

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17472

研究課題名（和文）HIV感染者におけるサルコペニアの成因とその機序の解明

研究課題名（英文）The origin and mechanism of sarcopenia in HIV-infected persons

研究代表者

若林 義賢（Wakabayashi, Yoshitaka）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：80836057

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：サルコペニアは、筋肉量や筋力の低下によって引き起こされる身体機能の低下を指す。HIV感染者は、薬剤性、ウイルスによる免疫系の損傷や炎症でサルコペニアのリスクが高まると言われているが詳細は不明である。今回はその成因について細胞実験で解明することを目的とした。マウス筋芽細胞であるC2C12細胞を使用し、分化誘導すると、筋管細胞に分化した際に認められるミオシン長鎖が免疫染色で認められたが、抗HIV薬を添加して分化誘導をするとミオシン長鎖が染色されず、分化が抑制されていることが観察できた。さらに抗HIV薬による細胞増殖能への影響を調べた。抗HIV薬を添加すると細胞増殖能は低下することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、一部の抗HIV薬や筋芽細胞から筋管細胞・筋繊維への分化の抑制につながる可能性が示唆され、サルコペニアの予防や今後の抗HIV療法の選択にも繋がる結果となった。近年のHIV治療において、副作用の少ない薬剤が開発され治療の中心となっている。しかし、体重増加などの副作用が報告されているが原因は不明な点が多かった。HIV患者は生涯内服を継続するため、健康寿命延長のために副作用の少ない薬剤の選択が重要である。今回の結果はHIV感染者のより副作用の少ない治療薬の選択や、治療指針に影響を与え、HIV感染者に有意義な結果を残すことができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia refers to decreased physical function caused by decreased muscle mass and strength. HIV-infected persons are known to be at increased risk of sarcopenia as a result of medication, and viral damage and inflammation of the immune system, but the details are unknown. The purpose of this study was to elucidate the origin of this phenomenon through cell experiments. When mouse myoblast C2C12 cells were used and induced to differentiate, myosin long chains, which are observed when differentiated into myotube cells, were observed by immunostaining. It could be observed that the long chains were not stained and the differentiation was suppressed when cells were cultured with anti-HIV drugs. Furthermore, the effect of anti-HIV drugs on cell proliferation was investigated. Addition of anti-HIV drugs was found to reduce cell proliferation.

研究分野：感染症

キーワード：サルコペニア HIV 筋芽細胞 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、筋肉量や筋力の低下によって引き起こされる身体機能の低下を特徴とする状態を指す。通常、加齢による自然な現象として起こるが、慢性疾患や身体的な非活動性、栄養不良などの要因によっても引き起こされる。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、CD4 陽性リンパ球に感染し、減少させることによって細胞性免疫不全を引き起こす。HIV 感染者は、ウイルスによる免疫系の損傷や炎症の結果として、サルコペニアのリスクが高まると言われている。ウイルスの慢性感染によって、炎症性サイトカインの放出や体組織のタンパク質代謝の変化が起こり、筋肉量の低下が進む可能性が指摘されている。さらに、抗レトロウイルス療法 (ART) が行われウイルス量が検出感度未満となっても、薬剤による副作用としてサルコペニアが引き起こされている可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

HIV 感染者のサルコペニアの成因について細胞実験で解析し、そのメカニズムを解明することを目的とした。サルコペニアは成熟した筋繊維の減少や委縮によって引き起こされる。HIV 感染者では既知の因子以外の原因、特に抗 HIV 薬によってサルコペニアが促進されていると考えられ、実際にいくつかの抗 HIV 薬を内服開始すると脂肪が蓄積されることが知られる。しかし、筋量と抗 HIV 薬の関連については不明な点が多く、今回の研究では抗 HIV 薬が分化にどのような影響を与えるか、またその原因やメカニズムを同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞を使用し、分化過程での抗 HIV 薬の影響を評価した。現在各国のガイドラインで推奨されている抗 HIV 薬を中心に、これらが C2C12 細胞の分化、筋肉特異的遺伝子の発現、および筋線維形成に及ぼす影響を下記の方法で検討した。C2C12 細胞は増殖メディウム (10%FBS を含む DMEM) で培養した後、血清分化培地 (2%ウマ血清を添加した DMEM 培地) による分化誘導を行い、5 日目以降に筋管が形成されていることを確認し実験に使用した。抗 HIV 薬は、現在各国ガイドラインで第一選択薬のものを中心に選択し、分化メディウムに添加し、C2C12 細胞の分化プロセスへの影響を評価した。

