

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591900

研究課題名（和文）：加齢的運動器変性に及ぼす運動療法の効果 - 老化促進マウスを用いた基礎的研究 -

研究課題名（英文）：Effect of exercise on the aging-degeneration in senescence-accelerated mouse's locomotorium

研究代表者：米 和徳 (YONE KAZUNORI)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：40182844

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、老化促進マウス(SAM)を用いて脊髄前角細胞の加齢変化と長期的な運動が及ぼす影響を検討した。オートファジーの関与を調べるため、封入体形成因子である p62 とオートファジー実行因子である Beclin1 の発現について検討した。

実験動物には SAM の 12 週齢(若齢群)、58 週齢(老齢群)、50 週齢時よりトレッドミル運動(13 m/min, 週 6 日間, 1 日 2 回, 各 20 分間)を 8 週間継続して行なった群(老齢運動群)を用いた。

脊髄前角細胞数は老齢群で若齢群と運動群よりも有意に減少していた。脊髄前角細胞における p62 の発現を検討した結果、p62 陽性細胞数と p62 発現量は 3 群間に有意差が認められなかった。脊髄前角細胞における Beclin1 の発現を検討した結果、Beclin1 陽性細胞数は、老齢群で若齢群と老齢運動群よりも有意に減少していた。また、Beclin1 発現量については、老齢運動群の Beclin1 発現量が他の 2 群に比較して有意に増加していた。老齢群の脊髄前角細胞数は若齢群と老齢運動群に比べて減少していたが、p62 陽性細胞数と発現量に有意差は認められなかった。老齢運動群については Beclin1 陽性細胞数が減少しておらず、発現量は増加していたため、運動により脊髄前角細胞のオートファジー活性が高まることが示唆された。

本研究結果から考えると、オートファジーによって変性タンパク質の蓄積を選択的に分解できなくなることが、加齢による脊髄前角細胞の脱落を招くと考えられ、長期的な運動によりオートファジーの機能を高めることが、脊髄前角細胞の脱落を抑制すると推測される。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to examine the effect of treadmill running on age-related changes of spinal motoneurons and to clarify those mechanisms. Forty-three senescence-accelerated mice (SAM) were randomly divided three groups as follows, the young group, the aged group and the exercised group. Twelve young group mice were sacrificed at the age of 12 weeks. Sixteen aged group mice were sacrificed at the age of 58 weeks. Fifteen remaining mice were subjected to treadmill running for 8 weeks from at the age of 50 weeks and were sacrificed at the age of 58 weeks; those were referred to as the aged exercised group. After the sacrifice, spinal cords were removed en bloc and served for histological examination, immunohistological examination and western blotting.

The number of motoneurons in aged group was significantly smaller than those in other two groups. There is no significantly difference was observed in the number of p62 positive cells and the amount of p62 expression on western blotting among three groups. The number of Beclin1 positive cells in aged in aged group was significantly smaller than those in other two groups. On western blotting examination, the amount of Beclin1 expression in aged exercised group was significantly larger than those in other two groups.

In this study, number of motoneurons and activity of autophagy were decreased in aged mice spinal cord. These findings suggest that accelerated activity of autophagy is

needed to maintain the intracellular metabolism for prevent neuronal cell death in aged spinal cord. Physical exercise may accelerate activity of autophagy and resulting in inhibition of neuronal cell death in aged spinal cord.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：運動器リハビリテーション学

