

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34309

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19694

研究課題名（和文）末梢神経、骨格筋および毛細血管の縦断的同時多点解析による加齢に伴う退行様相の検証

研究課題名（英文）Longitudinal multipoint analysis of peripheral nerves, skeletal muscle, and capillaries to examine the degenerative changes associated with aging.

研究代表者

崎田 正博（Sakita, Masahiro）

京都橘大学・健康科学部・教授

研究者番号：10582190

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）：本研究では、脛骨神経およびヒラメ筋の生存・修復因子のクロストークおよび退行因子（アポトーシスと酸化ストレス）の加齢に伴う動態を生化学的に解析し、退行を網羅的に検証することを目的とした。しかし、高齢ラットの作成に2年を要し、その後全サンプルの解析が膨大であったことから、神経サンプルのみの解析となった。

脛骨神経の加齢性退行メカニズムとして、加齢に伴う神経組織内における酸化ストレスの増加により変性タンパク質の増加とアポトーシスの関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の転倒は、廃用症候群や認知症を併発させるイベントとして社会問題になっている。近年、末梢神経退行と転倒に関連があると報告されているが、末梢神経退行の生化学的メカニズムは縦断的に明らかにされていない。本研究の成果は、高齢者の転倒に起因する末梢神経退行の予防・改善の一助となる。すなわち、従来からの主要な転倒予防・改善策である筋力強化に偏重した概念から脱却し、末梢神経退行の機序に応じた予防・改善策の開発に対して先駆的な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to biochemically analyze the crosstalk of survival and repair factors in the tibial nerve and soleus muscle and the dynamics of regression factors (apoptosis and oxidative stress) with aging to comprehensively validate the regression. However, since it took two years to create the aged rats and the subsequent analysis of all samples was enormous, only nerve samples were analyzed. The possible mechanisms of age-related degeneration of the tibial nerve included an increase in degenerative proteins and apoptosis due to increased oxidative stress in the nerve tissue with aging.

研究分野：健康科学

キーワード：ラット 脛骨神経 加齢性退行 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮・筋力低下が高齢者の転倒の主要危険因子であることは既に広く知られており、その予防・改善策として筋力強化に重点が置かれている。しかし近年、末梢神経退行が高齢者の転倒と関連があり、また末梢神経の退行が筋萎縮・筋力低下に先行するとの報告さえある。さらに近年、申請者は自然加齢過程でこの末梢神経退行が毛細血管退行の後に生じることを明らかにしている。しかし、毛細血管も含め末梢神経と骨格筋の縦断的・同時多点解析による退行様相は未だ不明であるため、筋力強化の偏重策には疑問があり、早急に解明すべき課題である。

末梢神経の加齢退行は、慢性的酸化ストレスの増加、髄鞘のアポトーシスシグナルの活性化(Kuromoto, et al. 2011)、軸索輸送の低下(Verdú, et al. 2000)および神経栄養因子やその受容体の減少(Padelli, et al. 2010)が原因とされる。これら諸現象は、毛細血管の退行に伴う代謝不全が関連すると推察されるが、加齢による末梢神経と毛細血管の状態は縦断的検証で不明なままであった。そこで、申請者はこれまで、ラットの末梢神経と毛細血管の退行を縦断的に検証してきた。研究成果として、末梢神経有髄線維と毛細血管両者は若齢期と比較して高齢期に顕著に萎縮・減少することを明らかにした(Sakita. 2014; Sakita et al. 2014; Sakita et al. 2016)。さらに、有髄線維の生存・修復作用をもつ血液由来の神経栄養因子(BDNF)と毛細血管の新生作用をもつ神経由来の血管内皮増殖因子(VEGF)は、高齢期の有酸素運動によって BDNF は血液から末梢神経へ、VEGF は末梢神経から血液へ溢出し、神経と血管(血液を含む)が相手の生存・修復のために相互補完作用(クロストーク)を有することを見出した(Sakita et al. 2018)。近々の成果では、毛細血管は中齢期から既に退行が生じる一方、有髄線維は高齢期で退行することを明らかにしている(Sakita et al, in press)。このクロストークの破綻が末梢神経退行の背景にあると推察される。末梢神経と血液間のクロストークと同様に、骨格筋と血液間にも BDNF と VEGF のクロストーク増加による筋肥大と毛細血管新生を申請者らは明らかにした(Isobe et al, in press)。さらに、骨格筋の毛細血管密度は高く(村上ら, 2012)、上記のクロストークや代謝が活発なことが予測される。つまり、骨格筋の退行は末梢神経の退行よりも遅いことが推察される。しかし、毛細血管も含め末梢神経と骨格筋の退行様相は未だ縦断的に検証されていない。

2. 研究の目的

本研究は、ラットの長期飼育から骨格筋と末梢神経の前向き縦断的解析を実施し、毛細血管も含めて各組織の退行様相を組織形態学・生化学的に明らかにすることを目的とする。具体的には、各群の組織(脛骨神経およびヒラメ筋)から、退行に関連する各因子と生存・修復に関連する各因子の発現量をウェスタン・プロット法を用いて解析する。

3. 研究の方法

10 週齢から飼育を開始した Wistar/ST ラットを飼育環境を統制し、長期飼育により若齢群(20 週齢)、中齢群 (50 週齢)、中齢群 (70 週齢)、高齢群 (90 週齢)および高齢群 (100 週齢)を作成した。その後、脛骨神経とヒラメ筋を摘出し、組織形態学的解析として、各群脛骨神経の有髄線維染色および SDH 染色、ヒラメ筋の線維の NADH-TR(タイプ別染色)および SDH 染色を実施する。各群神経・ヒラメ筋検体の毛細血管蛍光 3 次元構築像観察、および脛骨神経と骨格筋の定量化(有髄線維径・軸索径・髄鞘厚・線維タイプ別の構成比・断面積、ミトコンドリア活性・毛細血管径と吻合数)を実施する。

また、脛骨神経、ヒラメ筋および毛細血管の退行における生化学的検討として、各群の組織(脛骨神経、ヒラメ筋)から、退行に関連する各因子(タンパク質)と生存・修復に関連する各因子の発現量をウェスタン・プロット法から解析する。

4. 研究成果

ヒラメ筋の解析は、実施途中のため本報告書には記載できなかった。その理由として、100 週齢の高齢ラット作成までに 2 年の飼育が必要であったこと、またサンプル数が膨大となったことから解析が期間内完了に至らなかった。

一方、脛骨神経のタンパク質発現量解析は期間内で比較的順調に実施を終えた。まず、研究代表者は小胞体ストレス応答の関連タンパク質である XBP-1s の発現量に着目した。変性タンパク質が増加した場合にアンフォールドタンパク質応答(UPR)と呼ばれる適応応答を引き起こす。XBP-1s は、UPR 遺伝子の発現を誘導する強力な転写活性化因子として知られている。本研究では、この XBP-1s が 50 週齢以降有意に減少を示した(図 1)。つまり、アンフォールドタンパク質の修復タンパク質が 50 週齢以降減少することを示している。実際、修復タンパク質である PDI の発現量も 50 週齢以降に有意に減少を示し(図 2)、アンフォールドタンパク質(変性タンパク質)が 50 週齢以降に増加することが考えられた。一方、修復タンパク質である BDNF の発現量は、70 週齢以降に有意な減少を示したことから(図 4)、50 週齢以降に変性タンパク質は増加するが、BDNF の発現が 70 週齢までは維持されるため、50 週齢から 70 週齢の期間は顕著な変性には至らない可能性が示唆される。

神経萎縮やエネルギー代謝に着目すると、一酸化窒素(NO)の減少が分解タンパク質(カルパイン)を活性化させ、神経萎縮を促進させることが知られている。神経細胞のカルパインの活性化は、酸化ストレスの増加に伴うタンパク質酸化的修飾によりタンパク質の切断の受けやすさが増加することで、カルパインによる切断が活性化される。NOは、タンパク質のS-ニトロシル化により、タンパク質の酸化的修飾から保護している。このNOは、神経細胞で発現するnNOSにより産生される。本研究において、nNOSの発現は50週齢以降で徐々に減少し、90週齢以降で有意に減少することを明らかにした(図4)。つまり、加齢に伴う酸化ストレスの増加とnNOSの減少により、50週齢以降緩徐に変性が進行し、酸化的修飾を受けた変性タンパク質が90週齢以降に急激に蓄積し、分解による萎縮が促進されると推察される。さらに、分解切断の主要なタンパク質として知られているCaspase-3の発現も50週齢以降で緩徐に増加し、90週齢以降で有意に発現が増加することを明らかにした(図5)。以上から、アポトーシスも含む分解促進(萎縮)は50週齢以降で緩徐に進行し、90週齢以降で顕著になると考えられる。有髄線維の染色像解析においても、70週齢までは軸索や髄鞘の有意な変性や萎縮は生じておらず、90週齢以降で軸索や髄鞘の変形および萎縮が確認された。

研究代表者は、上記のNO産生が特異的に減少した場合、糖・脂質代謝の促進関連因子の発現が減少するか、マウスに1ヶ月間のnNOS反応阻害薬(L-NAME)継続投与実験で確認した。その結果、グルコースの取り込みやミトコンドリア増殖に関与する転写因子PGC-1 α およびPGC-1 α の活性因子であるSirt1の発現が有意に減少することを明らかにした。さらに、L-NAME継続投与下のマウスに持続的運動を1ヶ月間実施した結果、PGC-1 α およびSirt1の発現量がL-NAME非投与群と同等レベルまで改善することを明らかにした。この成果は、“一酸化窒素合成阻害下における持続的運動介入がマウス骨格筋の代謝促進シグナル伝達に及ぼす影響”という演題名で、第32回京都府理学療法士学会で発表し、学術大会長賞を受賞した。つまり、加齢によるNO産生の低下が神経萎縮以外に糖・脂質代謝の低下も引き起こすと考えられる。

以上から、ヒラメ筋の生化学・組織学的解析は期間中に叶わなかったが、現在解析を進行中である。ヒラメ筋の解析が完了に至れば、神経と筋の各々の特異的退行様相を明らかにすることで、高齢者の転倒に起因するアプローチの確立に寄与できると想定している。また、今回の成果から、脛骨神経の退行が中齢期以降で生化学的に既に進行が始まっている点で、早期からの酸化ストレス軽減とUPR促進に向けた開発に挑む予定である。

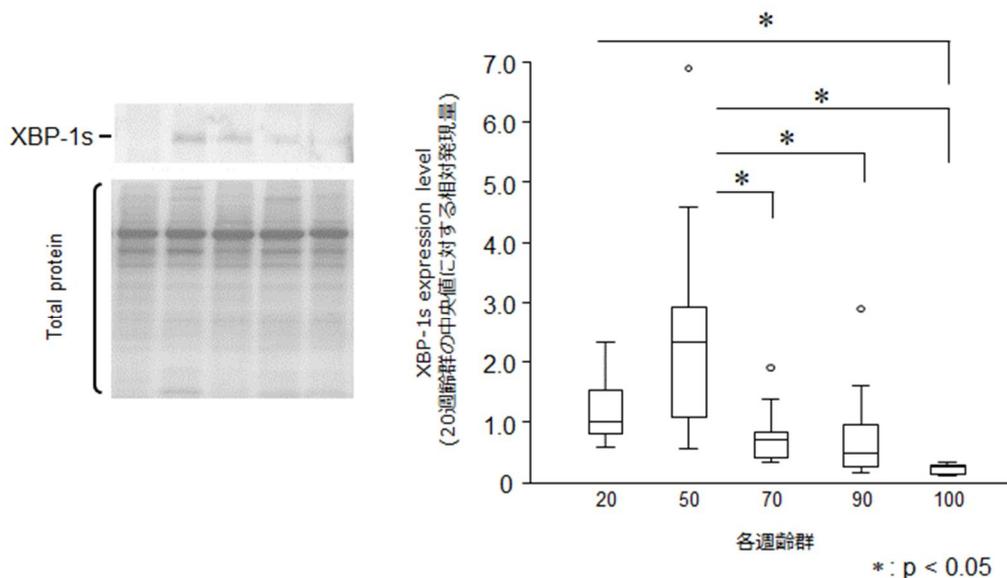


図1. 各週齢群におけるXBP-1s発現量の比較結果

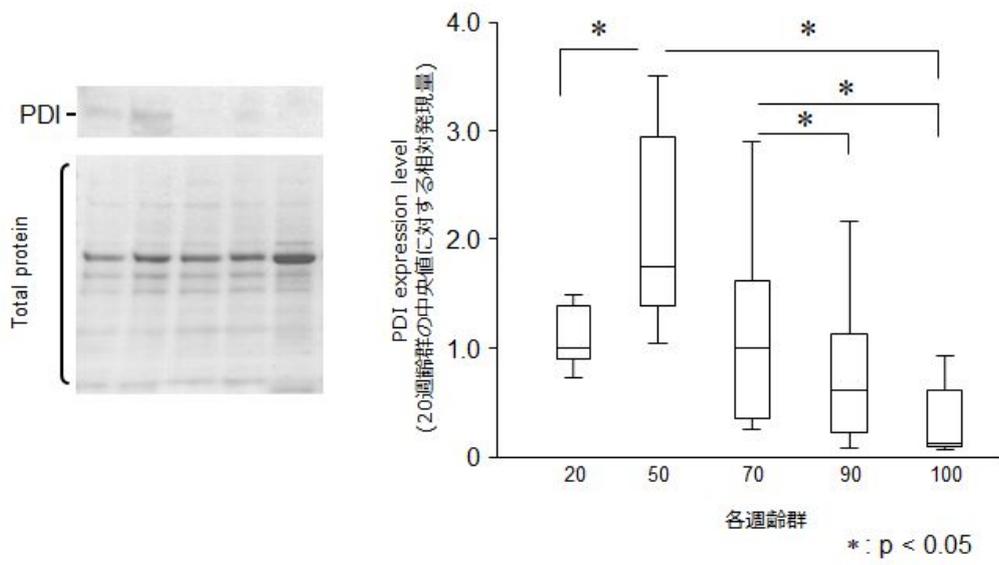


図2. 各年齢群におけるPDI発現量の比較結果

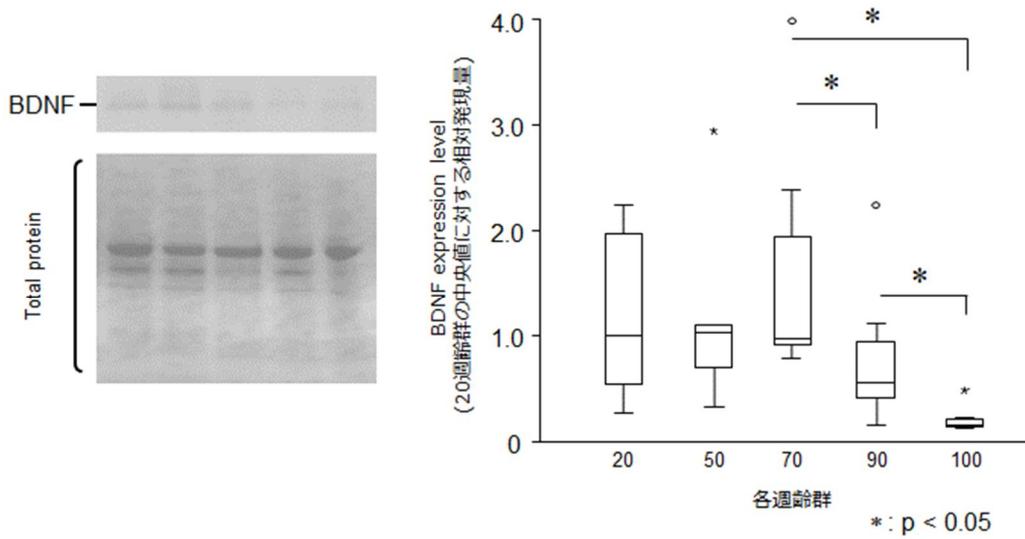


図3. 各年齢群におけるBDNF発現量の比較結果

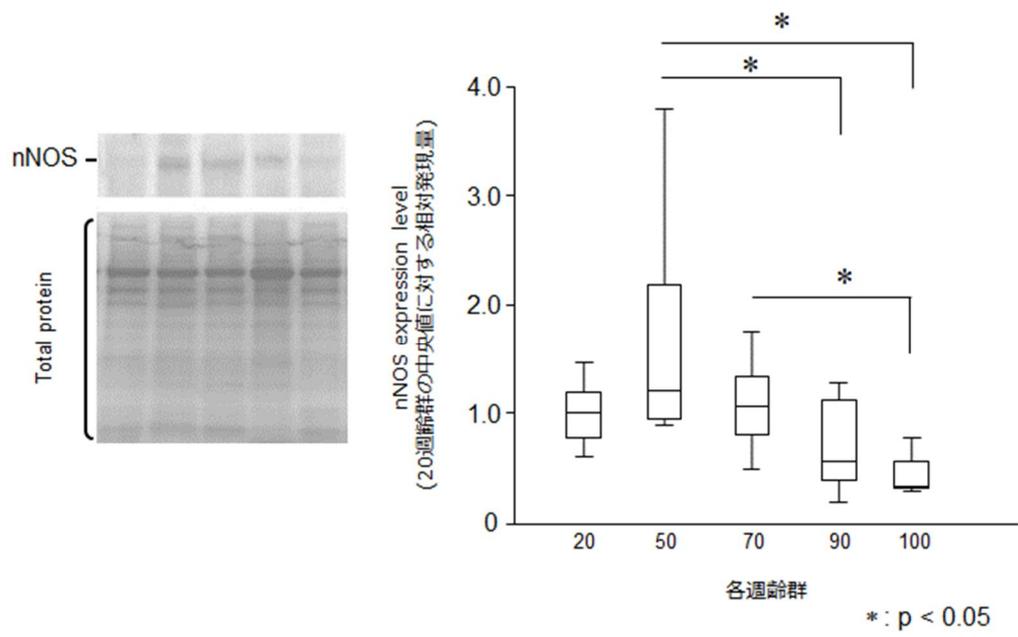


図4. 各週齢群におけるnNOS発現量の比較結果

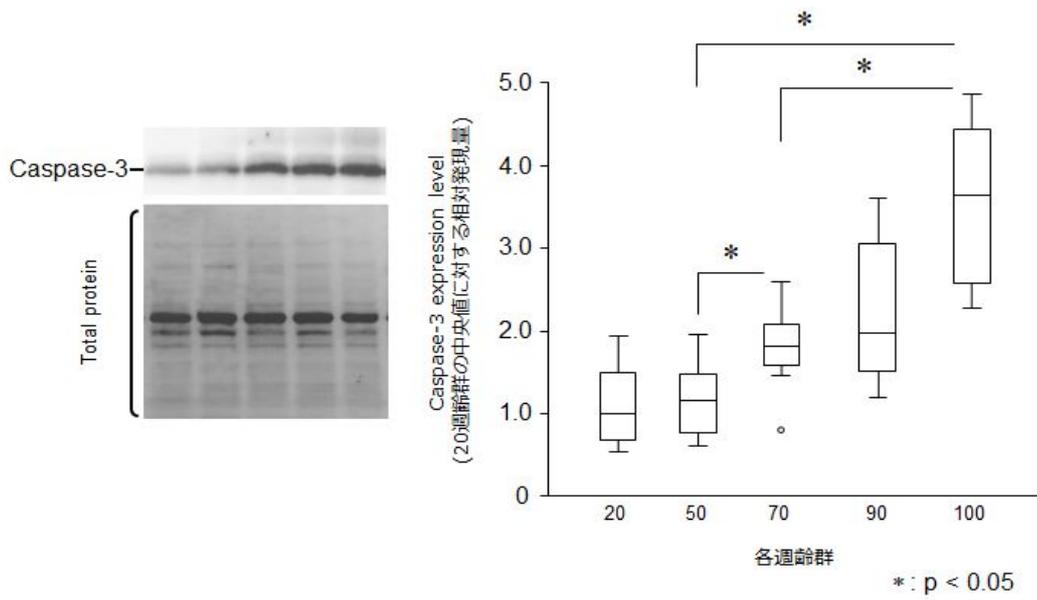


図5. 各週齢群におけるCaspase-3発現量の比較結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 村上 慎一郎, 崎田 正博, 霍 明, 林 聡, 亀山 一義, 坂本 竜司, 鈴木 啓子, 藤野 英己	4. 巻 4
2. 論文標題 ラット遅筋の毛細血管構築に対する有酸素運動の効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 国際エクササイズ サイエンス学会誌	6. 最初と最後の頁 22-26
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 Masahiro Sakita, Shinichiro Murakami, Koji Nonaka, Ryuji Sakamoto, Takafumi Saito, Wataru Isobe, Shuzo Kumagai	4. 巻 236
2. 論文標題 Different patterns in age-related morphometric regression of myelinated fibers and capillaries of the tibial nerve: a longitudinal study in normal rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 1101-1111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13168	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 Wataru Isobe, Shinichiro Murakami, Takafumi Saito, Shuzo Kumagai, Masahiro Sakita	4. 巻 16
2. 論文標題 Effect of aerobic exercise on muscle structure and expression of proteins promoting hypertrophy and metabolism in aged rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Comparative Exercise Physiology	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3920/CEP190077	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 村上慎一郎, 崎田正博, 霍明, 林聡, 亀山一義, 坂本竜司, 鈴木啓子, 藤野英己	4. 巻 4
2. 論文標題 ラット遅筋の毛細血管構築に対する有酸素運動の効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 国際エクササイズサイエンス学会誌	6. 最初と最後の頁 22-26
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯部 航, 崎田 正博
2. 発表標題 高齢期身体不活動ラットに対する持久的運動が小胞体ストレス応答シグナルに及ぼす影響
3. 学会等名 第32回京都府理学療法士学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎田 正博, 辻 実佳, 辻本 晴佳, 本田 歩優, 野村 和生, 磯部 航
2. 発表標題 一酸化窒素合成阻害下における持久的運動介入がマウス骨格筋の代謝促進シグナル伝達に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回京都府理学療法士学会
4. 発表年 2022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
---------	---------