

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390143

研究課題名(和文)サルコペニア(老化に伴う筋萎縮)の機構解明ならびにその治療戦略の確立

研究課題名(英文)Potential mechanisms and therapeutic strategies of sarcopenia

研究代表者

葛谷 雅文(KUZUYA, Masafumi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10283441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアの骨髄幹細胞ならびに運動への効果を検証する為、老化促進マウス(SAMP10)8週齢に野生型マウスの骨髄を移植し、対照(非移植)と運動介入(25週齢より)、非介入の2群を作成し、運動耐用能、40週齢で筋肉重量、組織生化学的解析を実施した。

本研究により、骨髄由来幹細胞の一部は骨格筋に分化することが明らかとなった。SAMP10におけるサルコペニアの一部は骨髄を野生型に置換することにより、改善させることができ、サルコペニアの原因の一部は骨髄細胞の老化が関連している可能性が示唆された。運動介入は筋タンパク分解系を抑制し、ミトコンドリアを活性化し、サルコペニアを予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the effect of bone marrow stem cells as well as exercise on the age-associated skeletal muscle atrophy and weakness (sarcopenia), senescence-accelerated-prone mouse (SAMP10) were transplanted with bone marrow of wild-type (C57BL/6) at 8 weeks of age. Control non-transplant and transplant SAMP10 were randomly assigned to 2 groups with or without exercise training (from 25 weeks of age). At 40 weeks of age, muscle weight, endurance capacity, and the tissue biochemical analysis were carried out.

These studies provide the evidences that the bone marrow-derived stem cells differentiate into skeletal muscle cells. Bone marrow transplantation of wild type mice improves the age-associated skeletal muscle atrophy and weakness (sarcopenia), suggesting that aging of bone marrow cells may contribute to the cause of sarcopenia of SAMP10. In addition, exercise can prevent sarcopenia through the prevention of muscle protein degradation and mitochondrial activation in SAMP10.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老化 サルコペニア 動物

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニア (Sarcopenia) は「加齢に伴う筋力の低下、または老化に伴う筋肉量の減少」を指す。一般的に 70 歳では 20 歳代に比較すると骨格筋面積は 25-30%、筋力は 30-40% 減少し、50 歳以降毎年 1-2% 程度筋肉量は減少するとされる。筋肉量の減少は type IIa 筋肉線維を中心とした萎縮と線維自体の減少に原因があり、一般に筋肉の減少分は脂肪に置き換えられる。このようにサルコペニアは、多くの高齢者に関わる病態であり、高齢者の運動機能の低下、転倒、ふらつき、インスリン抵抗性などに密接に関わっており、医療のみならず介護予防の観点からも極めて重要である。しかし、その分子生物学的なメカニズムは依然として明らかでない。

今まで下記に示すような種々の仮説が提唱されている。

(1) 加齢に伴う骨格筋幹細胞 (衛星細胞) の数や活性の低下 (Notch signal の低下が関与, Science 302:1575-1577)、(2) 炎症仮説 (炎症性サイトカインの筋肉萎縮への関与)、(3) ホルモン仮説 (テストステロン、エストロゲン低下の関与)、(4) タンパク質消去系仮説 (ユビキチン - プロテアソム系の加齢にともなう上昇)。

しかし、これらの仮説を支持する報告と、否定する報告が入り交っており、いまだサルコペニアの明確なメカニズムは明らかにされていない。サルコペニアのメカニズムは単一的なものではなく、加齢に関連する様々な要因が複雑に係わっている可能性がある。

我々は以前より、骨髄前駆細胞の下肢虚血部位への新生血管形成への関与を検討してきた。特にプロテアーゼの骨髄由来内皮前駆細胞の末梢血への誘導作用 (Cir Res, 2007, 100:904-913)、さらに運動による骨髄由来内皮前駆細胞の活性化 (Circulation, 2010, 122:707-16)、老齡マウスの骨髄細胞は障害部位の血管新生促進作用が若年マウス由来の骨髄細胞に比較すると明らかに低下し、その原因が老齡マウス骨髄に含まれる内皮前駆細胞数の減少によることを報告した (Cir Res, 2007, 100:904-913)。

近年、障害後の骨格筋再生には骨格筋幹細胞 (衛星細胞) のみならず、骨髄由来筋前駆細胞の関与が明らかにされた (Cell 2002, 111: 589-601; Science 1998, 279, 1528-1530)。しかし、加齢に伴うサルコペニア、さらには運動負荷後の筋肉量増加への骨髄由来筋前駆細胞の役割は不明である。

