

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460913

研究課題名(和文)サルコペニアにおけるレニン・アンジオテンシン系の作用およびメカニズムの解明

研究課題名(英文) Examination of function and mechanism of renin / angiotensin system in sarcopenia

研究代表者

赤崎 雄一 (Akasaki, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：00631920

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)：若年(12週齢)と中年(12ヶ月齢)、老年(24ヶ月齢)のコントロールマウスとアンジオテンシンIIレセプター1ノックアウトマウス(AT1aR KO)の骨格筋の変化について検討した。コントロールマウスでは、中年と老年では若年に比較して筋力が低下していた。一方で、AT1aR KOマウスでは、中年・老年において、筋力は保たれていた。腓腹筋重量については、コントロールマウス、AT1aR KOマウスにおいて、有意な差を認めなかった。長期的にレニン・アンジオテンシン系を抑制することにより、筋肉量の差を認めなかったものの、筋力低下を予防できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined skeletal muscle changes of C57BL/6 control mice and angiotensin II receptor 1 knockout mice (AT1aR KO) in young (12 weeks old) and middle aged (12 months old) and old age (24 months old). In control mice, muscle strength was lower in middle aged and older than in younger. On the other hand, in AT1aR KO mice, muscle strength was maintained in middle and old age. Regarding gastrocnemius muscle weight, no significant difference was observed in control and AT1aR KO mouse. It was suggested that although muscle mass difference was not observed, it is possible to prevent muscle weakness by inhibiting the renin / angiotensin system over a long period of time.

研究分野：医歯薬学

キーワード：老化 サルコペニア 骨格筋 レニン アンジオテンシン

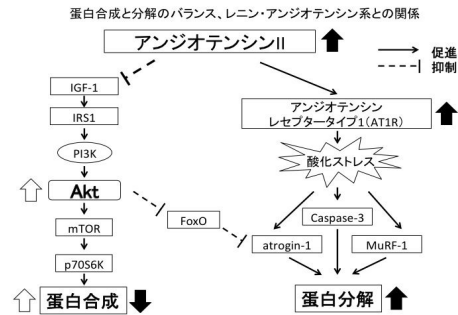
1. 研究開始当初の背景

サルコペニアの重要性は古くから認められていたが、その定義や、診断について国際的合意の無いまま推移していたため、2010年、ヨーロッパから統一された見解が提示された。サルコペニアは、身体的な障害や生活の質の低下、および死などの有害な転機のリスクを伴うものであり、進行性および全身性の骨格筋量および骨格筋力の低下を特徴とする症候群と定義された (Cruz-Jentoft AJ et al. *Age Aging*. 2010.) 筋肉量の低下と筋肉機能の低下の両方の存在が重要であり、これらの存在が診断に重要であると考えられている。またサルコペニアは、肥満、骨粗鬆症、2型糖尿病などの罹患率に大きく関与すると言われているが、特に筋力の減少は、老人だけでなく、中年においても、将来の総死亡率についての予測因子になりうるという報告されていることから (Cooper R et al. *BMJ*. 2010.) サルコペニアを防ぐことが重要であると考えられる。

筋肉量の調整は、蛋白合成と分解のバランスにより成り立っている。そこで細胞肥大のメカニズムにおいて重要な役割を担っている Akt を、骨格筋特異的に強発現させるモデルを作成すると、速筋である type 型筋肉が肥大し、筋力が増大した。そして、肥満モデルに対して、骨格筋を肥大させたところ、糖代謝能も改善した (Izumiya Y et al. *Cell Meta*. 2007.)。そこで、筆者らは、サルコペニアによる筋萎縮について、このモデルを用い、Akt の発現および代謝能について検討した。12ヶ月齢の高齢マウスでは、Akt のリン酸化が低下しており、type 型筋肉が萎縮し、体組成や代謝が悪化していた。これに対し骨格筋特異的に Akt を強発現して筋肥大をさせたところ、筋肉量は、3ヶ月齢の若年マウスと比較して増大し、また体組成・糖代謝・脂肪肝が改善した。 (Akasaki Y et al. *Aging Cell*. 2013.) したがって、サルコペニアに対して、筋肥大をさせることは、老化による体組成・代謝能低下を改善することが示唆された。

