

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462284

研究課題名(和文)新規活性型ビタミンD3製剤による筋疲労抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism underlying prevention of muscle fatigue by eldecalcitol, a new vitamin D3 analogue

研究代表者

宮腰 尚久 (Miyakoshi, Naohisa)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90302273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症薬である活性型ビタミンD薬(アルファカルシドール(ALF))および新規活性型ビタミンD薬(エルデカルシトール(ELD))は、筋に作用し高齢者の転倒予防に寄与していると考えられている。本研究では、ステロイド投与により骨粗鬆症状態とした高齢ラットに、2週間または4週間、活性型ビタミンD薬を投与することで、その骨・筋に対する効果を比較・検討した。骨を大腿骨骨密度で、筋を下腿の筋張力・筋疲労度・筋線維断面積・筋遺伝子で評価した。結果は、2週間のALF投与で骨密度が増加し、2週間のELD投与により筋遺伝子発現の増加を認めた。4週間のELD投与は筋張力・筋線維断面積・骨密度を維持する傾向であった。

研究成果の概要(英文)：Activated vitamin D3 analogues, such as alfacalcidol (ALF) and eldecalcitol (ELD), are used for the treatment of osteoporosis. In recent years, vitamin D3 has been considered effective for not only bones, but also skeletal muscles and reduced risk of falls. In this study, we administered ALF or ELD to glucocorticoid-treated osteoporotic rats for 2 or 4 weeks to evaluate their effects on bones and skeletal muscles. The bone mineral density (BMD) of the femur was measured. Muscle strength, fatigue, cross-sectional area (CSA), and gene expressions in the lower limb were also measured. After 2 weeks of ALF treatment, the BMD was increased. After 2 weeks of treatment with ELD, the BMD and muscle-related gene expressions were increased. After 4 weeks of treatment with ELD, the muscle strength, CSA, and BMD tended to be maintained.

研究分野：医歯薬学

キーワード：筋・神経病学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨粗鬆症は、加齢とともに増加する女性に多い疾患であり、わが国では 70 歳以上女性の二人に一人は骨粗鬆症に罹患していると考えられている。高齢の骨粗鬆症患者は、疾患自体による骨脆弱性に加えて、加齢に伴う筋力やバランス能力の低下により、容易に転倒し、骨折を生じやすい。高齢者では、骨折を生じることにより日常生活動作が制限され生活の質が低下し、さらに転倒・骨折を契機として寝たきりに移行してしまうことも多く、わが国では、高齢者の転倒・骨折は、脳血管疾患、認知症、老衰に続いて、要介護の原因の上位に位置付けられている。中でも、骨粗鬆症に起因する高齢者の大腿骨近位部骨折や脊椎椎体骨折は、生命予後の悪化にもつながるため、その対策が急務である。

(2) 骨粗鬆症による骨折を予防するには、各種の骨粗鬆症治療薬により骨量(骨密度)を維持、増加させることが必須である。しかし、高齢者の場合には、薬物療法によってわずかに骨量が増加しても、転倒してしまえば骨折をきたす可能性が高いため、むしろ転倒を予防することが重要と考えられる。そのため、易転倒性の高齢骨粗鬆症患者にとっては、骨量を維持する作用がありながら、さらに転倒も予防できる薬剤が望まれる。活性型ビタミン D 薬は、骨吸収を抑制する骨粗鬆症治療薬として以前より使用されてきた薬剤である。その骨量に対する効果は、近年処方されることが多いビスホスホネート薬に比べて弱いことが、我々の臨床研究からも明らかとなっている。ビタミン D の受容体は骨だけではなく筋にも存在していることから、活性型ビタミン D 薬による骨折予防効果は、単に骨に対する効果のみではなく、筋に対する効果もあるのではないかと考えられる。易転倒性を有する高齢者では、血清中のビタミン D 濃度が低下しているという報告や、ビタミン D が不足している骨粗鬆症患者の筋と、充足している患者の筋では、筋組織の組成に変化があるという報告もある。従って、活性型ビタミン D 薬は、筋力低下や筋疲労の抑制に関与して、転倒を防止する可能性があると考えられる。しかし、その作用機序は明らかになっていない。

(3) 新規活性型ビタミン D 薬であるエルデカルシトールが、骨吸収抑制作用の他、局所の骨形成促進作用を示し、従来の活性型ビタミン D 薬と比較し、より高い骨折予防効果を示すことが明らかとなってきた。しかし、従来の薬剤と同様に、その筋に対する作用機序については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、平成 16 年度 基盤研究(C) 課題番号 16591470「骨粗鬆症治療薬の実験骨