また、サルコペニアの要因として筋たんぱくの同化・異化バランスの問題が指摘されている。必須アミノ酸、その中でも分子鎖アミノ酸、特にロイシンはたんぱく同化刺激作用が強いことが知られており、サルコペニアの予防、治療介入法として有効であると考えられている。Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) はロイシンの代謝産物であり、ロイシンのたんぱく同化刺激作用の多くはこの HMB が

担っていることが指摘されている。近年 HMB は臨床的にも高齢者のサルコペニア治療、予防に有効ではないかとの報告があるものの、なお一致した見解はない。

### 2. 研究の目的

(1) 老齡マウスにおけるサルコペニア (筋肉萎縮) への骨髄由来筋前駆細胞の役割を明らかにする。

骨髄由来筋前駆細胞は老齡マウスの運動による筋肉量の増大に寄与していると予測している。しかし、老齡マウス由来の骨髄細胞にはその前駆細胞の絶対数が低下しており、若年マウス由来骨髄に比較して、著しく筋肉増加に対する能力が低下していると予測している。

(2) HMB は老齡マウスの運動による下肢筋肉の増加を促進する、との仮説を検証する。そのメカニズムは筋細胞の肥大 (筋タンパク合成の促進、分解の抑制) のみならず、筋細胞の増加 (すなわち、衛星細胞の活性化、さらには骨髄由来筋前駆細胞の活性化) によるのでは、と推定した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄由来筋前駆細胞のサルコペニアへの影響

「骨髄細胞の老化が老齡マウスのサルコペニア、運動に反応する筋肉増加の抑制に関与する」この仮説を証明するため以下の実験系を遂行した。

若年マウス (8 週齢, C57BL/6J) ならびに老齡マウス (18 月齢: 24 月齢の骨髄移植は今までの経験上、生存させることができないため) の骨髄を採取し、若年マウス (8 週齢)、老齡マウス (24 月齢)、または老化促進マウス (senescence-accelerated-prone mouse: SAMP10) (SAMP10/Ta Slc), (8 週齢、30 週齢) にそれぞれ移植した。

その後、運動負荷としてトレッドミル走行 (17~20m/min, 35min/日, 3 日間/週, 4 か月実施) を 25 週齢より開始し、4 か月後に両側の下腿腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出し、その筋肉重量を定量化後、一部を組織学的な解析のため固定、一部を mRNA ならびにタンパク質解析のため、液体窒素で凍結し保存した。

一方、骨髄由来筋前駆細胞が骨格筋に誘導され、筋細胞に分化しているかの確認を、green fluorescence protein (GFP) マウス (C57BL/6-Tg(CAG - EGFP) の骨髄細胞を老齡、ならびに若年マウスに移植することにより、マウス下肢筋肉に GFP-positive な筋肉細胞の存在、分布を確認するとともに、全筋肉細胞に対する割合を評価することにより、骨髄由来細胞の筋肉再生への貢献度を評価した。

#### Endurance stress test (持久力テスト)

運動介入開始直前と運動開始時から 4 週間ごとに実施。マウスをトレッドミルのライ

ンにのせ、初めの5分間はウォームアップとして8m/minで走らせ、その後2分ごとに1m/minずつスピードを上げ、マウスが最終的にトレッドミルの端っこにへたり込むまでの時間(分きざみ)を測定した。その際ショックバーは20Vで使用した。

#### 握力測定

小動物用握力メーター(Columbus社)を用い、2週間ごとにマウスの前肢の握力を測定した。測定用の網を前肢で掴ませた状態で、尾を持ち、手で水平に引いた時、マウスが引かれた力に耐え切れず掴んだ網を離してしまうまでの最大の力(握力)を測定した。

#### 筋湿重量比の測定

採取した筋は筋湿重量を測定した後、体重による個体差を除くために、体重に対する各筋湿重量/体重比[筋湿重量(mg) / 体重(g)]を求めた。

#### 組織化学的解析および形態学的解析

筋組織は筋湿重量を測定後、OCTコンパウンドに包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速に凍結固定し、クライオスタット・マイクロトーム(CM1850, Leica)を用いて4μmの連続切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、定量解析として筋線維数のカウントと筋細胞の断面積を測定した。また、2.5%グルタルアルデヒド(4℃)に固定した筋組織は、十分洗浄の後、1%オスミウム液(室温)に2時間固定した。材料はアルコールで脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。

#### 生化学的解析

タンパク定量(Western blotting): 各筋肉をホモジナイズし、遠心し回収した上清のタンパク質濃度を測定した後、Akt, ERK-1/2, mTOR, FoxO-1, FoxO-3のリン酸化、insulin receptor substrate-1の発現、抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2, Bcl-XLの発現、アポトーシス誘導に関連するcaspase-8, caspase-9の発現を測定した。

RT-PCR: 各筋肉からRNAを抽出し、骨格筋のタンパク分解に係るユビキチンリガーゼであるAtrogen, MuRFの発現を測定した。

### (2) HMBの運動による骨格筋増加への影響ならびにそのメカニズムの解明

老齢マウス(18月齢)を1) 無処置群(運動なし群)、2) 運動群;トレッドミル走行(8m/min, 30min/日から徐々に15m/min, 60min/日に運動量を増加, 3日間/週)2か月間実施、3) HMB投与群; HMB 0.25g/kgを連日2か月間投与、4) 運動+HMB投与群;トレッドミル走行と同時にHMBを投与の4群に分割し、2か月後上記と同様両側の下腿腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出し、その筋肉量を定量化後、一部組織用に固定、一部はmRNAの定量、タンパク定量目的に液体窒素で凍結し保存した。

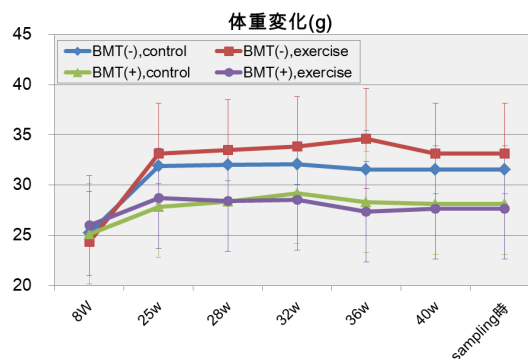
## 4. 研究成果

### (1) 骨髄由来筋前駆細胞のサルコペニアへの影響

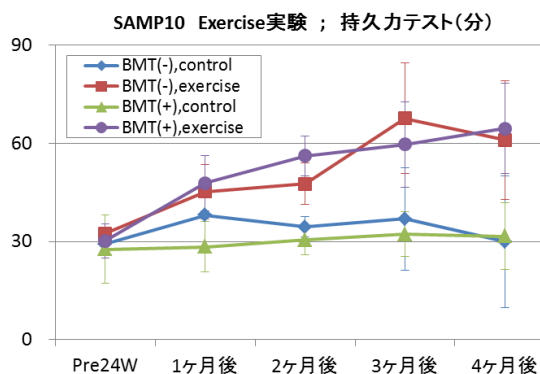
野生型マウスでは老年マウスの運動能、筋肉量などは若年マウスとの差を十分認めることができず、老化モデルとしては今回使用できないことが判明した。

従って、その後はSAMP10マウスを用いて検討した。当初、30週齢のSAMP10マウスに野生型(C57BL/6)の骨髄移植を実施したが、全て長期生存させることが困難であったため、やむなく8週齢の若いSAMP10マウスに野生型またはGFPマウスの骨髄を移植した。

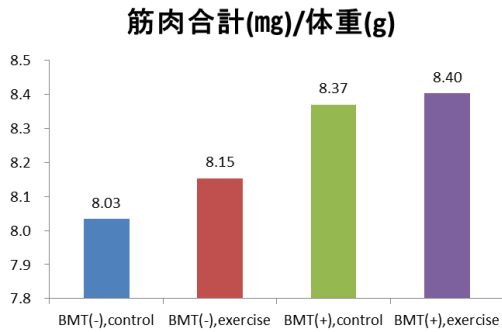
GFPマウスを使用した移植実験では、末梢血のフローサイトメトリーの結果から、ほぼ97%骨髄が入れ替わり、100%生存する系を確立した。さらに、骨髄移植群では骨髄由来細胞は下肢骨格筋細胞の20%前後を占め、特に運動介入群で有意にその割合が多かった。一方移植群では対照群に比較し低体重であった。40週齢までその傾向は持続した。



