

平成30年 6月19日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16604

研究課題名(和文)女性特有のサルコペニア発症メカニズムの解明と治療応用

研究課題名(英文) Disease developing mechanism of Sarcopenia specific to women

研究代表者

北島 百合子 (KITAJIMA, Yuriko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：40380901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋に発現する生理的意義が不明であるエストロゲン受容体(ERb)に着目し、老化促進および遺伝子改変雌マウスを用いて、エストロゲンが骨格筋に及ぼす影響の分子メカニズムを解明することを目的とした。老化促進マウスでは、通常飼料をあたえると筋力が有意に低下し、筋横断面積は萎縮したが、豆乳食では筋力・横断面積ともにコントロールマウスと同程度であった。次にERbを性成熟期早期に短期間骨格筋特異的に欠損させた場合、筋力・筋量ともに有意に低下したが、成熟期後期に欠損させても有意差が認められなかった。骨格筋の成長課程でのERbを介する女性ホルモンの作用が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：There have been few researches focused on the physiology of skeletal muscle in the view of sexual specificity. Estrogen receptor beta (ERb), which physiological significance was unclear on skeletal muscle, may have roles. In this study, we evaluated the effects of estrogen deficiency and supplementations of estrogen-related nutrient on the skeletal muscles using senescence accelerated mice (SAMP) and skeletal muscle-specific ERb-knockout mice. Muscle strength and cross-sectional area of SAMP with normal feed were significantly reduced comparing to those of control. But SAMP had soy-milk rich feed, which contain estrogen-like isoflavone, were not reduced. Muscle strength and volume of skeletal muscle-specific ERb-knockout mice at early sexual maturation stage were significantly reduced comparing to those of control, but unchanged in those mice at late. Estrogen and its signaling pathway via ERb may play an important role in the functions and maturations of skeletal muscle.

研究分野：女性医学 内分泌学

キーワード：骨格筋 エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う骨格筋の衰え（サルコペニア）に対する意識が高まってきている。国内外の研究により、女性は閉経後には毎年0.6%ずつ筋重量が減少し、1.2%ずつ筋力が低下することが分かっている（Rolland *et al.*, 2007）。加齢による骨格筋の衰えは転倒リスクを高めることから、転倒からの骨折・寝たきりを回避するための「転ばぬ先の杖」として、筋量を維持・増加させることは、健康寿命の延長や高騰する医療費の削減のために極めて重要な課題となる。女性の場合、加齢とともに閉経し、エストロゲンが欠乏することで骨量減少から骨粗鬆症を招きやすくなる。骨に対する研究は近年進んでおり、治療法も確立されつつあるが、エストロゲン欠乏が骨格筋へ与える影響はほとんど分かっていない。

最近の研究で、骨格筋におけるエストロゲン受容体が確認され、古典的な生殖細胞・組織への働きとは異なるエストロゲン作用が指摘されている(Mauvais-Jarvi *et al.*, 2011)。申請者はこれまでに、卵巣を摘出してエストロゲンを欠乏させた若齢雌マウス(OVX)を用い、卵巣摘出8週間後から前脛骨筋の筋横断面積が顕著に萎縮することを明らかにした。また、OVXマウスは筋線維のタイプが速筋化(タイプIIb割合の増加)し、遅筋化をともなう男性のサルコペニアとは異なるメカニズムの存在を明らかにした。さらに、骨格筋の成長、修復・再生、肥大に重要な役割を担っている骨格筋の組織幹細胞(サテライト細胞)に着目し、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏マウスのサテライト細胞数を数えたところ、非卵巣摘出群と比べ変化は認められなかったが(Kitajima *et al.*, 2015)、初代培養系でサテライト細胞の機能を評価すると、筋分化・自己複製能は著しく低下することを見出した。すなわち、エストロゲン欠乏状態は、骨格筋だけでなく筋幹細胞であるサテライト細胞にも影響を与え、筋萎縮や筋力低下、筋再生不良を引き起こす

ことを明らかにした。しかしながら、エストロゲン欠乏に加齢が加わるとき、その影響の程度と詳しいメカニズムは未だ不明な点が多い。さらに、エストロゲンが骨格筋に対して直接的に作用するのか、他の作用を介して影響するのかはいずれも不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、「加齢に伴うエストロゲン低下が女性特有の筋量低下、筋力低下に影響する」と仮説を立て、加齢促進マウスを用いてエストロゲンの骨格筋への作用を解明することを目的とした。さらに、エストロゲン様作用を持つイソフラボンを含む豆乳を摂取させ、骨格筋への効果を確認した。また、骨格筋特異的にエストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )をノックアウトしその役割を検証した。主な検討項目は以下の2点である。

- (1) 加齢によるエストロゲン欠乏が骨格筋に与える影響とエストロゲン作用を有する豆乳の骨格筋への影響を検討する。

限られた研究期間内で骨格筋の加齢変容を検証する試験的研究モデルとして開発された老化促進マウス(SAMP8マウス)は、比較的短時間で老化の影響がみられ、骨格筋においても十分解析が可能である。本研究では、SAMP8マウスを用いて、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏によって起こる骨格筋の萎縮および筋力低下、骨格筋の速筋化が、加齢によるエストロゲン欠乏でも認められるかを検討する。また、エストロゲン様作用を持つイソフラボンを含む豆乳を摂取させ、骨格筋への影響を検討した。

- (2) 骨格筋特異的エストロゲン受容体の機能阻害マウスを用いたエストロゲンの生理的作用点の検討

エストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )遺伝子を不活性化したマウスを用いた研究から、骨格筋の成長や再生にはER $\beta$ が重要であると報告されている(Velders *et al.*, 2012)。しかし、骨格筋に

発現する ERβ の働きが重要であるのか、それとも他の臓器に発現する ERβ を介したもののか、その作用点は不明である。そこで本研究では、骨格筋特異的に ERβ 遺伝子を不活性化できるマウスを用い、不活化させる時期を変化させ、骨格筋の成長にエストロゲンの生理的作用点が与える影響について検討する。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、期間範囲内に以下の検討を行った。

#### (1) 加齢によるエストロゲン欠乏が骨格筋に与える影響とエストロゲン作用を有する豆乳の骨格筋への影響の検討

本研究では、SAMP8 マウスを用いて、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏によって起こる骨格筋の萎縮および筋力低下、骨格筋の速筋化、再生不良が、加齢によるエストロゲン欠乏でも認められるかを以下の4項目で検証した。さらに、SAMP8 マウスを用いて、エストロゲン作用を持つイソフラボンを豊富に含む豆乳を通常食の22.7%だけ置換した飼料(豆乳食;大豆たんぱく質10%相当)を与え、加齢によるエストロゲン欠乏に伴う筋萎縮や筋力低下に対し、予防改善効果があるかを同様に以下の4項目で検討した。

##### ① 筋横断面積からの筋量評価

前脛骨筋を剖出し、筋横断切片の基底膜の免疫組織染色により、筋線維を可視化することで、筋線維の萎縮程度を評価した。

##### ② 筋力測定による筋機能評価

小動物用握力測定装置(ラボに導入済)を用いて、四肢の筋力を測定した。

##### ③ 免疫組織染色法による筋線維タイプ(速筋, 遅筋)の評価

前脛骨筋の筋横断切片を作成し、免疫組織染色により、筋線維タイプ(IIb, IIx, IIa, I)の割合を計測した。

##### ④ 筋損傷刺激後の筋再生能評価

骨格筋の再生能を評価するために、薬剤(カルジオトキシン)を前脛骨筋に筋注し、筋損傷を与えた。2週間後に筋横断切片を作成し、ラミン染色により再生筋の横断面積の大きさを定量した。

#### (2) 骨格筋特異的エストロゲン受容体の機能阻害マウスを用いたエストロゲンの生理的作用点の検討

本研究では、Acta1-rtTA/tetO-Cre:ERbeta-floxed マウス(AT0;ERbf/f)(骨格筋特異的にERβ(エストロゲン受容体β)を欠損するマウス)を作製し、性成熟期早期(6~8週)と性成熟期後期(20週)にそれぞれERβを不活化させた。骨格筋の発生、再生におけるERβ機能阻害の影響を2項目:①筋横断面積・重量からの筋量評価、②筋力測定による筋機能評価で検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 加齢促進マウスにおけるエストロゲン欠乏が骨格筋に与える影響と豆乳の骨格筋への影響

##### ① 筋横断面積からの筋量評価

SAMP8では通常食群で有意な筋萎縮を認めたが(1840.2±58.4μm<sup>2</sup>)、豆乳食群ではコントロールマウス(SAMR1)と同程度(2180.7±69.4μm<sup>2</sup> vs. 2233±105.7μm<sup>2</sup>)であった(図1)。加齢による筋萎縮は豆乳摂取により改善を認めた。

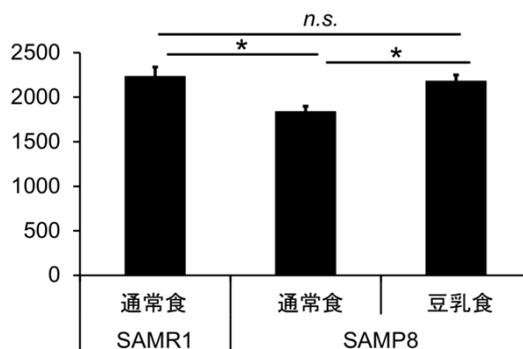


図1. 筋線維の横断面積(μm<sup>2</sup>)