#### (1) 蛍光免疫染色による筋繊維形成観察

C2C12 細胞を各種培地で一定期間培養した後、2%PFA で固定を行った。0.5% triton-X100 で細胞の浸透化を行った後、2%BSA でブロッキングを行った。その後 1 次抗体に抗ミオシン重鎖サブユニット抗体、2 次抗体に Alexa Fluor® 488 抗マウス抗体を使用し、蛍光免疫染色を行い観察した。

#### (2) LDH assay, MTT assay による細胞増殖能や細胞障害性の評価

C2C12 細胞を 96well プレートに播種し、各種培地で一定期間培養した後 LDH assay、MTT assay を行った。LDH assay には ROCHE Cytotoxicity Detection Kit を、MTT assay には Nacalai MTT 細胞数測定キットを使用し、それぞれ添付文書に従い測定を行った。

#### (3) リアルタイム CR 法による筋分化誘導因子の解析

C2C12 細胞を 12well プレートに播種し、各種培地で一定期間培養した後、フェノール・クロロホルム抽出法により RNA を回収した。ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) で cDNA を合成した後、リアルタイム PCR 法によって筋分化誘導因子測定を行い、相対定量解析を行った。

### 4. 研究成果

サルコペニアを呈する骨格筋組織においては、筋芽細胞から筋管細胞・筋繊維への分化が抑制されていることが考えられる。我々は、C2C12 に分化メディウムを加えることで筋繊維が形成されることを確認し、その次に分化メディウムに各種抗 HIV 薬を高濃度添加した。その後、6 日目にミオシン重鎖サブユニット抗体で免疫染色を行い、筋細胞の形成、融合を観察した。通常の増殖メディウムでミオシンが染色されていない一方、分化メディウムにおいては緑色に蛍光染色されていることが認められ、筋繊維への分化が確認できた。また、抗 HIV 薬のうち、インテグラーゼ阻害剤 A,B,C を添加した分化メディウムで培養した細胞は、薬剤が高濃になると筋管細胞・筋繊維への分化が阻害・遅延することが示された (図 1)。その一方で薬剤 D を添加したものでは、通常の分化メディウムで培養した細胞と同じ程度への分化が確認できた。

