

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350634

研究課題名(和文) SIRT1活性化物質レスベラトロールの筋萎縮に対する長期的効果の検討

研究課題名(英文) Long-term therapeutic potential of resveratrol on the progression of muscle atrophy in a mouse model of congenital muscular dystrophy

研究代表者

萩原 宏毅 (HAGIWARA, HIROKI)

帝京科学大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：80276732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、SIRT1(サーチュイン1)活性化物質であるレスベラトロールの筋萎縮に対する長期的効果の検討を行った。研究対象には、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーモデルのdy-2Jマウスを用いた。このマウスに、レスベラトロールを投与し、1年以上にわたりその体重、筋力、活動量、寿命に対する長期的な効果を見た。その結果、レスベラトロールが線維化を改善し、筋ジストロフィー症状の進行を抑制することを見出した。その機序として、オステオポンチンを介する経路が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Resveratrol (RSV), a naturally derived polyphenol, has recently shown to exhibit anti-aging effects by activating SIRT1 (sirtuin 1). To examine the long-term therapeutic potential of on muscular dystrophies, we examined whether pathogenesis in dy-2J mice (a model for congenital muscular dystrophy type 1A (MDC1A)) is ameliorated by prolonged administration of resveratrol. RSV was orally administered ad libitum to mice for over 1 year. We compared resveratrol administrated (RSV-treated) with control (non-treated) groups by physiological and histological analyses. RSV-treated group showed a significant improve in body weight, muscle strength and locomotive activities than control group. By histological analysis, we found that RSV-treated group showed larger in cell size and less fibrosis in comparison with control group. These results suggest that long-term administration of resveratrol suppresses the progression of muscular dystrophy in dy-2J model mice by reducing fibrosis.

研究分野：筋生物学

キーワード：レスベラトロール サーチュイン 1 先天性筋ジストロフィー 筋原性制御因子 線維化 オステオポンチン 廃用性筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 (サーチュイン1) は、老化遅延・寿命延長効果の中心的分子として近年注目されている。この SIRT1 を活性化する物質の1つとしてレスベラトロール (RSV) が知られている。この RSV は、赤ワインのブドウの皮などに多く含まれるポリフェノールの一種である。RSV はカロリー制限と同じ効果を持ち、様々な加齢性疾患のリスクを下げる物質として関心が高まっている (文献)。

(2) しかし、筋ジストロフィーに対する RSV の長期的な効果は検討されていない。また、骨格筋に対する RSV の作用機序についても、抗酸化作用や線維化抑制作用など推定されているが、未だ解明されていない。

2. 研究の目的

RSV の筋ジストロフィーに対する効果を、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (MDC1A) のモデルとされる *dy-2J* マウスを用いて検討した。具体的に以下の2つを解明することを研究目的とした。

(1) 筋ジストロフィー、加齢性および廃用性筋萎縮に対する RSV の長期的効果を検討する。

(2) 骨格筋に対する SIRT1 を介した RSV の作用機序について、特に骨格筋構成に関わるタンパク、筋原性制御因子 (MRFs) や筋萎縮に関わる遺伝子の発現の変動に注目して解明する。

3. 研究の方法

(1) 先天性筋ジストロフィーモデル *dy-2J* マウスに、RSV 4g/kg を離乳直後から食餌に混ぜて投与し、1年以上にわたりその体重、握力、活動量、寿命に対する長期的な効果を

みた。

(2) 生検筋の病理組織学的評価のため、H&E 染色、Sirius red 染色、抗 collagen I 抗体にて免疫染色を行った。

(3) RSV 摂取が遺伝子発現に与える影響を、マイクロアレイ法にて網羅的に解析した。

(4) これらの解析の結果から RSV の作用機序の検討を行った。

4. 研究成果

(1) RSV を投与した群は、Kaplan-Meier 生存曲線による解析にて、対照群と比較して寿命の延長が認められた (投与群 = 58 週、対照群 = 42 週、各 n=8) (図1)。