キーワード：リハビリテーション

### 1. 研究開始当初の背景

2010年のわが国の平均寿命は女性 86.39 歳、男性 79.64 歳であり世界有数の長寿国である。しかし、2004年のWHO保健レポートでは、日本人の健康寿命は女性で 77.7 歳、男性で 72.3 歳であり、何らかの障害を有し、医療や介護が必要な年数は女性で 8.7 年、男性で 7.3 年に達する。しかも、2010年の高齢人口は 2944 万人、高齢化率は 23.1%と、高齢化は確実に進行しており、今後、ますます医療や介護に関する社会的、経済的負担が増大することが予想される。一方、高齢者が自立した生活を過ごせるように、さまざまな分野から高齢者の健康維持への取り組みが行われている。リハビリテーションもそのひとつであり、健康維持のための予防的リハビリテーション、特に運動療法、が注目され、その必要性が重要視されている。最近では、運動器不安定症という疾患概念が確立され、さらに、日本整形外科学会は「骨、関節、筋肉など運動器の機能が加齢とともに衰えて、『立つ』、『歩く』といった動作が困難となり、『要介護』や『寝たきり』になる、またはそのリスクが高い状態」をロコモティブシンドロームと定義し、このような状態の予防と治療にロコモーショントレーニングを推奨している。しかしながら、ヒトを対象とした研究では運動療法が身体機能の維持、増強に有効であるとの報告が多いが、主観的評価が多く客観性に乏しい。また、運動療法により高齢者が自立し、医療や介護の必要性が減少するのにかつての明確な証明はなされていない。また、加齢にともなう運動器の変性や運動療法の効果についての分子生物学的、細胞薬理学的な基礎研究はほとんどなされて

おらず、医学的根拠に乏しい。

身体を健康を保つには、細胞の健康を維持することが重要である。細胞内の環境を改善し、機能を維持するのにオートファジーと呼ばれる細胞の掃除システムが大きな役割を果たしている。細胞内でのオートファジーの役割は、正しく機能しなくなったタンパク質や細胞小器官が細胞内にたまって問題を起こす前に取り除くことであり、また、細胞が飢餓状態に陥ったときには、タンパク質などの細胞構成物質を消化し、生存に必要な栄養やエネルギーとして供給することである。外部から侵入してきた病原体を直接捕らえて分解することや、病原体に対する免疫応答にもかかわっている。このようにオートファジーは細胞内のさまざまな場面に関与しているため、オートファジーの働きが悪くなったり停止したりすると、細胞は大混乱に陥り、私たちの健康にも大きな影響を与える。近年、脳梗塞やパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病などの神経変性疾患、あるいは脳外傷、脊髄損傷における神経組織の変性にオートファジーが関与することが報告されている(Hara T et al. Nature 441(7095): 885-9, 2006. Ventruti et al. Curr Neurol Neurosci Rep 7: 443-451, 2007. Erlich S et al. Autophagy 2: 49-51, 2006.)。さらに、最近では、老化のメカニズムにオートファジーが大きく関与していることが明らかになってきた(Martin I et al. Aging 2011 Sep 8)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、老化促進マウス(SAMP1)を用いて加齢にともなうオートファジーの変化が脊髄 - 運動器系の変性にどのような

影響を与えるのか、また、予防的リハビリテーション（運動療法）がオートファジーを活性化させ脊髄-運動器系の変性を抑制するかについて分子生物学的に検証することである。

### 3. 研究の方法

実験動物として雄性の老化促進マウス

(sencence=Accelerated Mouse : 以下 SAM) の系統の中の SAMP1 マウスを使用した。SAM は、AKR/J 系統を起源とする交雑マウスから、選抜交配により近交系化された、一群の関連近交系マウスである。SAMP マウスは通常マウスに比べ、老化の進行が速く、平均寿命は約 40% 短縮している。老化に伴い、学習記憶能の障害、老年性骨粗鬆症、老年性アミロイド症、免疫機能障害など、ヒトの老年性疾患と同様の病態を自然発症する。特に今回研究で使用した SAMP1 マウスは、老化アミロイド症、萎縮腎、免疫応答能低下、肺過膨張、難聴といった老化関連病態の発症と進行の促進を示すことが知られているマウスである。老化度評点の加齢依存的な急速な増加を指標として確立されたマウスであり、老年病ならびに促進老化のモデル動物として国際的に使用されている。

また、SAMP1 マウスの対照群として、Institute of Cancer Research (以下: ICR) マウスを使用した。ICR マウスは、繁殖・発育は良好であり、世界的に安全性・薬理薬効試験・免疫・各種研究試験などに広く使用され、一般研究用として多くの研究者が利用しているマウスである。