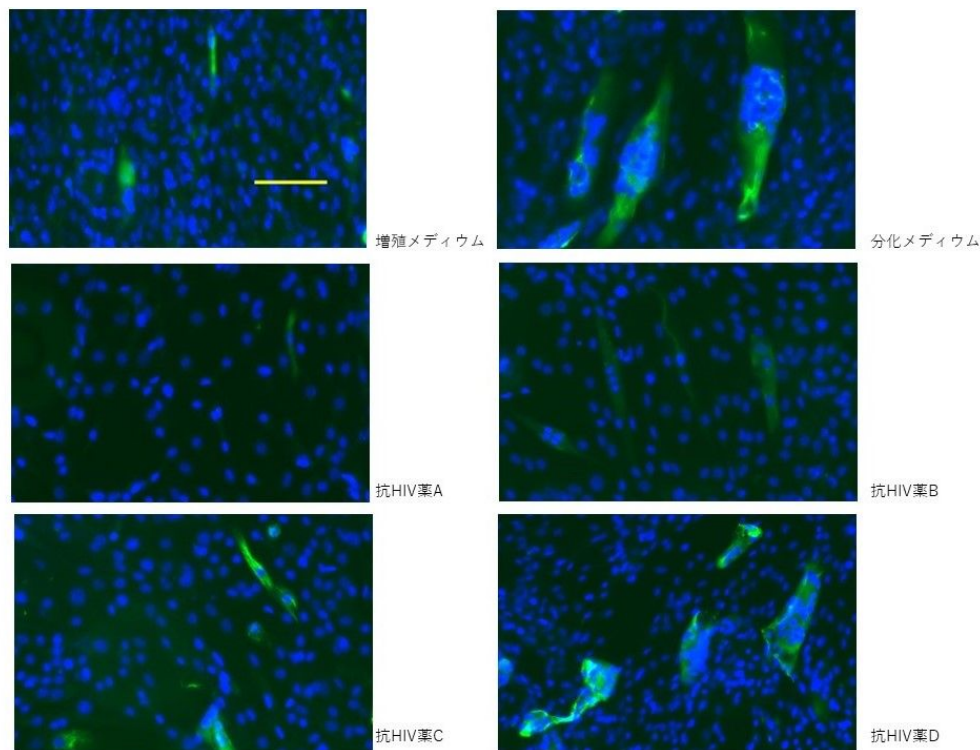


図 1。C2C12 細胞を各種メディウムで培養を行い、抗ミオシン重鎖抗体で染色を行った。

また、抗 HIV 薬の細胞障害性によって筋繊維への分化が阻害されている可能性を考え、MTT assay による細胞障害性、細胞増殖能の評価を行った。LDH assay ではいずれの抗 HIV 薬でも細胞障害性は示されなかった一方で、MTT assay では前述のインテグラーゼ阻害剤を高濃度添加した細胞では吸光度が低下しており、細胞障害性はないものの細胞増殖に影響する可能性が示唆された（図 2）。

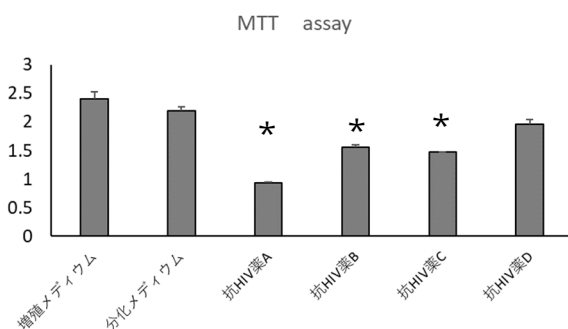


図 2 C2C12 細胞を各種メディウムで刺激した後、MTT assay を行った。抗 HIV 薬 A,B,C では有意に吸光度の低下が認められ、細胞増殖能が低下していることが示唆された。

C2C12 が分化する過程で、myogenin をはじめとする筋細胞特異的遺伝子群の発現を誘導する転写因子の活性化が認められることが知られる。抗 HIV 薬によってこれらの転写因子の発現量がどのように変化するか RT-qPCR 法によって測定した。抗 HIV 薬の中で myogenin は抗 HIV 薬 A によって発現量が低下を認めた一方、B、C の薬剤に関しては低下を認めなかった。また、その他の転写因子に関しては陽性コントロールである分化メディウム刺激群と有意差は示されなかった。

本研究結果は C2C12 細胞に抗 HIV 薬を添加することによって、筋管細胞の形成を遅延、阻害していることが示された一方で、筋分化に関連する転写因子の遺伝子発現の変化は現段階では明らかにならなかった。これらの結果は抗 HIV 薬が筋芽細胞の分化を完全に阻害するわけではなく、増殖速度や分化速度を低下させることが示唆された。そのため培養期間を長期に取ることで筋細胞が十分に分化する可能性がある。しかしながら、筋芽細胞の分化が遅延すれば成熟した筋繊維は低下するため、これら抗 HIV 薬がサルコペニアの成因の一つになっていることが予想される。今後は実臨床での患者データも収集し、抗 HIV 薬とサルコペニアの関連について明らかにする予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Ai, Nakayama Shin, Wakabayashi Yoshitaka, Yoshino Yusuke, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of adult pyelonephritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 508～512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2023.01.001	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 Sato Yoshinori, Hatayama Nami, Tanzawa Shigeru, Kimura Yoshitaka, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi, Seki Nobuhiko, Yoshino Yusuke	4. 巻 180
2. 論文標題 Staphylococcus haemolyticus attenuates the antibacterial effect of teicoplanin via aggregates and biofilms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 106152～106152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2023.106152	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 Yamaguchi Ryo, Yamamoto Takehito, Okamoto Koh, Tatsuno Keita, Ikeda Mahoko, Tanaka Takehiro, Wakabayashi Yoshitaka, Sato Tomoaki, Okugawa Shu, Moriya Kyoji, Suzuki Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Prospective audit and feedback implementation by a multidisciplinary antimicrobial stewardship team shortens the time to de-escalation of anti-MRSA agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0271812～0271812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0271812	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 Yoshino Yusuke, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 The Clinical Effect of Seasonal Flu Vaccination on Health-Related Quality of Life	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of General Medicine	6. 最初と最後の頁 2095～2099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJGM.S309920	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 Yoshino Yusuke, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 101
2. 論文標題 Relationship of sleep disorders with long-term complications and health-related quality of life in people with well-controlled human immunodeficiency virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000029070	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 Yoshino Yusuke, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Association Between the Levels of Serum Free Testosterone and Lifestyle-related Diseases in People Living with HIV	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current HIV Research	6. 最初と最後の頁 321 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1570162X20666220623152941	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 Wakabayashi Yoshitaka, Nakayama Shin, Yamamoto Ai, Yoshino Yusuke, Ishigaki Shinobu, Furukawa Taiji, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 76
2. 論文標題 First case of necrotizing fasciitis and bacteremia caused by Bifidobacterium breve	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102613 ~ 102613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2022.102613	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 Ikeda Mahoko, Wakabayashi Yoshitaka, Okamoto Koh, Yanagimoto Shintaro, Okugawa Shu, Moriya Kyoji	4. 巻 18
2. 論文標題 Changing trends in lipid profile and biomarkers of renal function and bone metabolism before and after switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AIDS Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12981-021-00354-y	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 Wakabayashi Yoshitaka, Nakayama Shin, Yamamoto Ai, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 High D-glucose levels induce ACE2 expression via GLUT1 in human airway epithelial cell line Calu-3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-022-00427-4	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 Yoshino Yusuke, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Changes in health and sleep quality after anti-retroviral treatment modification in Japanese people living with HIV	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2023.06.009	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野友祐, 中山 津, 山本 藍, 若林 義賢, 北沢 貴利
2. 発表標題 季節性インフルエンザにおけるワクチン及び治療薬の患者QOLに及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野友祐, 中山 津, 山本 藍, 若林 義賢, 北沢 貴利
2. 発表標題 Patient Reported Outcomeに基づいたHIV感染者における睡眠障害
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 津 , 山本 藍 , 若林 義賢 , 石垣 しのぶ , 張 京浩 , 北沢 貴利 , 塚本 和久
2. 発表標題 COVID-19重症肺炎治療中にCandida albicans膿胸を併発した1例
3. 学会等名 第 6 7 4 回日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴光 帆奈美, 中山 津, 柴山 瑠里子, 関口 徹, 佐山 遥平, 鈴木 崇史, 岡本 かおり, 内野 卓也, 若林 義賢, 宇野 健司, 盛田 幸司, 北沢 貴利, 石川 敏夫, 塚本 和久
2. 発表標題 COVID-19肺炎に罹患した超高齢緩徐進行1型糖尿病の1例
3. 学会等名 第 2 2 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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
---------	---------