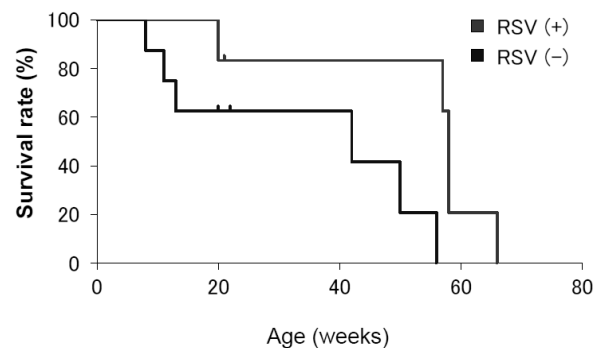


図1 Kaplan-Meier 生存曲線

また、RSV 投与群では、20 週齢以降の体重、握力、活動量の低下が対照群と比較して軽度であった (握力: 図2. $p < 0.05$)。

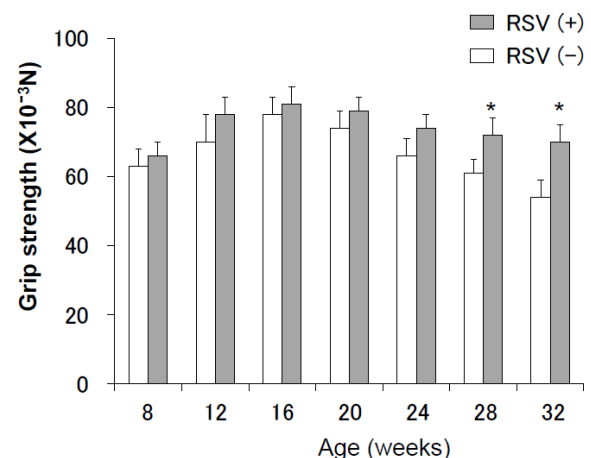


図2 握力

(2) 骨格筋組織学的検討では、H&E 染色にて RSV 投与群は対照群と比較して細胞が大きかった。Sirius red 染色、抗 collagen I 抗体免疫染色にて線維化の軽減が認められた (図 3。Quadriceps 20 週齢。上段 : Sirius red 染色、下段 : 抗 collagen I 抗体免疫染色。Bar = 100 μ m)

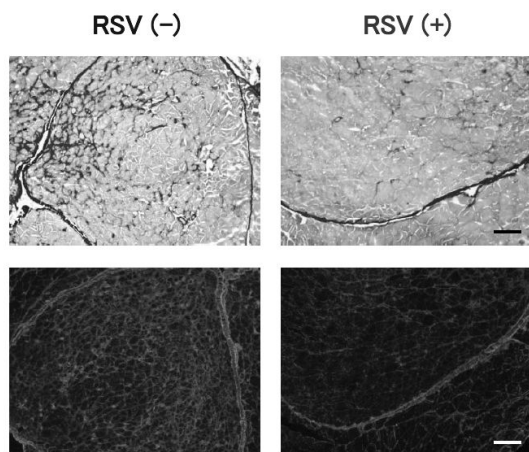


図 3 骨格筋組織学的検討

(3) マイクロアレイ法にて、対照群に対する RSV 投与群の遺伝子発現の変化を fold change で解析した。Sirt1 関連遺伝子や筋原性制御因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) の発現に大きな変動はみられなかった。一方、collagen 2a1 : 4.12、collagen 3a1 : -2.51、collagen 6a2 : -2.10、collagen 10a1 : 3.05、matrix metalloproteinase (MMP) 1b : 1.83、MMP8 : 6.63、MMP9 : 4.12、MMP13 : 5.82 と、線維化や細胞外マトリックスの構築に関わる遺伝子の発現に変動がみられた。さらに、osteopontin (オステオポンチン) の発現が約 4 倍変化していた。

(4) 作用機序の検討のため、免疫組織化学、Western blot で osteopontin や MMP9 の発現を検討した。その結果、RSV の投与により osteopontin や MMP9 の発現の低下が認められた。

(5) さらに、研究実施計画で予定した運動制

限をかけた条件 (廃用性筋萎縮) でのモデルマウスに対する RSV の効果を検討するため、モデルマウスの作成を試みた。廃用性筋萎縮モデルマウスとしては、従来からよく用いられている後肢懸垂法やギプス固定法に加えて、独自に筋萎縮誘発法を考案した。この独自開発の筋萎縮誘発法の効果について検討したところ、従来法に近似する萎縮誘発が可能であることが分かった。

(6) 成果の位置づけとインパクト、今後の展望

これらの結果をまとめると、

RSV を投与した群は、対照群 (通常食餌) と比較して、寿命が長く、20 週齢以降の、体重、筋力、活動量の低下が軽度であった。

骨格筋組織学的検討では、投与群は対照群に比較して細胞が大きく、線維化の軽減がみられた。

マイクロアレイでは、Sirt1 関連遺伝子や MRFs 発現に大きな変動はなかった。一方、collagen や matrix metalloproteinase (MMP) 群遺伝子に大きな変動が認められた。さらに、osteopontin の発現が約 4 倍変化していた。

