

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07182

研究課題名(和文)サルコペニア肥満に対する温熱刺激の有用性の検証

研究課題名(英文)Effect of heat stress on body fat mass and muscle mass in mice with sarcopenia obesity

研究代表者

後藤 亜由美(Goto, Ayumi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：20780969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では温熱刺激がサルコペニア肥満における筋量ならびに全身糖代謝に及ぼす影響について評価した。サルコペニア肥満モデルマウスに温熱刺激を与えたところ、筋量減少の抑制には効果がなかった。一方で温熱刺激は血漿インスリン濃度を低下させ、インスリン抵抗性の改善が認められた。さらに、温熱刺激は骨格筋組織内の解糖系に関連する酵素の発現を増加させた。したがってサルコペニア肥満における温熱刺激は、全身の糖代謝を改善させる有用な治療法になりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine whether in vivo heat treatment can improve an increase in body fat mass, a decrease in muscle mass and glucose tolerance in mice with sarcopenic obesity. According to the results, heat treatment had no effect on body weight, epididymal fat or lower-limb muscle mass in sarcopenic obesity. Fasting blood glucose levels did not change significantly with heat treatment. In contrast, heat treatment resulted in a decreased fasting plasma insulin level. Furthermore, we were able to identify three key enzymes from the glycolytic pathway upregulated by heat treatment, through comprehensive proteomic approaches. Our results indicate that heat treatment improves insulin resistance and the glycolytic pathway in a mice model with sarcopenic obesity. We suggested that heat treatment could be a potential therapeutic treatment for sarcopenic obesity-induced insulin resistance.

研究分野：健康科学

キーワード：骨格筋 温熱刺激 サルコペニア サルコペニア肥満 肥満

## 1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う筋量減少(サルコペニア)と肥満の両方を併せ持つ状態である「サルコペニア肥満」が寝たきり高齢者を増加させる要因であることが問題となっている。しかしながら、サルコペニア肥満における寝たきり「発症リスクの加速」の原因は特定されておらず、その解明は高齢者の寝たきり予防や健康寿命の増進に極めて重要である。

サルコペニア肥満によって生じる筋量減少や肥満に対する治療には、適切な運動の励行が重要である。筋量減少に対しては、筋肥大効果を有するレジスタンス運動が有用である。一方、肥満に対しては、脂肪燃焼効果の高い有酸素運動が推奨されている。筋量減少と肥満を併せ持つサルコペニア肥満に対しては、両者を組み合わせた運動処方が必要とされるが、体力の衰えた虚弱な高齢者にとっては、身体への負担が大きくなりリスクが高い。そこで、高齢者にとって負担の少ない『温熱刺激』効果に着目した。この温熱刺激は、筋肥大効果(Goto K, et al. 2011)や肥満ラットの脂肪量増加抑制およびインスリン抵抗性の改善による脂肪燃焼効果を有することが明らかにされている(Gupte AA, et al. 2009)。また、これまでに申請者は温熱刺激が骨格筋糖代謝を活性化し、肥満改善作用を有する可能性を生化学的に証明した(Goto A, et al. 2015)。したがってサルコペニア肥満における筋量減少と肥満に対抗する治療法として温熱刺激が有用ではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の最終ゴールは、サルコペニア肥満による筋量減少ならびに肥満の改善に低リスクで有効な治療法となる基礎的知見の確保、さらには治療法を進展させた予防法の基盤を確立することである。そこでまずはサルコペニア肥満モデルを作成し、温熱刺激の改善効果の有用性を骨格筋形態学的ならびに生化学的な観点から検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

本研究では、生後 20 ヶ月齢の C57BL/6J 雄性マウス(22 匹)を用い、無作為に 1) 対照(CON)群、2) サルコペニア肥満(HFD)群、3) サルコペニア肥満 + 温熱刺激(HS)群に分類した。

### (2) 高脂肪食負荷

HFD 群および HS 群は高脂肪食飼料(脂肪分 60% カロリー比)を 20 週間与えることで肥満を誘発させた。一方の CON 群においては、通常飼料(脂肪分 10% カロリー比)を与えた。

