

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860499

研究課題名(和文) 老化促進マウスにおける牛車腎気丸によるインスリン抵抗性改善作用の検討

研究課題名(英文) The effect of Go-sya-jinki-Gan about improving insulin resistance in senescence accelerating mice, SAMP8

研究代表者

香川 正太 (KAGAWA, Syota)

山口大学・医学部・助教

研究者番号：30463201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全体として、補腎剤である漢方薬「牛車腎気丸」が加齢における骨格筋でのインスリン抵抗性惹起を予防する、「医食同源」の観点から、今まで明らかになっていない、継続的な低炭水化物食摂取が褐色脂肪機能亢進、それに続いて白色脂肪褐色化(Browning)を惹起する、という成果を見出した。では、牛車腎気丸が加齢における骨格筋のインスリンシグナル伝達不全を予防し、ロコモティブシンドロームの一つに当たるサルコペニア発症を抑制した。では加齢における低炭水化物食摂取の影響が、エネルギー利用を亢進させ、脂質を利用した褐色脂肪機能活性化と内臓脂肪褐色化によるものであったことを研究結果として示すことができた。

研究成果の概要(英文)：This grant could give us two results. One of the result is that Japanese kampo medicine, 'Go-sha-jinki-Gan', prevented insulin resistance in skeletal muscle of aging model, SAMP8. These data also expressed that sarcopenia was occurred in aging skeletal muscle and Go-sha-jinki-Gan could stop to accelerate sarcopenia via improving skeletal muscle insulin/IGF1 signaling. Another of the result is low carbohydrate diet could initiate to make brown adipose tissue hyper-function and white adipose tissue 'browning' in terms of 'food oriented medicine'. Low carbohydrate diet upregulated energy expenditure in aging model, SAMP8 via fat oriented energy utility but not sugar oriented energy utility. However, low carbohydrate diet up to aging was deteriorated skeletal muscle atrophy. These result were the first evidence and the former was accepted to 'Phytomedicine' Journal in 2015.

研究分野：東洋医学

キーワード：医食同源 漢方医学 老年医学 代謝学 脂質 褐色脂肪 糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

日本は、高齢化率 23.3% という急速な超高齢化社会を迎え、寝たきり率が急速に増加している。厚生労働省によると、平成 37 年には寝たきりや介護の必要がある高齢者は 520 万人に達すると推計されている。寝たきりと呼ばれる廃用症候群は、2 型糖尿病や脳血管障害・アルツハイマー型認知症、サルコペニアと呼ばれる筋力低下などの疾患が複合的に絡み合って出現する。寝たきり予防のためには、それぞれの疾患に介入する必要があるが、膨大な医療費が必要であることは容易に推定され、総合的な対策が急務である。漢方医学では、生命エネルギーを腎気と呼び、腎気が加齢によって減少し「腎虚」とよばれ状態になると、関節痛・下肢のしびれ・耳鳴り、夜間の頻尿などのいわゆる老化の症状を示すと考えられている。興味深いことに、これらの多彩な症状は、「補腎剤」とよばれる牛車腎気丸などの漢方薬を使うと、臨床的に改善することが報告されている。牛車腎気丸を代表とする補腎剤は、いわゆる抗老化作用を有することが容易に想像されるが、その薬効機序は全く不明である。

そこで、我々は、従来からアルツハイマー型認知症のモデルとして使用されている老化促進マウスである SAMP8 マウス (以下 SAMP8) に着目し、牛車腎気丸の持つ抗老化作用を検討した。9 か月齢の SAMP8 では、コントロール群 (SAMR1) と比較し、ヒラメ筋の萎縮が進行していたが、驚いたことに、牛車腎気丸を追加した群では、筋萎縮が明らかに改善していた。さらに、興味深いことに、PAS 染色でヒラメ筋のグリコーゲン量を検討したところ、SAMP8 で低下していたグリコーゲン量が、牛車腎気丸を追加した群では改善していた。SAMP8 では 2 か月齢と 10 か月齢で比較すると、10 か月齢において有意に高インスリン血症になっていることが報告されている (Cuesta et al, Growth Horm IGF Res. 2011)。加えて、SAMP8 では、肝臓でのインスリンシグナルの下流である Akt のリン酸化が减弱していると報告されている (Tomobe et al, Arch Gerontol Geriatr. 2012)。

我々の結果は、SAMP8 はインスリン抵抗性を示すという従来の報告と一致している。インスリン抵抗性とはインスリンの標的組織である肝、骨格筋、脂肪組織などでのインスリンシグナルの伝達障害で、インスリンの効果減弱から高血糖、高インスリン血症が引き起こされ、動脈硬化が惹起され、虚血性心疾患や脳血管障害が誘発されることが知られている。脳でのインスリン抵抗性は、インスリンシグナル減弱により脳内のタウ蛋白やアミロイドベータ蛋白が高値になることが確認されている (de la Monte et al, Curr Alzheimer Res. 2012)。つまり、牛車腎気丸が、老化促進マウスにおいてインスリン抵抗性を改善する、その分子機序を明らかにすることは、老化現象の新たな側面を発見するこ

とにつながる容易に想像される。また、近年、2 型糖尿病患者のインスリン抵抗性改善のために、低炭水化物食の可能性が提唱されている。2 型糖尿病患者で低カロリー食と低炭水化物食摂取の比較では低炭水化物食で体重、血糖値、HbA1c の有意な減少が認められたと報告されているが、(Hussain et al, Nutrition. 2012) その分子機序はまだ明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では計画調書に従い、大きく 2 つの研究をおこなった。

(1) 漢方補腎剤「牛車腎気丸」が加齢における、骨格筋でのインスリン感受性にどのような影響を与えるか。

(2) 医食同源という概念から、「低炭水化物食」が老年期での糖尿病、エネルギー代謝制御にどのような影響を与えるか。

### 3. 研究の方法

(1) SAMP8 および SAMR1 に普通食もしくは 4% 牛車腎気丸含有食を 30 週間摂餌させ、骨格筋 (ヒラメ筋) のインスリンシグナル伝達および形態学的変化 (HE 染色、PAS 染色) を行った。このことより、骨格筋でのサルコペニア病態におけるインスリン抵抗性を牛車腎気丸が予防できるかどうかを検討した。

(2) 本研究では、加齢に至るまでの継続的な糖質制限 (低炭水化物食) が老年期における糖尿病病態およびエネルギー代謝に関して、どのような影響を与えるのか、その有用性と安全性に関して、老化促進モデルマウス SAMP8 (P8) そして対照マウスである SAMR1 (R1) に通常食 (NC) および低炭水化物食 (LC) を摂餌させて (各々 P8-NC, P8-LC, R1-NC, R1-LC) 20 週後にエネルギー代謝を、30 週後に各組織の形態学的変化および機能的変化を検討した。

### 4. 研究成果

(1) SAMP8 マウスの骨格筋ではどのようなことが起こっているかをまず、調べてみた。すると、38 週齢の SAMP8 マウス骨格筋は筋線維が萎縮し、白筋と赤筋のバランスが逆転していた。これはサルコペニアの病態と一致する。よって、SAMP8 マウスはサルコペニアモデルとしてふさわしいことが解った。サルコペニアは主にインスリン/IGF1 シグナルの破綻によって起こることが知られており、次に、インスリン/IGF1 シグナルの下流に存在する Akt のリン酸化をウェスタンブロット法で検討した。興味深いことに、SAMP8 マウスの骨格筋では対照マウスである正常老化マウス SAMR1 と比較して、Akt リン酸化は明らかに减弱していた。しかし、4% 牛車腎気丸含有食群 (GJG) では、SAMP8 マウスの骨格筋 Akt リン酸化は保持されており、SAMR1 と同程度であった。続いて、骨格筋のエネルギーバランスを司るうえで重要なグリコーゲンの合成

律速酵素 GSK3 のリン酸化を検討すると、Akt リン酸化と同様に、SAMP8 マウスの骨格筋では GSK3 リン酸化は減弱していたが GJG 摂餌 SAMP8 マウスでは SAMR1 マウスと同程度にシグナル伝達が保たれた。PAS 染色にて定性的にグリコーゲン含有を観察すると、SAMP8 マウスの骨格筋では陽性筋線維が著しく少ないが、GJG 摂餌 SAMP8 マウスでは SAMR1 マウスと同程度に保持されていた。このことより、SAMP8 マウスの骨格筋ではインスリン抵抗性が存在し、牛車腎気丸はそれを予防したことが明確となった。

さらに、筋萎縮を司る FoxO 蛋白群のリン酸化を検討したところ、FoxO4 リン酸化に変化が大きく認められ、SAMP8 マウス骨格筋の FoxO4 リン酸化は著しく減弱しているのに対して、GJG 摂餌 SAMP8 マウスでは FoxO4 リン酸化が保持されていた。FoxO 蛋白の脱リン酸化は筋萎縮誘導蛋白である Atrogin1 や MuRF1 蛋白の発現を促すが、特に MuRF1 蛋白の発現誘導に関して、SAMP8 マウス骨格筋ではその発現が増加しているのに対して、GJG 摂餌 SAMP8 マウスでは MuRF1 蛋白の発現は減少していた。これらの結果より、インスリン/IGF1 シグナルの減少が一端となって、サルコペニア病態を加齢で誘導し、牛車腎気丸はその誘導を予防的に抑制したものと考えられた。

これらの研究結果は *Phytomedicine* 誌に 2015 年、発表された (Kishida, Kagawa et al. *Phytomedicine*, (2015) 22, 16-22)。

(2) 摂餌後 20 週でエネルギー代謝の指標となる行動量、酸素消費量 (VO<sub>2</sub>)、二酸化炭素排出量 (VCO<sub>2</sub>) 及び呼吸商 (RQ) を測定したところ、興味深いことに、行動量は P8<R1 であったが、VO<sub>2</sub> および VCO<sub>2</sub> は P8>R1 であった。摂餌群で比較すると VO<sub>2</sub> および VCO<sub>2</sub> は LC>NC であった。このことから、P8-LC は行動量が低いが、エネルギー代謝は高いことが解った。また、RQ は P8-NC<P8-LC であり、P8-LC のエネルギー代謝亢進は脂質を利用したものであることも解った。この時の褐色脂肪では Ucp1、Dio2 および Cpt1b 遺伝子発現が P8-LC で最も高く、褐色脂肪機能亢進になっていること、また、内臓白色脂肪では 酸化およびリパーゼ群の遺伝子発現が高くなっていることから、脂質を利用したエネルギー代謝亢進であることが、生化学的にも証明された。

摂餌後 30 週では、驚くべきことに、P8-LC のみ内臓白色脂肪が褐色化しており (抗 UCP1 抗体染色陽性)、エネルギー代謝亢進がさらに加速的に進んでいたことが解った。しかし、骨格筋では筋萎縮が進んでおり、筋萎縮誘導遺伝子である MuRF1 の遺伝子発現が P8-LC で最も高く、さらに筋内脂肪浸潤も進んでおり、ミトコンドリア機能を示す遺伝子群並びに筋分化を示す Notch シグナル遺伝子群の各発現が P8-LC で最も低値であった。これらのことから、骨格筋は加齢と糖質制限にて、器質的、機能的に脆弱になっていること

が解った。

さらに糖負荷試験を行うと、明らかに P8-NC は耐糖能異常を呈し、LC にすることで正常に戻っていたことから、加齢における糖尿病病態を予防することが解った。

以上より、加齢に至るまでの糖質制限は、エネルギー代謝を亢進させ、耐糖能悪化を予防するものの、骨格筋の機能は更に低下し、サルコペニアを増悪させることが解った。

本研究内容は現段階では論文作成中である。

この研究課題に際して、牛車腎気丸が糖質制限によるサルコペニア増悪を防ぐことが可能かどうか、また、牛車腎気丸が抗糖尿病作用を有するかどうか、憶測の域ではあるが、上記の研究報告を踏まえると GJG により、骨格筋の萎縮や機能的脆弱性を改善することが考えられ、また、P8-NC が耐糖能異常であるが、これも GJG によって改善されることが見込まれる。

これは、加齢における骨格筋機能の脆弱性を糖質制限が亢進させ、GJG が回復させることから、加齢においてはサルコペニアが ADL や QOL に著しく影響を与えることは明白である。

そして、脂肪組織の機能が GJG 投与によって変化する (= 脂肪燃焼により、骨格筋の脂肪浸潤を防ぎ、さらに褐色脂肪の機能を亢進させる) ことが推測される。

さらに多くの課題を残してはいるが、本研究結果がこの疑問に対する答えを与える一端を担うものと考ええる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kishida Y, Kagawa S, Arimitsu J, Nakanishi M, Sakashita N, Otsuka S, Yoshikawa H, Hagihara K. Go-sha-jinki-Gan (GJG), a traditional Japanese herbal medicine, protects against sarcopenia in senescence-accelerated mice. (査読有) *Phytomedicine*. 2015 22(1):16-22. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.005.

〔学会発表〕(計 4 件)

香川正太ほか、継続的な糖質制限は、加齢において褐色脂肪機能亢進ならびに白色脂肪褐色化を惹起する、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 20 日 21 日、京都国際会議場 (京都府京都市)

香川正太ほか、糖質制限は加齢において白

色脂肪の褐色化を惹起し、骨格筋の萎縮を増悪する、第30回日本糖尿病合併症学会、2015年11月27日-28日、ウイंकあいち(愛知県名古屋市)

香川正太、牛車腎気丸は insulin/IGF1 シグナルを介して SAMP8 マウスのサルコペニアを改善する、第30回和漢医薬学会学術集会、2013年8月31日-9月1日、金沢大学薬学部(石川県金沢市)

香川正太ほか、漢方の補腎剤は insulin/IGF1シグナルを介して SAMP8 マウスのサルコペニアを改善する、第28回老化促進モデルマウス研究協議会研究発表会、2013年7月5日-6日、愛知学院大学楠元キャンパス(愛知県名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

香川 正太 (KAGAWA, Syota)

山口大学・医学部・助教

研究者番号：30463201