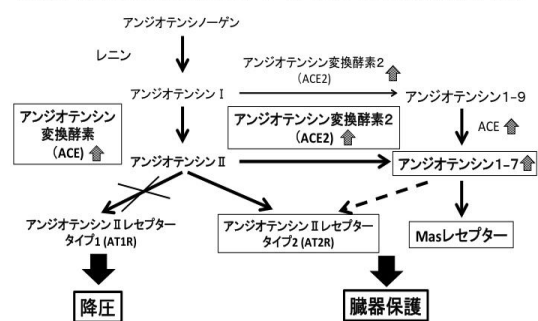
一方、蛋白分解については、atrogen-1 と MuRF1 が重要であり、様々な動物実験モデルで証明されている (Bodine SC et al. *Science*. 2001.)。また酸化ストレス物質の増加は、蛋白質の分解や筋萎縮を引き起こし、アポトーシスを増加させ、atrogen-1 や MuRF1 発現を増強すると考えられている (Powers SK et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005.)。NADPH オキシダーゼとミトコンドリアに由来する酸化ストレスが、筋萎縮の主な物質であるとの報告があり (Whitehead NP et al. *PLoS One* 2010., Muller FL et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007.)、またアンジオテンシンにより、これらの酸化ストレス物質が

増加していることは確認されている (Zhao W et al. *Hypertension*. 2006.)。したがって、アンジオテンシンは筋肉萎縮に關与する重要な因子であると考えられる。



これまでアンジオテンシンは主に、アンジオテンシンレセプター1 (AT1R) と 2 (AT2R) に作用していると考えられていたが、近年、アンジオテンシンの不活化が主な経路であるとされたアンジオテンシン(1-7) (Ang(1-7))やアンジオテンシン IV に生理活性が存在する可能性が示されて注目されており、特に Ang(1-7)や、そのレセプターである Mas レセプターは臓器保護的役割を担っていると考えられている。そこで、AT1R がブロックされると、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2)、アンジオテンシンレセプタータイプ 2 (AT2R)、Ang(1-7)や Mas レセプターが複合的に關与することで、アンジオテンシンによる骨格筋喪失に関して、保護的に作用していることが示唆される。

AT1Rがブロックされた時に、期待されるレニン・アンジオテンシン系の臓器保護メカニズム



2. 研究の目的

長期的に RAS 系を抑制することによる、筋肉萎縮および糖・脂質代謝に及ぼす影響と分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

老化による筋萎縮 (サルコペニア) に伴う、筋力減少や糖・脂質代謝能の低下について、長期的 AT1aR ノックアウトが生理学的・形態

学的・生化学的に筋肉および、肝臓・脂肪組織に及ぼす影響について、以下のように検討することにある。

(1). 加齢による筋肉量・筋力および糖・脂質代謝能について C57BL/6 マウスを用い、3ヶ月齢の若年マウス、および24ヶ月齢の高齢マウスについての生理学的検討。次に、アンジオテンシン レセプタータイプ 1a ノックアウト (AT1aR KO) が加齢性変化に及ぼす影響について、3ヶ月齢および24ヶ月齢の AT1aR KO を用いて、筋肉量・筋力および糖・脂質代謝能について、C57BL/6 マウスとの比較検討。

a. 筋力測定: コンピューター制御下筋力測定装置を用いて行う。測定方法はマウスに前腕でバーを握らせた後、マウスの尾を後ろに引くことで、マウスが装置を牽引する。この牽引力をマウスの握力とする。マウスは3日前より練習させ器具に慣れさせる。これを5回測定し、平均して、握力とする。

(2). 加齢および AT1aR KO による骨格筋・肝臓・脂肪の形態学的変化の解析
形態学的評価: 老化による筋肉量の変化が、どの程度、筋線維を萎縮させているか、またどの線維を萎縮させているのかを形態学的に検討する。

a. 組織重量の比較: 骨格筋 (ヒラメ筋: type I 型線維、腓腹筋: type IIb 型線維) 肝臓、脂肪 (皮下脂肪、内臓脂肪、褐色脂肪) の重量を測定し、比較検討する。腓腹筋は骨格筋 type I (BA-F8) type IIa (SC-71) type IIb (BF-F3) のモノクローナル抗体で蛍光染色を行う。蛍光染色後は蛍光顕微鏡下で写真を撮影し、Image J で断面積を測定する。
b. 腓腹筋における、angiotensin(1-7)、ACE2、Mas レセプター、AT2 レセプターの発現について免疫組織化学染色により、分布や発現量について検討する。

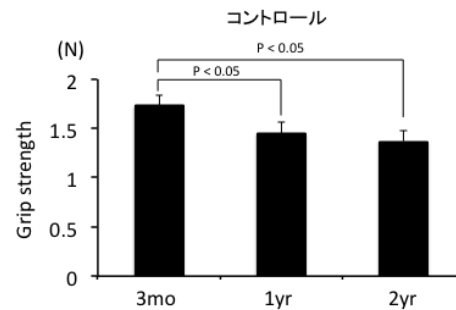
(3) C57BL/6 および AT1aR マウスにおける骨格筋および血中、肝臓・脂肪など組織におけるレニン・アンジオテンシン系の各因子について、Western Blot や real time PCR による生化学的解析

生化学的解析: アンジオテンシン II が、筋肉の増殖・萎縮因子 (Akt, TGFβ など) に与える影響、また萎縮系因子 (atrogin-1、MuRF1 など) について与える影響について、また AT1aR ノックアウトによる、AT2R、Mas レセプターなどに対する影響についてウェスタンブロットを用いて解析する。酸化ストレスマーカー (gp91phox、NADPH oxidase 活性) について検討する。蛋白活性は蛋白を筋肉 (腓腹筋) から抽出した後、ウェスタンブロットを行う。

4. 研究成果

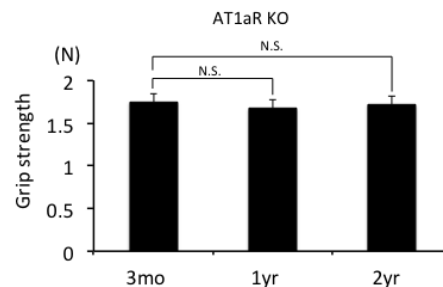
加齢による筋力の変化について C57BL/6 マウスを用い、3ヶ月齢 (3mo) の若年マウス、および12ヶ月齢 (1yr)、24ヶ月齢 (2yr) の高齢マウスについての生理学的検討を行なった。

12ヶ月齢では、3ヶ月齢に比較して、有意に筋力が低下していた。同様に24ヶ月齢では3ヶ月齢に比較して、有意に筋力が低下していた。12ヶ月齢に比較すると筋力低下傾向であったが、統計学的有意差は無かった。



次に、アンジオテンシン レセプタータイプ 1a ノックアウト (AT1aR KO) が加齢性変化に及ぼす影響について、3ヶ月齢 (3mo) の若年マウス、および12ヶ月齢 (1yr)、24ヶ月齢 (2yr) の高齢マウスについての生理学的検討を行なった。

12ヶ月齢では、3ヶ月齢に比較して、筋力が軽度低下しているものの統計学的有意差を認めなかった。同様に24ヶ月齢では3ヶ月齢に比較して、筋力の低下に有意差を認めなかった。



したがって、筋力については、コントロールマウスでは加齢により筋力は低下するにも関わらず、アンジオテンシン レセプタータイプ 1a ノックアウトをすることにより、筋力低下を抑制することができることが示唆された。

次に筋肉重量について腓腹筋の筋肉量を比較検討した。C57BL/6 マウスでは、加齢に伴い軽度の筋肉量の減少を認めたものの、有意な筋肉量減少を認めなかった。AT1aR KO マウスでも同様で有意な筋肉量の減少を認めなかった。

近年のサルコペニア研究の報告で、C57BL/6 マウスの加齢モデルによる、24ヶ月齢では筋肉量の減少が認められないとの報告がなされた。この原因としては、マウスの種類の違いによる影響や、C57BL/6 マウスでは24ヶ月齢ではサルコペニア研究に十分な年齢でない可能性があり、今後更に30週齢などに延長して実験を行うことやマウスの種類を変更、または他の種類の加齢モデルマウスを検討する必要がある。また、筋力は筋肉量と相関しないことも想定され、その場合は、神経

筋接合部における加齢性変化が、加齢による筋力減少に影響を及ぼしている可能性があり、今後の検討課題である。また今回の実験を行うにあたり、加齢マウスを得ることに時間を費やすことは、実験計画当初より予想されていたため、実験以前よりマウスを確保して準備していたが、特にアンジオテンシンレセプタータイプ 1a ノックアウト (AT1aR KO) の繁殖が予想に比較して遅れたため、実験に遅延が生じた。今後も加齢についての実験を予定しており、繁殖・維持を継続して行なっていく予定としている。

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)

Cheng KK, Akasaki Y, Lecommandeur E, Lindsay RT, Murfitt S, Walsh K, Griffin JL. Metabolomic analysis of Akt1-mediated muscle hypertrophy in models of diet-induced obesity and age-related fat accumulation. J. Proteome Res. 2015; 14: 342-352. (査読有り)

[学会発表](計5件)

1. 赤崎雄一, 池田義之, 佐々木雄一, 木原浩一, 剣田昌伸, 宮田昌明, 大石 充. 排尿時の嘔気嘔吐発作を認めた悪性褐色細胞腫の一例. 第 39 回日本高血圧学会総会学術集会. 2016 年 10 月, 仙台国際センター(宮城県仙台市).

2. 上腕-足首間脈波伝播速度の増加は、心血管病患者の左室拡張機能障害を予測した 赤崎雄一, 池田義之, 佐々木雄一, 宮内孝浩, 窪園琢郎, 宮田昌明, 大石 充. 第 38 回日本高血圧学会総会学術集会. 2015 年 10 月, 愛媛県民文化会館(愛媛県松山市).

3. Akasaki Y, Ikeda Y, Miyauchi T, Kubozono T, Miyata M, Ohishi M. Increased Cardio-Ankle Vascular Index Predicts Left Ventricular Diastolic Dysfunction, 第 79 回 日本循環器学会総会. 2015 年 4 月, 大阪府立国際会議場(大阪府大阪市).

4. Akasaki Y, Miyauchi T, Kubozono T, Miyata M, Ohishi M. Increased arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index is an independent risk factor of left ventricular diastolic dysfunction. Joint Meeting European Society of Hypertension and International Society Hypertension 2014, 2014 年 6 月, Athens(Greece).

5. Akasaki Y, Miyauchi T, Kubozono T, Miyata M, Ohishi M.

Increased arterial stiffness assessed by brachial-ankle pulse wave velocity is an independent risk factor of left ventricular diastolic dysfunction. Pulse of Asia 2014, 2014 年 6 月, Athens(Greece).

[図書](計7件)

1. 赤崎雄一, 大石 充. 高血圧ガイドライン 2014 日常診療に活かす 診療ガイドライン UP-TO-DATE 2016-2017 2016; 19: 116-122. メディカルレビュー社.

2. 赤崎 雄一, 大石 充. 循環器疾患治療薬 薬の使い方, どこまで理解していますか? 本態性高血圧症での使い方 HeartView. 2016; 20(12): 88-93. メジカルビュー社.

3. 赤崎雄一, 大石 充. 健康寿命延伸をめざす栄養戦略 フレイル・疾病重症化予防のために III. 疾病予防・重症化予防 高血圧 臨床栄養別冊. 2016; 11: 42-48. 医歯薬出版株式会社.

4. 赤崎雄一, 大石 充. 高血圧新ガイドラインを読み解く 4. 高齢者の高血圧 SHINZO. 2015; 47(4): 420-424. 日本心臓財団.

5. 赤崎雄一, 大石 充. 高血圧コントロールへの効果的なアプローチ-AHA/ACC/CDC の科学的勧告. 血圧. 2014; 21, 4-5. 先端医学社.

6. 赤崎雄一, 大石 充. 血圧サーカディアンリズム -Dipper, non-Dipper 型. 日本臨床. 2014; 72, 1400-1403. 日本臨床社.

7. 赤崎雄一, 大石 充. 高齢者の高血圧-高齢者高血圧のエビデンス. 老年医学. 2014; 52, 637-640. ライフ・サイエンス.

[その他]

ホームページ等 <http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intmed1/research/achievements.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤崎 雄一 (YUICHI AKASAKI)

鹿児島大学病院・助教

研究者番号: 00631920

(2)研究分担者

大石 充 (OHISHI MITSURU)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：50335345