yakabe, Sumito Ogawa, Masahiro Akishita “Clinical Manifestations and Pathophysiology of Sarcopenia” Biomedical Sciences 2015; 1: 10-17

Mitsutaka Yakabe, Sumito Ogawa, Hidetaka Ota, Katsuya Iijima, Masato Eto, Yasuyoshi Ouchi, Masahiro Akishita “Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate Inhibits Lipopoly-saccharide-induced Interleukin-6 Expression by Increasing Protein Phosphatase-1 $\alpha$  Expression” Biomedical Sciences 2015; 1: 1-5

[学会発表](計1件)

第2回日本サルコペニア・フレイル学会大会「HMB ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate) による廃用性筋萎縮回復効果の検討」矢可部満隆、小川純人、大内尉義、秋下雅弘、伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢可部 満隆 (YAKABE, Mitsutaka)  
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10747265

(2)研究協力者

小川 純人 (OGAWA, Sumito)  
東京大学・医学部附属病院・准教授