

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590651
 研究課題名（和文）加齢性筋肉減弱症における筋メタボリズムの意義：筋萎縮モデル動物を用いた検討
 研究課題名（英文）The role of skeletal muscle metabolism in sarcopenia: An investigation using an animal model for muscle atrophy
 研究代表者
 杉本 研 (SUGIMOTO KEN)
 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 助教
 研究者番号：20437403

研究成果の概要（和文）：

加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）のモデル動物を確立するため、高齢高血圧自然発症ラット（SHR）の骨格筋の表現型と分子生物学的検討を、Wistar Kyoto ラット（WKY）を対照として行った。結果、高齢 SHR において骨格筋重量の低下、炎症細胞浸潤、インスリン抵抗性、筋タンパク分解関連分子の発現増加、筋衛星細胞マーカーの発現低下等を認めた。本結果から高齢 SHR のサルコペニアモデルとしての妥当性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In order to establish the animal model for sarcopenia, we performed comparative analyses for phenotypes and molecular mechanisms between aged Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) and Wistar Kyoto Rats (WKY). Muscle mass, infiltration of inflammatory cells in skeletal muscle, insulin resistance, the increased expression of the genes related to muscle protein degradation and the decreased expression of the marker of muscle satellite cells were observed in aged SHR not in WKY. These results might justify aged SHR as a sarcopenia model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：老年医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の転倒による骨折は寝たきりの原因の第 2 位であり、その転倒を引き起こす原因として、下肢筋力やバランス機能の低下が考えられている。最近では、運動機能低下を引き起こす病態群を「運動器不安定症（ロコモティブシンドローム）」と呼び、この症候群にどう介入するかが転倒や寝たきり防止

において注目されている。また、肥満や糖尿病といった生活習慣病の罹患率は加齢により上昇するが、これらの疾患群での転倒率も高いことが知られており、脳血管障害、骨粗鬆症、認知症などを介した機序が考えられている。一方、糖尿病患者や肥満者の骨格筋で、筋代謝の低下が認められることが知られているが、筋代謝の低下が筋力低下の原因とな

るかについては明らかにされていない。

(2) 骨格筋量低下と筋代謝障害との関連性についての報告はいくつか存在するが、加齢性筋肉筋減弱症(サルコペニア)における骨格筋代謝について検討した報告は少なく、代謝疾患との関連性も明らかではない。また、モデル動物を用いたサルコペニア研究の報告が少ないこともこの研究分野の問題である。

(3) 近年、筋力低下や骨格筋代謝低下の機序や介入による改善効果を検討した研究が増加している。筋力低下の改善については、持久トレーニングや温熱療法などの有効性が示されている。一方、糖尿病や肥満の骨格筋では代謝能の低下、ミトコンドリア機能の低下が認められ、運動やチアゾリジン誘導体、ビッグアニド等がその改善効果を有することが示されている。しかし、双方の関連性に着目した研究はない。

(4) 我々は過去に以下のことを報告した。①高脂肪・高炭水化物食により作成した肥満ラットにおいて、PPAR γ 作用を有するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)であるテルミサルタンが、PPAR γ 作用を有さないARBを超えた脂肪細胞肥大化抑制を介したインスリン抵抗性改善作用、体重増加抑制とエネルギー代謝改善効果を有する(図2、*Hypertension* 47, 1003, 2006)。②そのエネルギー代謝改善効果に骨格筋の脂肪酸 β 酸化能亢進が関与し(*J Hypertens* 26:1209, 2008)、ミトコンドリア機能調節因子のうち熱産生調節分子UCP2,3の発現増加、酸化ストレス消去系分子MnSODの発現増加により、ATP産生を介さない効率的なエネルギー消費増強効果を示す(日本心血管内分泌代謝学会シンポジウム、2008)。他施設からもアンジオテンシン II が骨格筋ミトコンドリア量の減少、機能の減弱を誘導し、アンジオテンシン II 作用の遮断により、ミトコンドリア量と代謝能が回復することが報告されている。以上のことは、骨格筋代謝においてミトコンドリアの量的・質的調節がその機能改善に重要な役割を果たし、このことに心血管病発症と関連の強いアンジオテンシン II 経路が関与する可能性を示している。この仮説に基づけば、ARB等を用いることにより、サルコペニアに対するリハビリ効果が増強し、早期回復に貢献することが予想され、臨床応用への期待が大きい。

(5) サルコペニアのモデル動物として、高齢期のF344系ラット、Wister系やSD系ラット等が過去に用いられているが、実際にはサルコペニアの表現型を呈していない場合が多い。この問題を解決するため、元来膝関節拘縮モデルとされているギプス固定モデルと、無重力による筋萎縮モデルとされている後肢懸垂モデルをサルコペニアモデルとして応用することが考えられ、これらの方法を用いたサルコペニア研究が最近みられるようになった。しか

し、これらのモデルを用いて筋代謝を検討した報告はない。

2. 研究の目的

高齢者におけるサルコペニアと筋メタボリズムの関連性を解明するため、サルコペニアモデル動物の作成・確立と、そのモデル動物用い、筋萎縮と筋代謝低下の関連性と、その筋力回復への影響を解明する研究、を計画した。

3. 研究の方法

サルコペニアの発症メカニズム解明と予防における質の高い研究を行うため、再現性の高いサルコペニアモデル動物の作成・確立を行う。さらに表現型、分子生物学的プロファイルの差を検討し、筋萎縮と筋代謝低下に関連する遺伝子群について、Gene Chipを用いた網羅的遺伝子発現解析を、高脂肪高炭水化物食負荷群と通常食群間比較を含めて行う。

(1) 筋萎縮モデルの作成：

高齢SDラットを対象とし、①ギプス固定法(下腿片側)、①後肢懸垂法を使用(右写真参照)。

ギプス固定群、後肢懸垂群、対照群を作成し、2週または4週間後に以下を検討する。

長期利用可能性とラットの耐性の検討：ギプス固定、後肢懸垂ともに定期的な観察によるそれぞれのシステムの耐用性を、また摂食量、体重変化により動物の耐性を検討する。その後、各々のモデルについて、大腿及び下腿周囲径・筋力(等尺性収縮力測定)・筋サイズ・筋重量の測定、筋組織学的検査、筋ミトコンドリア含有量(mtDNA)測定、組織培養(ex-vivo)による脂肪酸酸化能測定、骨格筋代謝またはミトコンドリア機能関連遺伝子の発現定量をそれぞれ行い、対照群との比較により、サルコペニアモデルとしての妥当性を検討する。以上により、本研究に適したモデルの抽出を行う。

(2) 高脂肪高炭水化物食負荷群と通常食群間の分子生物学的プロファイルの差の検討：

若齢期(7~8週齢)から高脂肪高炭水化物食負荷(HFD)により肥満・糖尿病を発現させ、その後①で抽出されたサルコペニア形成法を適応し、普通食群(ND)との間で、モデルの妥当性評価に用いた検討項目に加え、血圧・空腹時血糖・血清インスリン値測定、筋組織中トリグリセライド(TG)濃度測定、間接熱量測定を行い、筋萎縮と筋代謝低下との関連性を検討する。鍵分子の同定については、筋萎縮+HFD、筋萎縮+ND、対照+HFD、対象+NDの4群から、下肢骨格筋(大腿四頭筋、ヒラメ筋、長指伸筋)を単離し、mRNAを調整後、未知の遺伝子を含む約12,000の遺伝子の遺伝子発現プロファイル解析量の発現が可能なGene Chip(Affymetrix社製)により、筋萎縮と筋代謝低下に関連する発現遺伝子の

網羅的検討を行う。

(3) 初年度で確立したサルコペニアモデルを用いて、我々がこれまでに明らかにした骨格筋ミトコンドリア代謝改善作用（熱産生亢進+酸化ストレス除去による効率的なエネルギー代謝促進作用）を示す薬剤（選択性 PPAR γ 作動性 ARB: SPPARM）、または骨格筋特異的な IGF-1 発現誘導を介した骨格筋量低下抑制作用が報告されているグルココルチコイド受容体阻害薬である Mifepristone (RU-486) を、筋萎縮形成前から投与することにより、筋萎縮完成後の筋力回復過程における差異、さらにその筋力回復過程に運動負荷を加えた場合の回復スピードに対する影響を検討する。また、網羅的遺伝子解析により同定され、筋萎縮抑制に関連する鍵分子と考えられる分子については、その発現を分子生物学的に *in vivo* で制御し、筋肉量や筋代謝における変化の観察を行う。

4. 研究成果

(1) 筋萎縮モデル（ギプス法、後肢懸垂システム）作成については、2012 年度に特に後肢懸垂システム（夏目製作所に協力依頼）

の作成に従事した。食事摂取や体重の変化がない方法を試行錯誤し、左写真のようなシステムの構築に成功した。このモデル

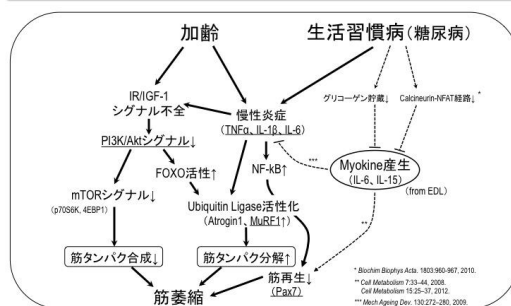


は、筋萎縮からの修復過程の研究に使用可能であると考えた。しかし、本研究の目的として、サルコペニアモデル動物の作成を中心に行う方針とし、加齢または生活習慣による筋量低下モデルの作成のため、下記の研究にシフトした。

(2) 比較的高齢（30 週齢）高血圧自然発症ラット（SHR）と Wistar Kyoto ラット（WKY）を対照とし、高脂肪食高炭水化物負荷が、骨格筋に与える影響について検討した。その根拠は、SHR が 28 週齢で既に野生型である WKY と比較し、筋量、筋力低下とインスリン抵抗性を示すことが報告されていたからである。20 週齢の SHR と WKY に、通常食（ND）と高脂肪高炭水化物食（HF）を 12 週間与え、32 週齢時に各種検討を行った。体重は、SHR-HF で SHR-ND、WKY より高値であった。経口糖負荷試験（OGTT）では SHR-HF で SHR-ND、WKY より AUC が高値であった。遅筋成分が主であるヒラメ筋（SOL）重量は 3 群で差はなかったが、速筋成分が主である長指伸筋（EDL）重量は SHR-ND、SHR-HF で低下していた。筋タンパク分解に関わるユビキチンリガーゼ関連分子であ

る Atrogin1、MuRF1 は、SHR-HF でのみ、その発現増加を認めた。筋修復作用を有する筋衛星細胞のマーカーである Pax7 の発現は SHR-HF で低下を認めた。これまで、高齢（24 ヶ月齢程度）ではじめてみられるような筋の量的・質的変化が、比較的高齢な SHR で認められ、さらに高脂肪高炭水化物食によりより顕在化したことは、この動物がサルコペニアのモデル動物として妥当であることを示唆しており、今後さらにその意義とメカニズムを解明する上で、重要なモデル動物となり得ると考えられる。本検討に加え、運動直後に骨格筋から産生されるサイトカイン（マイオカイン）に関する検討も行った。30 週齢の SHR と WKY に対して、30 分の水泳による運動負荷の前後で各種サイトカインの変化を検討した。I ベースラインの IL-6 の発現は、SOL では変化がなかったが、EDL では、SHR-ND、SHR-HF で運動後に有意に増加した。筋肥大の誘導に関連し、抗炎症に作用する IL-15 は、SOL では発現自体が低かったが、EDL では運動後に 3 群とも増加し、SHR-ND、SHR-HF の順でその発現の低下がみられた。一方、サイトカインのうち、TNF α 、IL1 β については、SHR-HF で増加を認め、組織学的検討においても骨格筋への炎症細胞の浸潤が SHR-HF において認められたが、IL-6 と IL-15 の発現は SHR-HF で低下した。IL-6、IL-15 については運動前後で発現が増加するが、SHR ではその増加率が減少していることを見出した。以上のことから、本動物モデルでは筋タンパク分解と炎症、筋衛星細胞数低下等を基盤とした骨格筋量低下がみられているが、その調整にマイオカイン産生能が関与していることが示唆された（下図参照）。

生活習慣病と筋肉減弱症との関連メカニズム



杉本博か、2012

以上の内容については、各種学会と邦文原著で報告した。

しかし、以上はすべて観察された結果からの推察に留まっており、前述の仮説の妥当性を検証するため、引き続き本年度から承認を頂いた基盤研究 C で検討を継続する。(3)(2)で述べたサルコペニアモデル動物を使用し、SPPARM や RU-486 を用いた介入を当初計画していたが、以後の再検討

により、現在はアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）を用いた検討を行っている。その根拠は、高齢高血圧患者を対象とした ACEI の使用研究により、ACEI を継続服用した群で、他の群と比較し歩行速度の低下が抑制されたこと、ACEI により骨格筋量の増加を示した基礎的研究があることである。高脂肪高炭水化物食負荷 SHR を用いた ACEI の有無による検討については現在進行中であり、前述と同様、引き続き本年度から承認を頂いた基盤研究 C で継続する。

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）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. 杉本 研. サルコペニアにおける骨格筋ミトコンドリア機能と Myokine の意義. 日老医誌. 49:199-202, 2012.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/geriatrics/49/2/49_199/_pdf

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 杉本 研. サルコペニアにおける骨格筋ミトコンドリア機能と Myokine の意義. 第 53 回日本老年医学会総会. 平成 23 年 6 月 16 日 東京.
2. 杉本 研. 生活習慣病が骨格筋に及ぼす影響：自然発症高血圧ラット（SHR）を用いた検討. 第 22 回日本老年病学会近畿地方会. 平成 23 年 11 月 5 日 神戸.
3. 杉本 研. 生活習慣病が骨格筋に及ぼす影響：自然発症高血圧ラット（SHR）を用いた検討. 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総会. 平成 23 年 11 月 25 日、大阪.
4. 杉本 研. 生活習慣病が筋由来サイトカイン（Myokine）産生に与える影響の検討. 第 55 回日本糖尿病学会総会. 平成 24 年 5 月 19 日 横浜.
5. 杉本 研. 生活習慣病が筋由来サイトカイン（Myokine）産生に与える影響の検討. 第 54 回日本老年医学会総会. 平成 24 年 6 月 28 日 東京.
6. 杉本 研. 生活習慣病が筋由来サイトカイン（Myokine）産生に与える影響：高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた検討. 第 35 回日本高血圧学会総会. 平成 24 年 9 月 21 日 名古屋.

〔その他〕

ホームページ等：

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/www/index_g.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 研 (SUGIMOTO KEN)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 助教

研究者番号：20437403

(2) 研究分担者

楽木 宏実 (RAKUGI HIROMI)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 教授

研究者番号：20252679