粗鬆症に対する組織学的・生化学的検討」から継続し発展して行われる研究であり、ラットを用いた研究により、活性型ビタミン D 薬の筋に対する作用機序を検証するものである。我々の研究では、ラットを用いてステロイド投与下で続発性骨粗鬆症・筋力低下モデルを作製し、従来の活性型ビタミン D 薬(アルファカルシドール)を投与した結果、筋疲労抑制、筋力(筋張力)低下予防、筋線維断面積縮小抑制効果を認めている。本研究では、新規活性型ビタミン D 薬(エルデカルシトール)の筋に対する作用があるかどうかを、アルファカルシドールと比較することも含め、究明する。

## 3. 研究の方法

(1) 6 カ月齢の雌ラットを、以下の 6 群に分けた。

ビタミン D 薬とステロイドの溶媒を投与した control 群

ビタミン D 薬の溶媒とステロイド(以下、PSL)を投与した PSL 群

PSL の溶媒とアルファカルシドール(以下、ALF)を投与した A 群

PSL と ALF を投与下 PSL+A 群

PSL の溶媒とエルデカルシトール(以下、ELD)を投与下 E 群

PSL と ELD を投与下 PSL+E 群

上記 6 群で薬剤投与期間を 2 週と 4 週とし、合計 12 群を作製した。

薬剤投与は、ステロイドを皮下注射、ビタミン D 薬を経口投与にて行った。

(2) 測定は、以下の 5 項目を行った。

筋張力：ラットの坐骨神経に一定の電気刺激(4V, 0.2ms, 40Hz)を加え、右腓腹筋を収縮させることで、同筋肉の最大筋張力を測定。

筋疲労度：180 秒間電気刺激を加え、30 秒・60 秒・90 秒・180 秒の時点での筋力を計測。

以下の計算式にて筋疲労度を評価。

$$\{(\text{最大筋張力} - \text{各時間での筋張力}) \div \text{最大筋張力}\} \times 100$$

筋線維断面積：左前脛骨筋を ATP 染色し、筋線維を無作為に 10 本計測。これを 5 つの視野で行い、その平均値を求めた。

但し、ALF 投与群以外は、ELD の効果検討のため、I 型筋線維および II 型筋線維の 1 本辺りの断面積を追加測定した。

筋遺伝子：筋は、休止期衛星細胞が活性化し、筋芽細胞、筋管細胞へと増殖・分化していくが、この各過程で発現する遺伝子、Pax7(休止期衛星細胞～筋芽細胞の増殖まで)、MyoD(活性化衛星細胞～筋管細胞の分化決定まで)、myogenin(増殖した筋芽細胞～筋管細胞まで)を RT-PCR 法にて測定した。標本は、左腓腹筋より採取した。また、ビタミン D 薬別の効果を調べる為、control 群・PSL 群・A 群・PSL+A 群もしくは control 群・PSL 群・E 群・PSL+E 群で追

加の比較検討を行った。  
骨密度：右の大腿骨を測定。大腿骨全体・近位部・骨幹部・遠位部の4つに分け測定。

- (3) 統計解析：薬剤投与期間別に、各群間で一元配置分散分析を行った。帰無仮説が棄却された場合は多重比較を行い、Scheffe法またはDunn法で適宜解析を行った。筋遺伝子においては、Wilcoxonの順位検定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各項目の解析結果

筋張力：2週投与では、各群間に有意差を認めなかった。4週投与群では、E群とPSL+E群が、control群より高値 ( $p=0.0473$ ,  $p=0.0408$ ) であった。

筋疲労度：2週・4週投与いずれにおいても、全ての群で経時的に筋疲労度の上昇を認めた。一方、刺激時間毎の各群間の筋疲労度に有意差はなかった。

筋線維断面積：2週投与では各群間に有意差はなかった。4週投与では、E群とPSL+E群が、PSL群より高値 ( $p=0.0086$ ,  $p=0.0402$ ) を示した。

筋線維別に分けた追加測定では、4週投与でE群とPSL+E群が、PSL群より高値 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) であった。

筋遺伝子：ビタミンD薬別に比較した結果では、ALF4週投与によりPSL+A群のMyoD発現は、control群、A群に比べ、高値 ( $p=0.033$ ,  $p=0.0256$ ) を示した。ELDのみの検討では、Pax7およびmyogeninにおいて、2週投与のPSL群とE群のPax7とmyogenin発現がcontrol群より高値 (各  $p=0.0495$ ) であった。

骨密度：2週投与では、A群がcontrol群に比べ、大腿骨全体・近位部・骨幹部・遠位部全てにおいて高値 ( $p=0.0458$ ,  $p=0.032$ ,  $p=0.0221$ ,  $p=0.0027$ ) であった。更に、A群はPSL+A群と比較し、大腿骨遠位部において高値 ( $p=0.0285$ ) を示した。