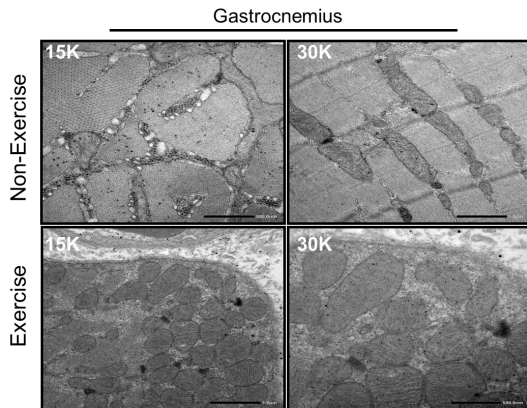
運動介入群では有意に持久力を認め、移植群ではより早期に運動介入の効果を確認した。が、一方最終的には持久力では移植群との間に有意な相違を認めなかった。



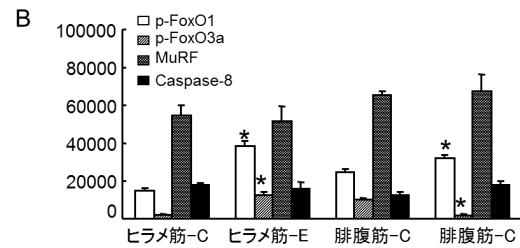
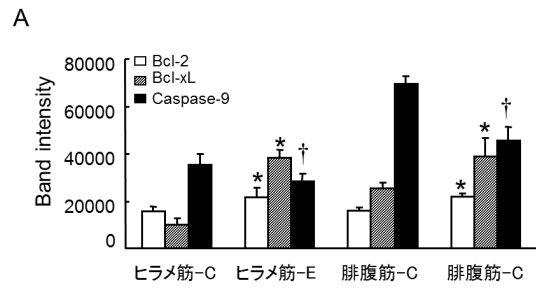
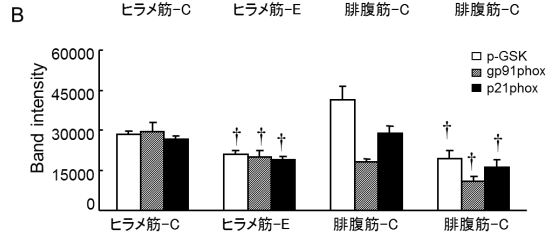
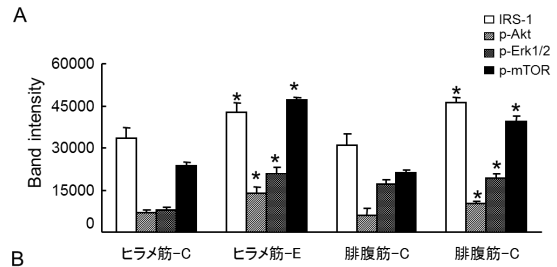
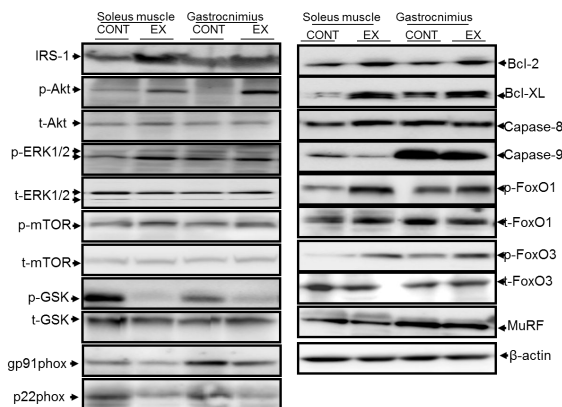
移植群では運動介入群で有意に握力が強く、体重で補正した筋肉量は腓腹筋、足底筋で移植群で高値であった。次の図は体重あたりの平均総下肢筋肉量を示す。



運動介入により骨格筋のタンパク分解に係るユビキチンリガーゼである Atrogen, MuRF の発現が低下していた。また運動介入により SAMP10 下肢骨格筋におけるミトコンドリア量が著しく増加。肥大化していた。下の電顕写真は腓腹筋における対照群、運動介入群のミトコンドリアを示す。

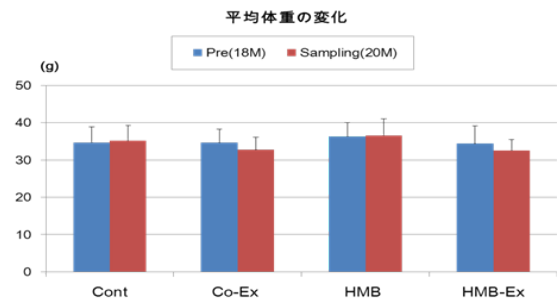


さらに、運動介入した群では非介入群に比較し、下肢骨格筋で Akt, ERK-1/2, mTOR, Fox0-1, Fox0-3 のリン酸化, insulin receptor substrate-1 の発現, 抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2, Bcl-XL の発現が亢進していたが、逆にアポトーシス誘導に関連する caspase-8, caspase-9 の発現は低下していた。以下には種々のたんぱく質のウェスタンブロットの結果を示す。



**(2) HMB の運動による骨格筋増加への影響ならびにそのメカニズムの解明**

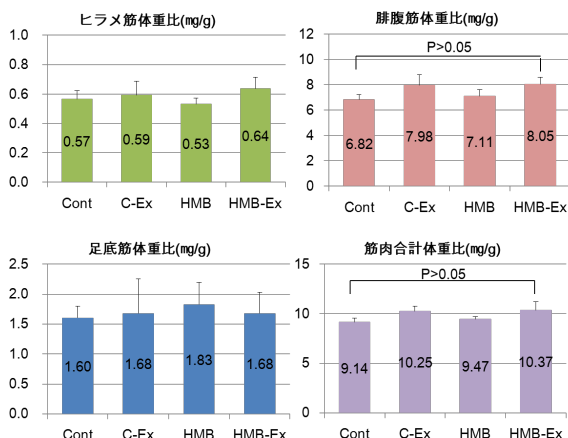
運動介入群でやや体重減少を認めたが、有意差は認めなかった。



老齢 Wild マウスは、いずれの筋肉においても非運動群に比べ運動群の筋肉体重比が大きかった。HMB を投与した老齢 Wild マウスは、腓腹筋とヒラメ筋で運動群の方が大きかった。各筋肉体重比の統計解析では、腓腹筋でのみ有意差があった。

今回の研究では HMB の筋肉体量の増強作用自体は明らかにできなかった。野生型の 20 月齢程度では明らかな筋肉量低下自体を認

めず、差がでにくかった可能性が考えられる。



結論：骨髄由来幹細胞の一部は骨格筋に分化することが明らかとなった。SAMP10におけるサルコペニアの一部は骨髄を野生型に置換することにより、改善させることができ、サルコペニアの原因の一部は骨髄細胞の老化が関連している可能性が示唆された。また、運動介入は筋タンパク分解系を抑制し、ミトコンドリアを活性化し、サルコペニアを予防できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kimura K, Cheng XW, Inoue A, Hu L, Koike T, Kuzuya M. -Hydroxy- -methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor / interferon -induced MuRF-1 expression in C2C12 cells. *Nutr Res.* 査読有 2014 Apr; 34(4):368-74. DOI: 10.1016/j.nutres.2014.02.003.

葛谷 雅文. サルコペニア—成因と対策 病因 原発生ならびに二次性サルコペニアと動物モデル. *医学のあゆみ* 査読無 248(9) 696-700, 2014.

葛谷 雅文. サルコペニアと栄養 腎と骨代謝 査読無 26 (2) 135-141, 2013

葛谷 雅文. サルコペニア予防・治療と栄養の考え方(Q&A). *医事新報* 査読無 No. 4600 56-57, 6.23, 2012

〔学会発表〕(計3件)

木村 薫, 成 憲武, 井上 愛子, 胡 麗娜, 葛谷 雅文. C2C12細胞におけるタンパク分解に対するHMBの効果 atrogen-1, MuRFの発現とその制御に関して 第29回日本静脈経腸栄養学会学術集会 平成26年2月27日 横浜市 パシフィコ横浜

葛谷 雅文. サルコペニアとは? その

overview 第23回日本老年医学会九州地方会 シンポジウム 「オムニバスシンポジウム: 高齢者サルコペニアの病態と治療」 平成25年3月9日 福岡市 九州大学医学部百年講堂  
葛谷 雅文. シンポジウム 高齢者の「サルコペニア」ならびに「虚弱」とその対策 第54回日本老年医学会学術集会 平成24年6月28日 東京都千代田区 東京国際フォーラム

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛谷 雅文 (KUZUYA, Masafumi)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 10283441

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

成 憲武 (Xian Wu, Cheng)  
名古屋大学・医学系研究科・特任准教授  
研究者番号: 30378228