### (3) 温熱刺激

高脂肪食負荷 8 週間後、HS 群へは先行研究(Gupte AA, et al. 2009, Yoshihara T, et al. 2015)を参考に、恒温恒湿培養器で 40-41℃、60 分、1 回/週、12 週間実施した。

### (4) 糖負荷試験

温熱刺激がサルコペニア肥満における糖代謝に及ぼす影響を評価するために、高脂肪食負荷前ならびにサンプル採取 1 週間前に糖負荷試験を実施した。この際、マウスには 12 時間以上の絶食状態を施し、マウス尻尾より空腹時血糖を測定した後に、腹腔内へ 2g/kg body weight のグルコースを投与し、経時的に血糖値を測定した。

### (6) 筋機能テスト

温熱刺激がサルコペニア肥満における筋機能に及ぼす影響を評価するために、サンプル採取 1 週間前に Grip strength test (MK-380CM/R)を実施し、マウス上肢筋の握力を測定した。

### (5) サンプル採取

12 時間以上の絶食状態にしたマウスより体重を測定した後、イソフルラン麻酔下にてマウスから血液を採取し、遠心分離にて血漿成分を分離して -80℃ にて保存した。またペントバルビタールの過剰投与による安楽死させた後、マウスより精巢上体脂肪組織ならびに下肢骨格筋を採取し、重量を測定した後に液体窒素にて急速凍結し、その後 -80℃ にて保存した。

### (6) 筋発揮張力テスト

温熱刺激がサルコペニア肥満における筋発揮張力に及ぼす影響を評価するために、長趾伸筋を用いて緩衝液を介した電気刺激にて 500msec 間で 1、20、40、60、80、100、150、200Hz の頻度で刺激し、張力を記録した。また、5 分間の休息の後、疲労曲線を測定するために、100Hz、500msec duration で 50 回刺激を与えて、張力を測定した。長趾伸筋の筋の長さや重さを測定し、推定の筋横断面積を求め、横断面積あたりの張力(Specific tension、mN/mm<sup>2</sup>)を算出した。Data は PowerLab (ADInstruments, Australia) でデジタル変換して、LabChart (ADInstruments, Australia) で取得した。

### (5) プロテオーム解析

サルコペニア肥満モデルにおける温熱刺激の影響を網羅的に解析するために、プロテオーム解析を実施した。まず、採取した大腿四頭筋を protease inhibitor と phosphatase inhibitor を含むタンパク質抽出液を用いてホモジネートし、ピシンコニン酸法によりタンパク質を定量測定した。その後タンパク質量を一定にし、プロテオーム解析受託サービ

ス(コスモバイオ)により、二次元電気泳動ならびに比較解析受託サービスを依頼した。また、二次元電気泳動ならびに比較解析によりサンプル間の発現量に大きな変動が認められ、かつ、切り出しやすいタンパク質スポットを任意に選定し、液体クロマトグラフィ-質量分析(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS)分離分析装置によりタンパク質の同定を行った。測定により得られたペプチド及びペプチドのフラグメント質量値の解析には、タンパク質同定関連ソフトウェアである Mascot (MATRIX SCIENCE 社)を用い、データベースには Swiss-Prot を使用した。

#### (6) ウェスタンブロットニング

ホモジネートした大腿四頭筋抽出液からウェスタンブロット法を用いて、heat shock protein (HSP) 72 の発現量を定量評価した。細胞内への内在性コントロールには  $\alpha$ -actin を用いた。

#### (8) 血液データの解析

得られた血漿サンプルを用いて、インスリン(超高感度マウスインスリン測定キット、株式会社森永生科学研究所)の濃度を測定した。また、得られた空腹時インスリン濃度と空腹時血糖値からインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を算出した。

### 4. 研究成果

(1) 温熱刺激が骨格筋組織内 HSP72 の発現量に及ぼす影響

大腿四頭筋組織内の HSP72 の発現量は、CON 群および HFD 群と比較して HS 群で有意な発現増加が認められた ( $p < 0.05$ )。温熱刺激を哺乳類骨格筋に負荷すると、ストレス応答により HSP72 の発現が誘導されることが報告されている。したがって上記の結果より、本研究における温熱刺激が適切に処置できていることを確認した。

(1) 温熱刺激がサルコペニア肥満における脂肪燃焼効果に及ぼす影響

CON 群と比較し HFD 群および HS 群では体重ならびに精巢上体脂肪組織の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。したがって本研究における高脂肪食負荷は、適切に肥満を誘発することを確認した。しかしながら HFD 群と HS 群の間に有意な変化は認められず、温熱刺激における脂肪燃焼効果を確認することはできなかった。

(2) 温熱刺激がサルコペニア肥満における筋肥大効果に及ぼす影響

筋組織は体重当たりの重量を算出し、骨格筋量の変化を評価した。体重当たりの骨格筋量(ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋、長趾伸筋、前脛骨筋、大腿四頭筋)は CON 群と比較し HFD 群および HS 群で有意に低値を示したが、HFD

群と HS 群の間に有意差は認められず、温熱刺激における筋肥大効果を確認することはできなかった。

上肢筋の Grip strength テストにおいては、体重当たりの相対的筋力は CON 群と比較し HFD 群および HS 群で有意に低値を示したが、HFD 群と HS 群の間に有意差が認められなかった。一方の長趾伸筋における筋横断面積当たりの発揮張力に関しては、CON 群と比較すると HFD 群で低値を示す傾向がみられた。また、HS 群は HFD 群より高値を示す傾向がみられたものの有意差は認められなかった。しかしながら J.Cohen の示す大きな効果量(Large)の 0.8 を上回る  $d = 0.8223$  となり平均値の差は明らかに異なっていた。温熱刺激における筋機能では有意な改善を確認することはできなかった。

(3) 温熱刺激がサルコペニア肥満における全身糖代謝機能に及ぼす影響

空腹時血糖においては、CON 群と比較し HFD 群および HS 群では有意に高値を示し ( $p < 0.05$ )、高脂肪食負荷による耐糖能障害が確認できた。しかしながら、HFD 群と HS 群の間に有意な変化は認められなかった。さらに、糖負荷試験によって得られる Area under the curve においても、CON 群と比較し HFD 群および HS 群で有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ ) が、HFD 群と HS 群との間に有意な変化は認められなかった。一方の血中インスリン濃度においては、CON 群と比較し HFD 群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) が、HS 群は HFD 群と比較すると有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。さらに、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、CON 群と比較し HFD 群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) が、HS 群は HFD 群と比較すると有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )。温熱刺激によるインスリン抵抗性の改善が認められた。

(4) 温熱刺激がサルコペニア肥満における筋組織内のタンパク質発現に及ぼす影響

二次元電気泳動による解析により、HFD 群と HS 群とのサンプル間でタンパク質発現量の変化が 1.5 倍以上あったスポットに関する Intensity 値では、HFD 群と比較して HS 群で増加したスポットが 21 個、減少したスポットが 21 個存在することを確認した。さらに、スポットを任意に選定し、LS-MS/MS でタンパク質を同定したところ、HS 群では HFD 群と比較して解糖系酵素 (Triosephosphate isomerase、Phosphoglycerate mutase、Beta-enolase)、グリコーゲン分解の律速酵素である Glycogen phosphorylase やカルシウム結合タンパク質 (Calsequestrin、Sarcalmenin) の発現量が増加していた。

本研究における温熱刺激は、サルコペニア肥満における脂肪燃焼効果ならびに筋肥大効果に有意な影響を及ぼさなかった。一方で

温熱刺激は、サルコペニア肥満におけるインスリン抵抗性の改善と骨格筋糖代謝における解糖系関連酵素の発現を増大させた。したがってサルコペニア肥満における温熱刺激は、全身の糖代謝を改善させる有用な治療法になりえる可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