4週投与では、control群・E群・PSL+E群が、PSL群と比較し、大腿骨遠位部において高値 ( $p=0.0018$ ,  $p=0.0006$ ,  $p=0.0053$ ) であった。

##### (2) 考察

骨：骨密度において、PSLを4週間長期投与した結果、control群と比較して骨密度は低下し、ステロイド性骨粗鬆症モデルを作製できたと考えられる。PSLとELDの併用で、PSL単独投与群より骨密度が高く、control群とも有意差を認めなかったことより、ELD投与がステロイド性骨粗鬆症を抑制できる可能性を示した。

骨格筋：2週投与において、ELD群のPax7, myogenin発現が増加していることと、4週にELDを投与した群で筋張力・II型筋線維断面積が高値を示したことから、ELD投与

により筋の分化が促進され、筋力が維持される可能性が考えられる。一方、PSLを2週間投与した場合でもPax7, myogeninの発現増加が認められるが、4週にはPSLを投与した群での筋張力・筋線維断面積の変化は認められなかった。これは、PSL投与により筋損傷が生じ、筋が再生する過程において一過性に筋遺伝子の発現が促された可能性が考えられる。ALF投与では、4週のPSL併用でMyoDの増加が認められたが、ALF単独での明らかな筋遺伝子の変化は確認できなかった。その他の筋に対する項目においても、ALFによる影響が認められなかったことより、ELDとは筋に対する作用機序が異なる可能性を示唆した。

##### (3) 結語

本研究は、ラットを用いて、ALFとELDの筋に対する作用機序を、筋張力・筋疲労度・筋線維断面積および筋遺伝子を含め検討した初めての研究である。この研究成果から、ELDが投与早期に筋遺伝子 (Pax7, myogenin) の発現を増加させ、筋線維径・筋力を維持する可能性があり、ELDの筋に対する作用機序の解明に微力ながら貢献できたと考えられる。今後の展望として、ELDの臨床における筋に対する効果を検討することと、基礎研究においては、より長期の投与期間で検討すること、他の筋遺伝子に関しても検討すること、などが考えられる。

##### <引用文献>

Miyakoshi N, Shimada Y, Ando S, Minato T, Itoi E. Effects of alfacalcidol alone or in combination with elcatonin on incidence of osteoporotic vertebral fractures in postmenopausal women with spondylosis. *J Bone Miner Metab* (2006) 24(6):491-7.

Suzuki T, Kwon J, Kim H, Shimada H, Yoshida Y et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D levels associated with falls among Japanese community-dwelling elderly. *J Bone Miner Res* (2008) 23(8):1309-17.

Sato Y, Inose M, Higuchi I, Higuchi F, Kondo I. Changes in the supporting muscles of the fractured hip in elderly women. *Bone* (2002) 30(1):325-30.

##### 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)

Kinoshita H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Sakai S, Shiraishi A, Segawa T, Ohuchi K,

Fujii M, Sato C, Shimada Y. Effects of eldcalcitol on bone and skeletal muscles in glucocorticoid-treated rats. J Bone Miner Metab 査読有、(2016) 34:171-178. DOI: 10.1007/s00774-015-0664-4

〔学会発表〕(計4件)

宮腰尚久、木下隼人、齊藤公男、粕川雄司、島田洋一 活性型ビタミン D3 の筋とバランス能力に対する効果(シンポジウム) 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 2015年10月22日~23日 富山県

木下隼人、宮腰尚久、粕川雄司、大内賢太郎、佐藤千恵、藤井昌、島田洋一 エルデカルシトールがステロイド投与ラットの骨密度および骨格筋に及ぼす効果 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014年10月9日 鹿児島

Kinoshita H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Sasaki H, Ohuchi K, Shimada Y. Effects of eldcalcitol on body weight, bone mineral density and skeletal muscle in glucocorticoid-treated rats. ASBMR Annual Meeting, 2014. 9. 12, 13, Houston

木下隼人、宮腰尚久、本郷道生、粕川雄司、大内賢太郎、島田洋一 ステロイド投与ラットの骨密度および筋に対するエルデカルシトールの作用 第32回日本骨代謝学会学術集会 2014年7月24日 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮腰 尚久 (MIYAKOSHI, Naohisa)  
秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：90302273

### (2)研究分担者

本郷 道生 (HONGO, Michio)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：50375250

粕川 雄司 (KASUKAWA, Yuji)  
秋田大学・医学研究科・講師  
研究者番号：60375285

### (3)研究協力者

坂井 貞興 (SAKAI, Sadaoki)

白石綾子 (SHIRAISHI, Ayako)