先行研究より、老化による筋萎縮が 50 週齢より観察されることがわかっており、本研究では、老化が起こる前段階として 12 週齢、老化現象が出現している段階として 58 週齢の SAMP1 マウスの骨格筋を観察し、老化に伴う老年性筋萎縮の動態を検討するとともに、老化初期段階である 50 週齢より運動介入を行い、運動介入が骨格筋にどのような影響を与えるのかを検討するために、50 週齢時よりトレッドミル運動介入を 8 週間継続して行った運動群の計 3 群間) の変化を検討した。

SAMP1 マウスの対照群として、SAMP1 マウスの同週齢 ICR マウス ; 12 週齢、58 週齢、SAMP1 マウスと同条件下で運動介入を行った運動群、計 3 群間使用した。

尚、本実験は鹿児島大学医学部動物実験委員会の承認を得て行われた研究である。

### 4. 研究成果

58 週齢マウス・運動群マウスともに組織摘出する 1 - 2 日前の午後 1 時より 1 時間ケージ内を何回横断するか計測した。計測の結果、SAM マウスは ICR マウスに比べ、58 週齢群・運動群ともに活動性の低下が有意 ( $p <$

0.001) に認められた。また、SAM マウス間でも 58 週齢群 (非運動群) が運動群に比べ、有意 ( $p < 0.001$ ) に活動性の低下が認められた。このことより、老化に伴い活動性の低下が有意に起こってくるが、運動介入により活動性の低下を抑制することができることがわかった。

各週齢、屠殺時の体重では、SAM マウスに比べ、ICR マウスが同週齢で有意に体重が大きい。また、老化すると体重が増加傾向にあり、運動介入を行うことで体重増加抑制効果があることが示唆された。

SAM マウス/ICR マウスの各群のヒラメ筋湿重量では、SAM マウスに比較し ICR マウスは湿重量が大きかった。また、SAM マウスは 12 週齢よりも 58 週齢・運動群で有意に小さく、老化による筋萎縮が認められた。

SAM マウス/ICR マウスの各群のヒフク筋湿重量では、SAM マウスに比較し ICR マウスは湿重量が大きかった。また、SAM マウスは 12 週齢よりも 58 週齢・運動群で有意に小さく、老化による筋萎縮が認められたが、運動することで運動しないよりも有意に筋萎縮抑制効果があることがわかった。

SAM マウス/ICR マウスの各群の前脛骨筋湿重量では、SAM マウスに比較し ICR マウスは湿重量が大きかった。また、SAM マウスは 12 週齢よりも 58 週齢・運動群で有意に小さく、老化による筋萎縮が認められた。

脊髄の結果では、脊髄前角細胞数は老齢群で若齢群・老齢運動群よりも有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。しかし、若齢群と老齢運動群間には有意差はみられなかった。

脊髄前角部の抗 p62 染色結果では、3 群間に有意差は認められなかった。

Beclin1 陽性細胞数は老齢群で若齢群・老齢運動群よりも有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。しかし、若齢群と老齢運動群間に有意差は認められなかった。

灰白質における若齢群と老齢運動群、老齢群の BDNF 陽性細胞数を定量化した結果、3 群間に有意差は認められなかった。

### 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)

#### ① [学会発表] (計 1 件)

沢田浩暢, 松田史代, 入江愛, 渡嘉敷春乃, 榎間春利, 吉田義弘, 米和徳

トレッドミル運動介入が老化促進マウスの脊髄前角細胞に及ぼす影響について

日本理学療法士学会大会 (岐阜)

2010. 5. 27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米 和徳 (YONE KAZUNORI)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：40182844

(2) 研究分担者

小宮 節郎 (SETUROU KOMIYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

吉田 義弘 (YOSHIHIRO YOSHIDA)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：10107906

井尻 幸成 (KOSEI IJIRI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00315417

榎間 春利 (HARUTOSHI SAKAKIMA)

鹿児島大学・医学部・准教授

研究者番号：10325780

松田 史代 (FUMIYO MATSUDA)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953