

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：33918

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11296

研究課題名（和文）悪液質に由来する骨格筋機能低下の病態制御を基盤とした新規予防・治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel preventive and therapeutic strategies based on pathological control of cachexia-induced skeletal muscle dysfunction

研究代表者

岩田 全広（Iwata, Masahiro）

日本福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：60448264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、温熱刺激またはビタミンD投与が悪液質による代謝異常とそれに伴う筋萎縮の進行過程に及ぼす影響ならびにその作用機序を解明することであった。その成果として、（1）温熱刺激はHSP72の発現増加を介してグルココルチコイド受容体の核移行を阻害することで、（2）ビタミンD投与はAktリン酸化量の増加を介してフォークヘッド型転写因子の核移行を阻害することで、悪液質によって生じるタンパク質合成に関わる情報伝達系の不活性化およびタンパク質分解に関わる情報伝達系の活性化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で遭遇する慢性疾患患者は、原疾患そのものの特異的な病態や二次的な廃用症候群のために運動を十分に実施できないことが多く、これらの人々への運動処方慢性疾患対策が直面している大きな課題のひとつとなっている。したがって、運動制限を有する患者を対象にした場合においても、優れた運動効果をもたらすことができる、他の方法論の早期開発が求められている。

本研究は基礎的研究に基づくものであるが、その成果は寝たきり患者や体力が低下した患者であっても施行可能である温熱刺激、ビタミンD投与またはそれらを組み合わせた介入が、悪液質に由来する代謝異常とそれに伴う筋萎縮の予防・治療に有用である可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the effects of heat stress and vitamin D administration on cachexia-induced metabolic disorders and skeletal muscle atrophy, as well as the underlying molecular mechanisms. The results suggested that (1) heat stimulation inhibits the nuclear translocation of glucocorticoid receptors by increasing the expression of HSP72, and (2) vitamin D administration inhibits the nuclear translocation of forkhead transcription factors by increasing the phosphorylation level of Akt, thereby suppressing the inactivation of the signaling pathway involved in protein synthesis and the activation of the signaling pathway involved in protein degradation that occurs due to cachexia.

研究分野：細胞生物学、骨格筋生物学、メカノバイオロジー

キーワード：悪液質（カヘキシア） 骨格筋機能低下 筋萎縮 筋肥大 温熱刺激 ビタミンD グルココルチコイド
グルココルチコイド受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、心血管疾患、糖尿病、癌、慢性呼吸器疾患などを中心とする非感染性慢性疾患において二次的に誘発される体重、骨格筋および脂肪量の減少を総称した、悪液質(カヘキシー)という病態が問題視されている。悪液質の特徴は、原疾患に関連して生じる全身性の慢性炎症と複合的代謝障害であり、共通する病態として体重や骨格筋量の顕著な低下を呈し、最終的に患者の quality of life の急激な低下や生命予後不良を招く。今後、超高齢社会のさらなる進展に伴い、疾病の治療や介護に関わる社会的負担はますます大きくなると予測され、その予防・治療対策は社会的に非常に重要な課題である。

悪液質に対する治療戦略としては、原疾患に由来する慢性炎症に対する薬理的介入(抗炎症・抗サイトカイン療法など)に加え、栄養療法および運動療法を含めた包括的な対応が必要とされる。特に、より早期に運動療法介入を開始することで、悪液質に伴う身体機能や ADL 能力低下を予防・改善できる可能性が示唆されている。しかし、臨床で遭遇する慢性疾患患者の中には、原疾患そのものの特異的な病態や二次的な廃用症候群、疾病の急性期や心循環器系の疾患を合併しているなどの理由で、積極的な身体運動を伴う運動療法を実施することが困難なケースも多く存在し、その代償となる治療法の早期開発が急務となっている。

そこで申請者は、2017~2019 年度に科研費・基盤研究(C)の助成を受け、悪液質を惹起する lipopolysaccharide (LPS) や glucocorticoid (GC) を投与すると、タンパク質の合成抑制・分解亢進を介して萎縮が生じる培養骨格筋細胞を用いて、悪液質に由来する骨格筋機能低下に対する温熱刺激の効果と分子シャペロン作用や損傷タンパク質の修復作用を持つ heat shock protein (HSP) 72 の関連性について検証してきた。その結果、プレコンディショニングとして HSP72 を増加させる温熱暴露(41 °C の環境温に 60 分間の暴露)を行うことによって、悪液質に伴うタンパク質の合成抑制・分解亢進に関わる細胞内シグナル伝達分子の活性化が抑制されるとともに、筋萎縮の進行が抑制できることを明らかにした。本研究課題では、これまでの研究成果を発展させ、温熱刺激とエネルギー代謝を調節する生理作用を持つ脂溶性ビタミンの一種であるビタミン D 投与を組み合わせた新しい治療介入が、悪液質により引き起こされる代謝異常とそれに伴う筋萎縮の進行過程に及ぼす影響を検討する。さらに、その作用機序を解明することで、悪液質に由来する骨格筋機能低下に対する治療や予防を目的とした効果的で効率的な治療法の開発に向けた基礎的資料を提供する。

2. 研究の目的

本研究課題では、熱という物理的刺激と脂溶性ビタミンに対する筋細胞応答に着目し、温熱刺激またはビタミン D 投与が悪液質による代謝異常とそれに伴う筋萎縮の進行過程に及ぼす影響とその作用機序の解明を行い、臨床応用に向けた科学的根拠を集積するとともに、温熱刺激とビタミン D 投与を組み合わせた治療介入が、タンパク質の合成能・分解能とエネルギー代謝を相加的に改善することで、より効果的かつ効率的に筋萎縮の進行を抑制するのではないかといった仮説を検証することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞の種類と入手方法

細胞は、European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK) より購入したマウス骨格筋由来の筋芽細胞株(C2C12 細胞)を培養・増殖させ、筋管細胞に分化誘導させたものを使用した。

(2) 実験プロトコル

分化誘導した筋管細胞は、温熱刺激の効果検証をするために、通常培養を行った群(対照群)、悪液質を惹起する LPS (1 µg/ml) または GC (10 µM) を培地に投与することで筋萎縮・代謝異常を誘導した群(悪液質群)、41 °C、60 分間の温熱刺激を行い、その 6 時間後に LPS または GC を培地に投与した群(温熱刺激+悪液質群)、HSP72 の選択的阻害剤 KNK437 および VER155008 を培地に投与した 2 時間後に温熱刺激を行い、その 6 時間後に GC を培地に投与した群(阻害剤+温熱刺激+悪液質群)に振り分けた。

また、分化誘導した筋管細胞は、ビタミン D の効果検証をするために、活性型ビタミン D (1 µM) を培地に投与し、同時に GC を培地に投与した群(ビタミン D+悪液質群)、Akt の選択的阻害剤(Akt inhibitor-X)を培地に投与し、その 1 時間後に活性型ビタミン D および GC を培地に投与した群(阻害剤+ビタミン D+悪液質群)に振り分けた。

(3) 組織病理学的検索

筋萎縮の程度は、LPS または GC 投与から 24 または 48 時間経過後に、画像解析ソフトウェアを用いて各群の細胞直径(短径)を計測・比較することで評価した。

(4) 分子生物学的検索

mRNA 発現量の検索を行う筋管細胞は、LPS または GC 投与から 1、2、3、6、9、12、18 または 24 時間経過後に、リアルタイム PCR 法を用いて各群の標的 mRNA 発現量を定量・比較することで評価した。

また、タンパク質発現量の検索を行う筋管細胞は、LPS または GC 投与から 1、3 または 6 時間経過後に、western blotting 法を用いて各群の標的タンパク質発現量を定量・比較することで評価した。

(5) 統計解析

得られた結果は、平均値 ± 標準偏差で表記した。独立 2 群の比較には対応のない t 検定を行い、両群間に有意差が存在するかどうかを判定した。また、細胞直径の分布状況については² 検定を行い、両群間に有意差が存在するかどうかを判定した。独立多群の比較には一元配置分散分析を行い、有意差を認められた場合は Holm-Sidak 検定を適用し、各群間に有意差が存在するかどうかを判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

(1) 温熱刺激が悪液質に伴う筋萎縮の進行過程に及ぼす影響とその作用機序について

悪液質群の筋管細胞直径は、対照群および温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に減少した。また、悪液質群の筋原線維タンパク質量およびミオシン重鎖・軽鎖タンパク質量は、対照群、温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に減少した。したがって、プレコンディショニングとして温熱刺激を行うと悪液質に伴う筋管細胞の萎縮進行が抑制されることを確認できた。

悪液質群の REDD1 mRNA 発現量は、対照群および温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に増加し、悪液質群の Akt リン酸化量、p70S6K リン酸化量および GSK3 リン酸化量は、対照群および温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に減少した。また、悪液質群の KLF15 mRNA 発現量、MuRF1 mRNA 発現量および p38MAPK リン酸化量は、対照群および温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に増加し、悪液質群の Akt リン酸化量、FoxO1 リン酸化量および FoxO3a リン酸化量は、対照群および温熱刺激 + 悪液質群と比較して有意に減少した。

細胞質分画の GC 受容体タンパク質発現量、FoxO1 タンパク質発現量および FoxO3a タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群で有意に減少したが、その減少は温熱刺激 + 悪液質群で有意に抑制された。核分画の GC 受容体タンパク質発現量、FoxO1 タンパク質発現量および FoxO3a タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群で有意に増加したが、その増加は温熱刺激 + 悪液質群で有意に抑制された。また、これらの抑制効果は HSP72 阻害剤によってキャンセルされた。

したがって、プレコンディショニング温熱刺激は悪液質によって生じる GC 受容体およびフォークヘッド型転写因子の核移行を阻害し、タンパク質合成に関わる情報伝達系の不活性化およびタンパク質分解に関わる情報伝達系の活性化を抑制する可能性があり、このメカニズムには HSP72 の発現増加が関与していることが示唆された。

(2) ビタミン D が悪液質に伴う筋萎縮の進行過程に及ぼす影響とその作用機序について

悪液質群の筋管細胞直径は、対照群、ビタミン D + 悪液質群と比較して有意に減少した。したがって、ビタミン D を投与すると悪液質に伴う筋管細胞の萎縮進行が抑制されることを確認できた。

ビタミン D + 悪液質群の Akt リン酸化量、p70S6K リン酸化量は、対照群と比較して有意に増加した。また、悪液質群の Akt リン酸化量、p70S6K リン酸化量は、対照群およびビタミン D + 悪液質群と比較して有意に減少した。

細胞質分画の GC 受容体タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群およびビタミン D + 悪液質群で有意に減少した。核分画の GC 受容体タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群およびビタミン D + 悪液質群で有意に増加した。一方、細胞質分画の FoxO1 タンパク質発現量および FoxO3a タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群で有意に減少したが、その減少はビタミン D + 悪液質群で有意に抑制された。核分画の FoxO1 タンパク質発現量および FoxO3a タンパク質発現量は、対照群と比較して悪液質群で有意に増加したが、その増加はビタミン D + 悪液質群で有意に抑制された。また、これらの抑制効果は Akt 阻害剤によってキャンセルされた。

したがって、ビタミン D 投与は悪液質によって生じるフォークヘッド型転写因子の核移行を阻害し、タンパク質合成に関わる情報伝達系の不活性化およびタンパク質分解に関わる情報伝達系の活性化を抑制する可能性があり、このメカニズムには Akt リン酸化量の増加が関与していることが示唆された。

以上の検証は基礎的研究に基づくものであるが、その成果は温熱刺激、ビタミン D 投与またはそれらを組み合わせた介入が、悪液質に由来する代謝異常とそれに伴う筋萎縮の予防・治療に有用である可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Genki Hatano, Shingo Matsuo, Yuji Asai, Shigeyuki Suzuki, Masahiro Iwata	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of high-intensity stretch with moderate pain and maximal intensity stretch without pain on flexibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Sports Science and Medicine	6. 最初と最後の頁 171-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.52082/jssm.2022.171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taizan Fukaya, Shingo Matsuo, Masahiro Iwata, Eiji Yamanaka, Wakako Tsuchida, Yuji Asai, Shigeyuki Suzuki	4. 巻 121
2. 論文標題 Acute and chronic effects of static stretching at 100% versus 120% intensity on flexibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 513-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00421-020-04539-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Iwata, Takayuki Inoue, Yuji Asai, Kiyomi Horii, Mitsuhiro Fujiwara, Shingo Matsuo, Wakako Tsuchida, Shigeyuki Suzuki	4. 巻 23
2. 論文標題 The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shin Goto, Shingo Matsuo, Masahiro Iwata, Wakako Tsuchida, Genki Hatano, Satoshi Kataura, Yasuhiro Banno, Yuji Asai, Shigeyuki Suzuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of low-intensity and short-duration isometric contraction after static stretching on range of motion, passive stiffness, and isometric muscle force	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.9.247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhiro Fujiwara, Natsumi Yoshito, Masahiro Iwata, Sachiko Lee-Hotta, Takayuki Inoue, Yosuke Aizawa, Satoshi Kametaka, Yuji Asai, Shigeyuki Suzuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Median nerve injury does not contribute to early onset of decreased grip strength due to repetitive reaching and grasping tasks in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro Endocrinology Letters	6. 最初と最後の頁 76-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Hayashi, Saori Fukuyasu-Matsuo, Takayuki Inoue, Mitsuhiro Fujiwara, Yuji Asai, Masahiro Iwata, Shigeyuki Suzuki	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of cyclic stretching exercise on long-lasting hyperalgesia, joint contracture, and muscle injury following cast immobilization in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 861-870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33549/physiolres.934437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩田全広
2. 発表標題 メカニカルストレスによる骨格筋の糖取り込み調節機構
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田全広
2. 発表標題 培養細胞伸展システムを用いた骨格筋のメカノバイオロジー
3. 学会等名 第26回日本体力医学会東海地方会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田全広, 土田和可子
2. 発表標題 培養細胞伸展システムを用いた骨格筋のメカノトランスダクション研究
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本福祉大学 大学専任教員一覧 https://nfu-kg.n-fukushi.ac.jp/nfuhp/KgApp?kyoinId=ydbgdgeggy
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------