- 1) Egawa T, Ohno Y, Yokoyama S, Goto A, Ito R, Hayashi T, Goto K. The effect of advanced glycation end products on cellular signaling molecules in skeletal muscle. J Phys Fitness Sports Med. in press. (査読あり)
- 2) Goto A, Sekine K, Oshima R, Sakon I, Iwamoto M, Osaki T, Haga K, Hayashi T, Egawa T. The effect of short-term heat stress on protein synthesis signaling in isolated rat skeletal muscle. J Phys Fitness Sports Med. 7 (1) : 87-93, 2018. (査読あり)  
DOI : 10.7600/jpfsm.7.87
- 3) Egawa T, Tsuda S, Goto A, Yokoyama S, Ohno Y, Goto K, Hayashi T. Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice. Br J Nutr. 117 (1): 21-29, 2017. (査読あり)  
DOI : 10.1017/S0007114516004591.
- 4) 後藤亜由美, 江川達郎, 林達也. 短時間の温熱刺激が骨格筋糖輸送活性促進に及ぼすメカニズムの解明. デサントスポーツ科学 38 : 151-158, 2017. (査読なし)
- 5) Egawa T, Ohno Y, Goto A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K. Caffeine affects myotube size as well as regulates protein degradation and protein synthesis pathways in C2C12 skeletal muscle cells. J Caffeine Res. 6 (2) : 88-96, 2016. (査読あり)  
DOI : 10.1089/jcr.2015.0034

[学会発表](計 16 件)

- 1) Goto A, Tsuzuki T, Yoshihara T, Furuichi S, Tsukioka K, Zhi L, Kakigi R, Naito H. Effect of acute immobilization on the expression levels of atrophy-related ubiquitin ligase in mice fed a high-fat diet. The 3rd Congress, International Academy of Sportology, Tokyo, Japan. October,

2017.

- 2) 後藤亜由美, 都築孝允, 吉原利典, 柿木亮, 古市真也, 月岡恵惟, 内藤久士. 肥満が廃用性筋萎縮に伴う筋萎縮関連遺伝子の発現に及ぼす影響. 第 72 回日本体力医学会大会, 愛媛, 2017 年 9 月
- 3) Goto A, Egawa T, Sekine K, Sakon I, Oshima R, Tsuda S, Hayashi T. Short-term heat stress stimulates glycogen and protein metabolism in rat skeletal muscle. APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII, 12.1, Phoenix, Arizona, USA, November, 2016.
- 4) 後藤亜由美, 江川達郎, 関根圭一, 大島里詠子, 佐近一翔, 津田諭志, 林達也. 短時間の熱刺激が骨格筋タンパク質ならびにグリコーゲン代謝に及ぼす影響. 第 71 回日本体力医学会大会, 岩手, 2016 年 9 月
- 5) 後藤亜由美, 江川達郎, 関根圭一, 佐近一翔, 大島里詠子, 津田諭志, 林達也. 短時間の熱刺激が骨格筋糖代謝に与える影響. 第 51 回日本理学療法学会大会, 札幌, 2016 年 5 月

[図書](計 1 件)

- 1) Egawa T, Tsuda S, Oshima R, Goto A, Ma X, Goto K, Hayashi T. Regulatory mechanism of skeletal muscle glucose transport by phenolic acids. In: Phenolic Compounds-Biological Activity (Soto-Hernández RM. eds.), InTech, pp. 169-191, March 2017.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 亜由美 (GOTO, Ayumi)  
順天堂大学・大学院医学系研究科  
スポーツロジセンター・博士研究員  
研究者番号 : 20780969

##### (2) 研究連携者

内藤 久士 (NAITO, Hisashi)  
順天堂大学・大学院スポーツ健康研究科・教授  
研究者番号 : 70188861

柿木 亮 (KAKIGI, Ryo)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号 : 70614931

吉原 利典 (YOSHIHARA, Toshinori)

順天堂大学・COI プロジェクト室・  
特任助教  
研究者番号：20722888

都築 孝允 (TSUZUKI, Takamasa)  
順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教  
研究者番号：20780068