##### ② 筋力測定による筋機能評価

SAMP8では通常食群で有意な筋力(握力)低下(3.14±0.14N)を認めたが、豆乳食群ではコントロールマウス(SAMR1)と同程度(3.64±0.16N vs. 3.71±0.18N)であった(図2)。

##### ③ 免疫組織染色法による筋線維タイプ(速筋, 遅筋)の評価

SAMP8の通常食群、豆乳食群、SAMR1の通常食群の筋線維タイプを検討したが、3群間に有意な差は認めなかった。

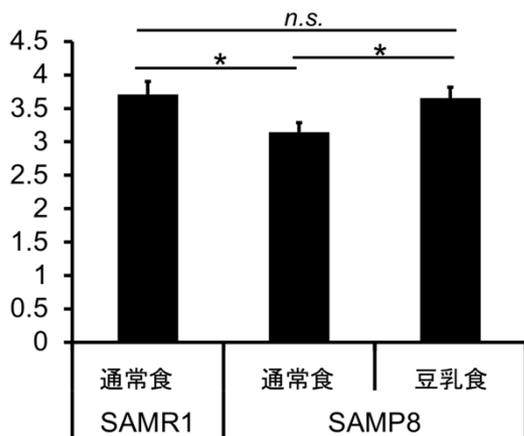


図2. 握力 (N)

④ 筋損傷刺激後の筋再生能評価

骨格筋の再生能を評価するために、薬剤（カルジオトキシン）を前脛骨筋に筋注し、筋損傷を与えた。2週間後に筋繊維横断面積を測定し比較した。SAMP8 の通常食群では横断面積(1094.7 ± 29.2 μm<sup>2</sup>)は優位に小さく(p=0.03)、SAMP8 の豆乳食群(1354.9 ± 90.5 μm<sup>2</sup>)では SAMR1(1246.8 ± 88.8 μm<sup>2</sup>)と同程度の面積まで再生を認め、高い筋再生能を維持していた (図3)。

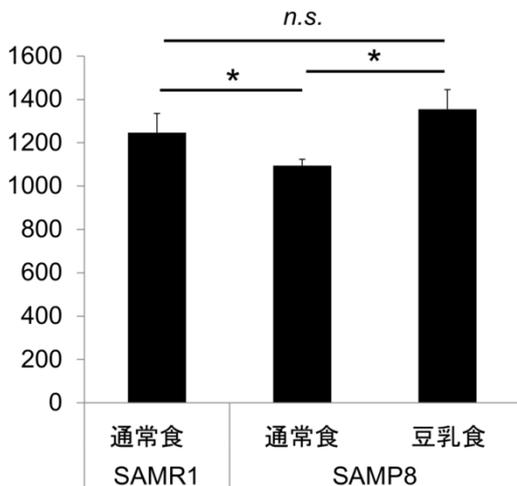


図3. 再生筋線維の横断面積 (μm<sup>2</sup>)

(2) 骨格筋特異的エストロゲン受容体の機能阻害マウスを用いたエストロゲンの生理的作用点の検討

骨格筋特異的に ERβ 遺伝子を不活性化できるマウスを用い、性成熟期早期と性成熟期後期にそれぞれ ERβ を不活化させた。

① 筋横断面積・重量からの筋量評価

ERβ を性成熟期早期に欠損させると筋重量、横断面積はコントロールと比較して優位に低下した。しかし、性成熟期後期に欠損させると筋重量、横断面積は低下をみとめなかった。

② 筋力測定による筋機能評価

ERβ を性成熟期早期に欠損させると筋力はコントロールと比較して優位に低下した。しかし、性成熟期後期に欠損させると筋力は低下をみとめなかった。

性成熟期早期の骨格筋形成にはエストロゲン受容体βを介するシグナルが重要であることが示唆された。

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 1 件)

① 北島百合子、江草信太郎、小野悠介  
女性アスリートの三主徴とエストロゲン欠乏が骨格筋に与える影響  
日本スポーツ栄養研究誌、査読なし、vol. 10 p83-90 2017

[学会発表] (計 4 件)

① 北島百合子、増崎英明  
女性の加齢に伴う筋萎縮、筋力低下に対する豆乳の効果

第 69 回日本産科婦人科学会学術集会 2017 年

② 北島百合子、小川静香、江草信太郎、小野悠介、増崎英明

加齢に伴う筋萎縮、筋力低下に対する豆乳の効果、第 31 回日本女性医学学会学術集会 2016 年

③ 北島百合子、小野悠介

骨格筋の恒常性維持における豆乳摂取の可能性、第 3 回スポーツ栄養学会、2016 年

④ 北島百合子、小川静香、江草信太郎、小野悠介

加齢に伴う筋萎縮、筋力低下に対する豆乳の効果、第 71 回日本体力医学大会 2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北島 百合子 (KITAJIMA, Yuriko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・  
助教  
研究者番号：4038091

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし