

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670349

研究課題名(和文) 虚弱機構の解明を目指した虚弱動物モデルの確立

研究課題名(英文) Developing Animal Model of Frailty to Reproduce the Symptoms of Human Frailty

研究代表者

葛谷 雅文 (Kuzuya, Masahumi)

名古屋大学・未来社会創造機構・教授

研究者番号：10283441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト frailty の動物モデルを構築することを目的に、老化促進マウスがヒト frailty と類似した表現型を呈し、動物モデルになり得るか否かを検討した。

Flairty 評価の為、体重減少評価、活動度評価、握力試験、トレッドミル試験(持久力、疲労度、移動能力評価)を行った。生化学・組織評価として40週齢で採血ならびに両側下腿筋肉を取り出し、筋肉の解析(重量、筋細胞数、筋線維面積、筋線維タイプ評価、RT-PCR、western blotting)と、血液検査を行った。SAMP10マウスは、骨格筋力の低下、体重減少、動作緩慢の3条件を満たしヒト frailty の動物モデルとなりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop animal model of frailty that reproduce the symptoms of human frailty. We used SAMP10 as a candidate of the human frailty model. Body weight (BW) of SAMP10 and control SAMR1 mice decreased after 28 weeks old and 36 weeks old, respectively. Compared with SAMR1 mice, spontaneous activity of SAMP10 was lower. Significant decline of grip strength or grip strength/BW was observed in SAMP10 after 28 weeks of age. Endurance capacity of SAMP10 decreased after 16 weeks of age. The significant decline of muscle weight of hindlimb was observed in SAMP10 at 64 weeks compared at 40 weeks of age, and muscle weight of SAMP10 was significantly lower than those of SAMR1 at the same age. Compared with SAMR1, the levels of mRNA MuRF-1 mRNA were increased in soleus and gastrocnemius of SAMP10, whereas the levels of PGC-1 and IGF-1 mRNAs were decreased in soleus of SAMP10. These results may suggest that SAMP10 is useful model of human frailty.

研究分野：老年医学

キーワード：老化 虚弱 動物 サルコペニア フレイル

1. 研究開始当初の背景

人口高齢化を反映し、毎年要介護高齢者は増加し、現在すでに500万以上の要介護高齢者が日本に存在している。今後いかに要介護状態を予防し、自立した高齢者を増やしていくかが極めて重要である。国民生活基礎調査によると前期高齢者では「脳血管疾患」が主要な要介護に至る原因であるが、後期高齢者になるにつれその割合は減少し、「高齢による衰弱」を要因とするケースが急増する(平成19年:85~89歳、90歳以上の要介護に至る原因のトップは「高齢による衰弱」でそれぞれ37.0%,53.0%)。65歳以上の高齢者全体でも要介護原因の26.5%が「高齢による衰弱」によるものである。

「高齢による衰弱」とは老年医学の分野で言う「frailty(虚弱)」にあたる。これは老化に伴う種々の機能低下(予備能力の低下)を基盤とし、様々な健康障害に対する脆弱性が増加している状態を指す。この病態は単一の疾患が原因ではなく、subclinicalな多数臓器の機能低下に起因することが多い。Frailtyの概念は、既存の「身体機能障害がある種の疾病発症(脳血管障害や骨折)に起因する」という疾病モデルではなく、高齢者では老化に伴う予備能力(ホメオスターシス)の低下が身体機能障害につながるという、シナリオを提示している。一般にfrailtyは1)体重減少、2)疲労、3)活動量低下、4)筋力低下、5)身体機能低下(歩行速度低下)、で評価される。Frailtyの病態についてはなお、不明な点が多く、様々な作業仮説(炎症、ホルモン、活性酸素、ミトコンドリア異常な黄ど)が提唱されているが、十分な根拠の上に構築されたわけではない。そのため、frailtyへの介入研究は進んでいない。その要因としては適切な動物モデルがない、ということが挙げられる。

2. 研究の目的

虚弱(フレイル、frailty)の重要性は上で述べたとおりであるが、frailtyの病態は未だ不明であり、今後この研究分野を進めるには適当な動物モデルの開発が必要である。当該研究の目的はヒトfrailtyの動物モデルを構築することである。具体的には老化促進マウス(Senescence-Accelerated Mouse, SAM)がヒトfrailtyと類似した表現型を呈し、動物モデルになり得るか否か明らかにする。

3. 研究の方法

当該研究は研究期間2年間でSenescence-Accelerated Mouse Prone (SAMP)の一系統(SAMP10)と正常老化を示すSenescence-Accelerated Mouse Resistant(SAMR)系統(SAMR1)ならびにC57BL6の二種類の対照マウスの継続的飼育を行いfrailty(虚弱)の指標を兼ね備え、今後このマウスがfrailtyのモデルとなり得るかを明らかにした。

《Frailty 評価》以下の5つの表現型を継続的(一か月毎)に評価した。

(1)体重減少、(2)自発運動量の低下、(3)筋力評価、(4)疲労度、(5)その他、なお4)疲労度評価は下に記したトレッドミルによる評価での持久力を用いた。また通常歩行速度評価は困難であり、これまたトレッドミルによる評価で代用した。

これらの評価によりfrailtyに相当する表現型が伴うか否か、さらにどのような順番でこれらの異常が出現するか、また何週齢で全ての表現型が揃うかを明らかにした。

行動解析法:

(1) 自発運動活性計測試験(活動度評価):

自発運動活性を普段飼育されているケージ内で焦電型赤外線検出器(LOCOMO,LS-5(マウス用)、アプリケーションプログラムCIF3WinMini4,メルクエスト)を用い16時から翌日10時までの行動量を測定した。

(2) 握力試験(筋力)

小動物用握力メーター(Columbus社)を用い、マウスの前肢の握力を測定した。測定用の金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。

(3) トレッドミル試験

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使用した。

《生化学・組織学評価》40週齢時点採血ならびに両側下腿筋肉(腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋)を取り出し、筋湿重量測定後、一部を凍結固定、タンパク質、遺伝子解析用に保存した。

(1) 筋肉の解析

① 重量:採取した筋肉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SAMする各筋湿重量/体重比[筋湿重量(mg)/体重(g)]を求めた。

② 組織評価:H&E染色-筋断面積、筋細胞数、平均筋線維面積、免疫組織染色-タイプI, II A, II B myosin抗体

③ 遺伝子解析(RT-PCR):筋タンパク分解系(Atrogen-1, MuRF-1)、筋タンパク合成系(IGF-1, PGC-1 α , PGC-1 β)、ミトコンドリア評価(Sirt-1)

④ タンパク質解析(Western blotting): Atrogen, MuRF, caspase-9, Akt, ERK-1/2, mTOR, FoxO-1, FoxO-3, insulin receptor substrate-1, Bcl-2, Bcl-XL

(2) 血液生化学検査

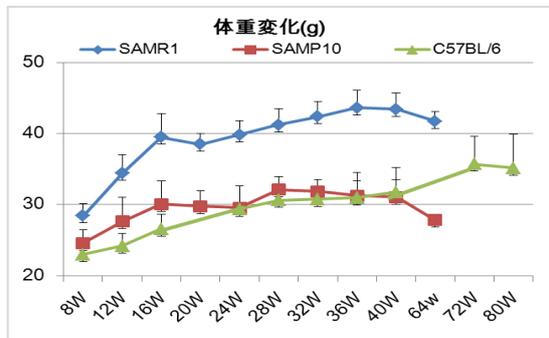
- ① 栄養評価：総コレステロール、トリグリセリド、血糖
- ② 炎症評価：TNF- α
- ③ ホルモン評価：IGF-1, GDF11
- ④ 増殖因子評価：VEGF, bFGF

4. 研究成果

《Frailty 評価》

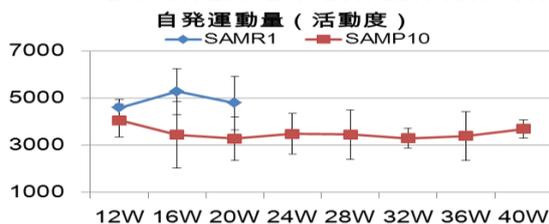
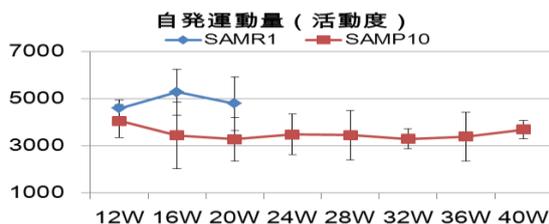
(1) 体重減少

SAMP10 マウスの平均体重は、28 週齢で 32.1g が加齢に伴って徐々に減少し、40 週齢では 31.0g となった。SAMP10 は、28 週齢頃まで体重増加を示し、以後徐々に減少し始めるが、SAMR1 は 8 週齢以降ずっと増加し続け、36(38)週頃をピークに減少し始めるも、64 週齢時点で SAMP10、Wild マウスより明らかに重かった。Wild(C57BL/6)は、P10 よりやや軽い加齢まで同様に増加し続け、40 週齢以降も増加傾向にあり、72 週齢以降横ばいであった。



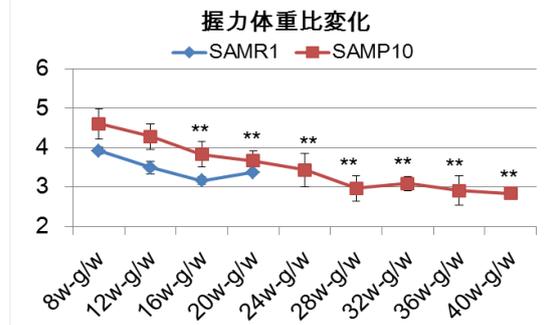
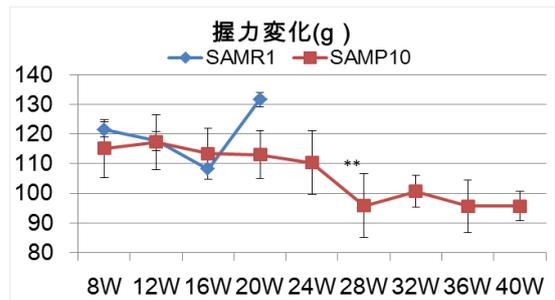
(2) 自発運動量の低下

正常老化マウス SAMR1 の活動量に比較し、SAMP10 では明らかに少なかったが、週齢による顕著な差は今回認められなかった。



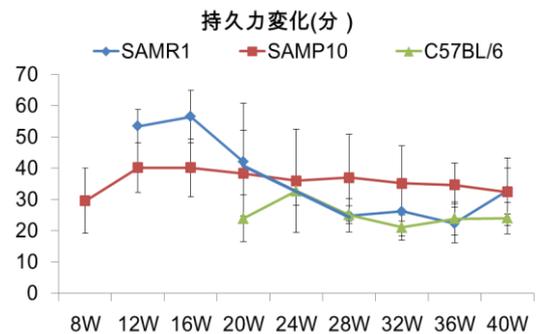
(3) 筋力評価

握力および握力体重比は、12 週齢で最も高く 117.3 \pm 9.2g から徐々に低下し、28 週齢では 95.8 \pm 10.8g と有意に低下した。28 週齢以降も加齢に伴い有意な低下が続いた。握力体重比は、8 週齢の測定開始後から低下し始め、16 週齢 3.83 \pm 0.33 が 40 週齢で 2.84 \pm 0.12 (n=8) と加齢とともに有意に低下した。

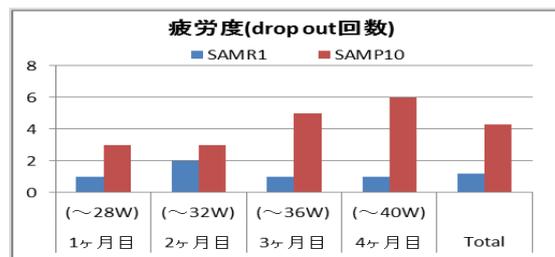


(4) 持久力、疲労度評価

SAMP10 マウスの持久力は 16 週齢 40.1 \pm 9.3 分をピークに 40 週齢 32.4 \pm 10.8 (n=17)分と加齢とともに緩やかに低下した。SAMR1 マウスも 16 週齢 56.5 \pm 8.4 分をピークに 40 週齢 32.6 \pm 7.4 分(n=5)と加齢とともに有意に低下した。Wild マウスは全期間を通じて持久力に変化が認められなかった。



35 分間のトレッドミル走行中にレーン端の電気ショックバーにへたり込む回数をカウントした。SAMP10 マウスの疲労度(dropout 回数)は加齢とともに増加し、SAMR1 マウスより drop out 平均回数が多かった。



(5) その他の評価

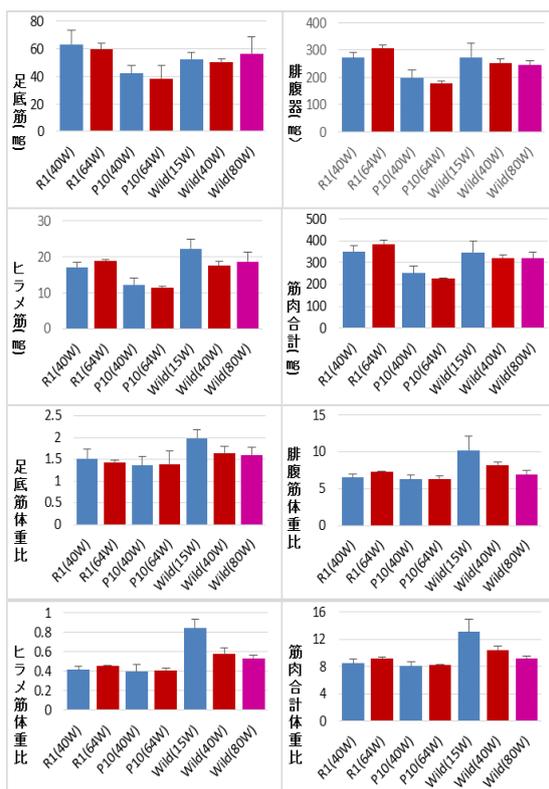
SAMR1 と wild(C57BL/6)では 28 週齢を超してもケージの蓋にぶら下がる行動を頻回に認めるも、SAMP10 ではその行為が認められず、32 週齢以降では明らかに動作が緩慢と

なった。この行動は活動度、筋力、疲労度などの複数の frailty 評価項目に関連があると思われ、マウスの frailty 評価として有用である可能性がある。

《生化学・組織学評価》

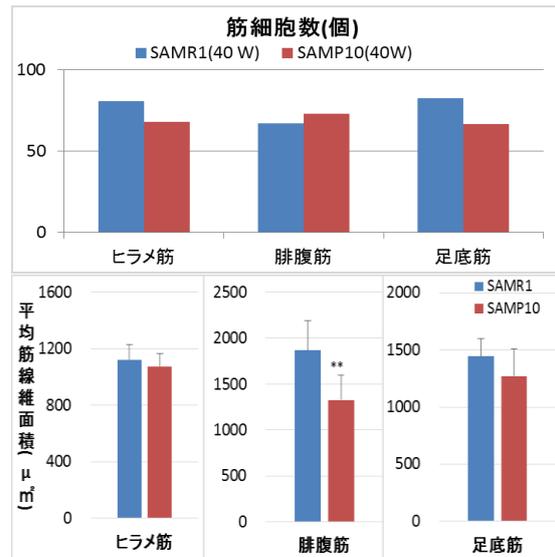
(1) 筋肉の解析

① 重量：SAMP10 マウス(40 週齢)のヒラメ筋、腓腹筋、足底筋を合わせた平均筋湿重量は、40 週齢 $252.2 \pm 31.1 \text{mg}$ ($n=17$) が 64 週齢で $227.5 \pm 0.07 \text{mg}$ ($n=2$) と低下していた。また、筋群別では筋線維 Type I 有意のヒラメ筋の筋湿重量が P10 マウスで 40 週齢 $12.3 \pm 1.9 \text{mg}$ から 64 週齢では $11.4 \pm 0.5 \text{mg}$ と低下した。腓腹筋も同様に 40 週齢 $197.6 \pm 28.1 \text{mg}$ から 64 週齢では $177.7 \pm 8.8 \text{mg}$ ($n=2$) と低下した。正常老化マウス SAMR1(40 週齢, $n=5$) や Wild (40 週齢) と比較しても、SAMP10(40 週齢)の筋湿重量は有意に低下していた。筋湿重量体重比は P10 マウスと R1 マウスでは有意差が認められなかったが、Wild マウスと R1 マウスとでは有意差を認めた。Wild(80 週齢, $n=4$) と比較しても、SAMP10(40 週齢)の筋湿重量は有意に低下し、筋湿重量体重比は腓腹筋以外で有意差を認めた。



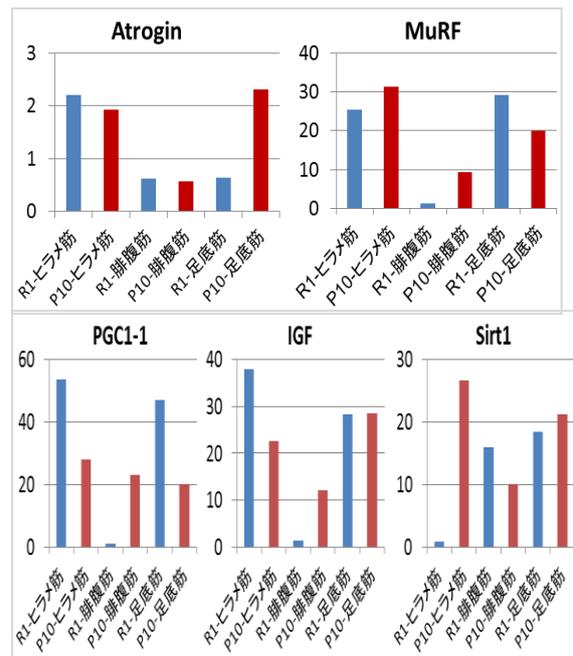
② 組織評価：一視野あたりの筋細胞数は SAMR1 マウス(40 週齢)の方が P10 マウス(40 週齢)より多かった。平均筋線維面積はヒラメ筋は R1 マウス $1122 \pm 105 \mu\text{m}^2$ 、P10 マウス $1074 \pm 91 \mu\text{m}^2$ 、腓腹筋は R1 マウス $1867 \pm 325 \mu\text{m}^2$ 、P10 マウス $1325 \pm 270 \mu\text{m}^2$ 、足底筋は R1 マウス $1445 \pm 155 \mu\text{m}^2$ 、P10 マウス $1272 \pm 237 \mu\text{m}^2$ といずれも P10 マウスが小さかった。R1 マウスと比較し、腓腹筋の平

均筋線維面積は SAMP10 マウスで有意差($P < 0.01$)を認めたが、ヒラメ筋・足底筋では有意差を認めなかった。



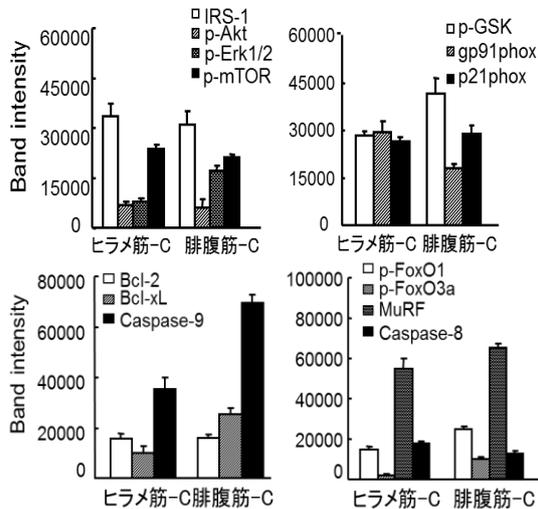
Myosin Slow Heavy Chain(+)%を算出することで、筋線維タイプ評価を行った。SAMP10 (40W) ではヒラメ筋 60.2%、腓腹筋 33.1%が Myosin Slow Heavy Chain(+)であった。

③ 遺伝子解析 (RT-PCR)：筋蛋白分解系のユビキチンリガーゼ Atrogen の発現は、P10 と R1 マウスの腓腹筋・ヒラメ筋においては差が認められなかったが、MuRF-1 の発現は腓腹筋・ヒラメ筋両骨格筋において P10 マウスで高かった。筋蛋白合成系の PGC-1 α 、IGF-1 発現はヒラメ筋において P10 マウスで著名に低下していた。ミトコンドリア評価として Sirt-1 の発現はヒラメ筋、足底筋において P10 マウスで低下していた。



④ タンパク質解析 (Western blotting)：SAMP10 マウス(40 週齢)を用いた運動介入群との比較実験では運動群のヒラメ筋・腓腹

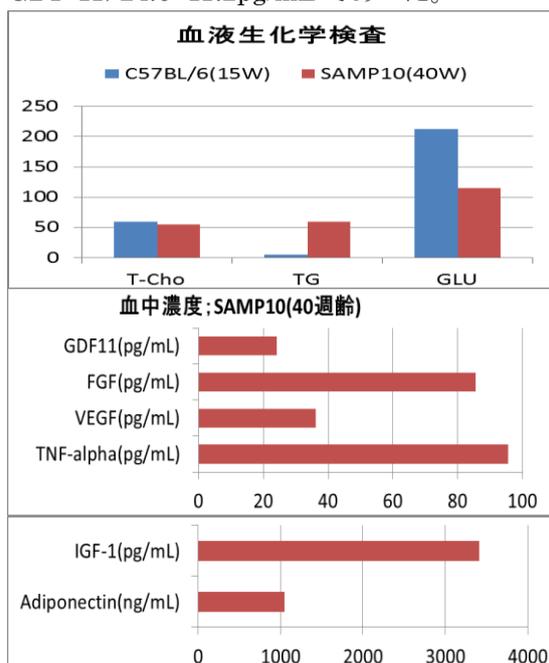
筋においてユビキチンリガーゼ (Atrogen, MuRF) とアポトーシス誘導因子 (caspase-9) 発現が低下する一方、Akt, ERK-1/2, mTOR, FoxO-1, FoxO-3 のリン酸化、insulin receptor substrate-1 や抗アポトーシスタンパク因子 (Bcl-2, Bcl-XL) 発現亢進とミトコンドリア機能改善が認められた。



(2) 血液生化学検査

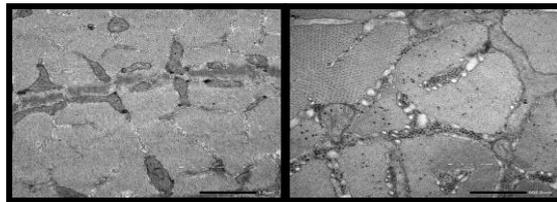
総コレステロールは Wild マウス $60.0 \pm 14.0 \text{ mg/dl}$ (15W, n=3) に比べ、P10 マウス $54.7 \pm 24.4 \text{ mg/dl}$ (40W, n=13) と低く、TG は Wild マウス 5.3 mg/dl に対し P10 マウス $59.9 \pm 8.6 \text{ mg/dl}$ と高かった。血糖は Wild マウス 212.7 mg/dl に対し P10 マウス $115.0 \pm 30.4 \text{ mg/dl}$ と低かった。

SAMP10 マウス 40 週齢における血中濃度は、炎症性サイトカイン (TNF- α) ; 95.6 pg/mL 、血中 Adiponectin; $1052 \pm 81 \text{ ng/mL}$ 、IGF-1; $3410 \pm 163 \text{ pg/mL}$ 、VEGF; $36.2 \pm 17.1 \text{ pg/mL}$ 、細胞増殖因子 (b-FGF) ; $85.6 \pm 26.3 \text{ pg/mL}$ 、GDF-11; $24.0 \pm 11.2 \text{ pg/mL}$ であった。



SAMP10 は、28 週齢頃より軟便になり、

38 週齢以降は下痢便となる個体が多発した。また、36 週齢に達する頃から髭が抜け始め、全身の脱毛が起こり、毛艶も悪くなった。また、SAMP10(40 週齢)では、著名なミトコンドリア形状の異常を認めた。



以上より、frailty 動物モデルとして必要な「骨格筋力の低下」「体重減少」「動作緩慢」の条件を満たす SAMP10 マウスはヒト frailty の動物モデルとなりうると考えられる。

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 17 件)

1) 葛谷 雅文. 高齢者の介護予防・虚弱(フレイル) 予防のための食の在り方. 日本医師会雑誌. 査読無

143(11), RS287-RS288, 2015.2

2) 葛谷 雅文. 特集 サルコペニアの基礎と臨床 序論. 最新医学. 査読無

70(1),5-6, 2015.1. (別刷)

3) 佐竹 昭介, 葛谷 雅文. 特集 老年医学の視点から見た高齢者糖尿病 2 高齢者糖尿病とサルコペニア・フレイル. 月刊糖尿病. 6(11),15-23, 2014.12

4) 梅垣宏行, 葛谷 雅文. 糖尿病とサルコペニア(総説). Diabetes Journal: 糖尿病と代謝. 査読無

42(3), 106-111, 2014.9.

5) 葛谷 雅文. 生活習慣病キーワード Glossaru of Topics サルコペニアと NST の役割. メディカル・ビューポイント. 査読無

35(9), 6, 2014.9.

6) 葛谷 雅文. 高齢者におけるリハビリテーションの意義 第 5 回高齢者におけるリハビリテーションの阻害因子とそれに対する一般的対応 1. フレイル 4)フレイルの原因としての低栄養とその対策. Geriatric Medicine. 査読無

52(8), 973 - 976, 2014.8.

7) 葛谷 雅文. 特集 サルコペニアとフレイル. 巻頭言. メディカル・ビューポイント. 査読無

35(8), 1, 2014.8.

8) Cheng XW, Kikuchi R, Ishii H, Yoshikawa D, Hu L, Takahashi R, Shibata R, Ikeda N, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Circulating cathepsin K as a potential novel biomarker of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 査読有

228(1) 211-6 2013 May

- 9) 葛谷 雅文. 特集/高齢者のフレイル(虚弱)とリハビリテーション 虚弱(フレイル)の原因としての低栄養とその対策. *MB Med Reha.* 査読無
No.170, 126-30, 2014.5.
- 10) 葛谷 雅文. バイオサイエンススコープ サルコペニアと栄養. *化学と生物.* 査読無
52(5) 328-30 2014.5
- 11) Kimura K, Cheng XW, Inoue A, Hu L, Koike T, Kuzuya M. β -Hydroxy- β -methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor α /interferon γ -induced MuRF-1 expression in C2C12 cells. *Nutr Res.* 査読有
34(4):368-374. 2014 Apr.
- 12) 葛谷 雅文. 今後の「食」を探る サルコペニアの予防・改善 乳酸菌ニュース. 査読無
484(2014 春季号), 23-26, 2014.4.
- 13) 葛谷 雅文. 特集 肥満症の診療 update サルコペニア肥満. *日医雑誌.* 査読無
143(1), 72, 2014.4.
- 14) Sasaki T, Nakamura K, Sasada K, Okada S, Cheng XW, Suzuki T, Murohara T, Sato K, Kuzuya M. Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 査読有
227(1), 43-50, 2013 Mar.
- 15) Hu L, Cheng XW, Song H, Inoue A, Jiang H, Li X, Shi GP, Kozawa E, Okumura K, Kuzuya M. Cathepsin k activity controls injury-related vascular repair in mice. *Hypertension.* 査読有
63(3), 607-615, 2014 Mar.
- 16) Jiang H, Wu Cheng X, Shi GP, Hu L, Inoue A, Yamamura Y, Wu H, Takeshita K, Li X, Huang Z, Song H, Asai M, Hao CN, Unno K, Koike T, Oshida Y, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M. Cathepsin K-mediated Notch1 activation contributes to neovascularization in response to hypoxia. *Nat Commun.* 査読有
4(5):3838. 2014 Jun.
- 17) Hayashi T, Kotani H, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, Maeda M, Kuzuya M. Hattori Y, Ignarro LJ. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation with an additional mechanism for its atheroprotection in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有
111(3), 1168-1173, 2014 Jan.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 葛谷 雅文. シンポジウム 8 チーム医療でロコモ・サルコペニアを防ぐには 老年

医学とサルコペニア・フレイル. 第 18 回日本病態栄養学会年次学術集会 2015 年 1 月 11 日 京都府京都市 国立京都国際会館

2) 葛谷 雅文. シンポジウム 37 「サルコペニアと臨床薬理」 超高齢社会におけるサルコペニアの重要性. 第 35 回日本臨床薬理学会学術集会 2014 年 12 月 6 日 愛媛県松山市 ひめぎんホール

3) 井上 愛子, 成 憲武, 黄 哲, 佐々木 健, 胡 麗娜, 姜 海英, 木村 薫, 小笠原 真雄, 葛谷 雅文. 運動介入が老化促進モデルマウスのサルコペニアに及ぼす影響. 第 1 回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会 2014 年 10 月 19 日 東京都文京区 伊藤国際学術研究センター

4) 木村 薫, 成 憲武, 井上 愛子, 胡 麗娜, 小池 晃彦, 葛谷 雅文. C2C12 細胞におけるタンパク合成・分解に対する HMB の効果. 第 1 回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会 2014 年 10 月 19 日 東京都文京区 伊藤国際学術研究センター

5) 松下 英二, 伊藤 ゆい, 岡田 希和子, 佐竹 昭介, 葛谷 雅文. 健常高齢者を基準としたサルコペニア診断基準の検討. 第 1 回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会 2014 年 10 月 19 日 東京都文京区 伊藤国際学術研究センター

6) N.Shiraishi, Kuzuya M., Y.Suzuki, T.Hirose, H.Umegaki, K.Okada, H.Enoki, S.Jeong. Investigation of predictors of decreased skeletal muscle mass in community-dwelling elderly individuals. *10th International Congress of European Union Geriatric Medicine Society* 2014 年 9 月 18 日 Nederland Rotterdam EU-GMS congress

7) 一柳 知里, 梅垣 宏行, 牧野 多恵子, 中嶋 宏貴, 野々垣 禪, 柳川 まどか, 葛谷 雅文. 高齢者の歩行速度と高次機能障害の関係. 第 56 回日本老年医学会学術集会・総会 2014 年 6 月 14 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場

8) 青山 満喜, 鈴木 裕介, 葛谷 雅文. 高齢者における「サルコペニア予備軍」と「非サルコペニア群」の運動機能の検討. 第 56 回日本老年医学会学術集会・総会 2014 年 6 月 14 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛谷 雅文 (KUZUYA, Masafumi)
名古屋大学・未来社会創造機構・教授
研究者番号: 10283441

(2) 研究分担者

なし