免疫組織化学、Western blot での検討では、RSV の投与により osteopontin や MMP9 の発現の低下がみられた。

以上より、RSV が線維化を改善し、筋ジストロフィー症状の進行を抑制する可能性が示唆された。RSV 摂取で、後肢懸垂ラットの筋萎縮が改善したという報告や、mdx マウスの筋ジストロフィー変化が改善したという報告がある。しかし、いずれも短期間投与後の一時的な解析に留まっている。一般に筋疾患は慢性の経過をとることが多く、また予防的使用も視野に入れると、RSV の長期的効果とその作用機序を解明することは重要である。その機序の検討を行ったところ osteopontin を介して MMP の発現が調節され、線維化が軽減することが考えられた。

<引用文献>

Tennen RI、 Michishita-Kioi E、 Chua KF、
Finding a target for resveratrol、 *Cell*、
148、 2012、 387-9.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

相原正博、廣瀬昇、斉藤史明、丸山仁司、
萩原宏毅、新規筋萎縮誘発法であるベル
ク口法とギプス固定法との比較検討、日
本基礎理学療法学雑誌、査読有、19(1) 、
2016、 39

萩原宏毅、神経リハビリテーション - 神
経筋疾患臨床のトピックス、理学療法科
学、査読有、30(5) 、 2015、 1

[https://mol.medicalonline.jp/archive
/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&is
sue=suppl-5](https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&issue=suppl-5)

相原正博、廣瀬昇、斉藤史明、丸山仁司、
萩原宏毅、マウスにおける筋萎縮誘発方
法の比較検討 - ギプス固定法、後肢懸垂
法とプラスチックチューブ固定法との
比較、理学療法科学、査読有、30(5) 、
2015、 9

[https://mol.medicalonline.jp/archive
/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&is
sue=suppl-5](https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&issue=suppl-5)

廣瀬昇、相原正博、斉藤史明、萩原宏毅、
骨格筋萎縮に対するポリフェノールの長
期的効果と作用機序の検討、理学療法科
学、査読有、30(5) 、 2015、 10

[https://mol.medicalonline.jp/archive
/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&is
sue=suppl-5](https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ca8ryoho&ye=2015&vo=30&issue=suppl-5)

萩原宏毅、斉藤史明、真先敏弘、松村喜
一郎、園生雅弘、レスベラトロールは線

維化を軽減し先天性筋ジストロフィーモ
デルの症状を改善する。臨床神経学、査
読有、54 、 2014、 1297

萩原宏毅、斉藤史明、真先敏弘、清水輝
夫、松村喜一郎、園生雅弘、レスベラト
ロールの先天性筋ジストロフィーモデル
マウスに対する効果の検討。臨床神経学、
査読有、53 、 2013、 1578

〔学会発表〕(計4件)

相原正博、廣瀬昇、斉藤史明、丸山仁司、
萩原宏毅、ギプス固定法に代わる新規筋
萎縮誘発法の開発、第1回日本筋学会学
術集会、2015年8月8日、東京

萩原宏毅、神経科学に立脚した筋力低下
に対する治療法の開発、第25回体力・栄
養・免疫学会、2015年8月22日、東京

斉藤史明、萩原宏毅、真先敏弘、松村喜
一郎、先天性筋ジストロフィーモデルに
対するレスベラトロールの長期的効果と
作用機序の検討。独立行政法人国立精
神・神経医療研究センター精神・神経疾
患研究開発費26-8「筋ジストロフィー
関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」
平成26年度「西野班」班会議、2014
年12月5日、東京

斉藤史明、萩原宏毅、真先敏弘、清水輝
夫、松村喜一郎、レスベラトロールの先
天性筋ジストロフィーモデルマウス対す
る効果の検討。独立行政法人国立精神・
神経医療研究センター精神・神経疾患研
究開発費23-5「筋ジストロフィーおよ
び関連疾患の診断・治療開発を目指した
基盤研究」平成25年度「西野班」班会
議、2013年12月6日、東京

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/iry
ou/ot/hagiwara.html](http://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/iry
ou/ot/hagiwara.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 宏毅 (HAGIWARA, Hiroki)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：80276732

(2) 研究分担者

真先 敏弘 (Masaki, Toshihiro)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：00585028

斉藤 史明 (SAITO, Fumiaki)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：40286993

廣瀬 昇 (HIROSE, Noboru)
帝京科学大学・医療科学部・准教授
研究者番号：60460391

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし