

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460920

研究課題名(和文) エピゲノムの観点からの骨格筋加齢解析と心血管ホルモンによるミトコンドリアセラピー

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic alteration associated with aging in the muscle and the recovery by hormonal therapy targeting the mitochondria

研究代表者

宮下 和季 (Miyashita, Kazutoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：50378759

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)：慢性腎臓病(CKD)では、身体能力の低下が腎機能を悪化させるリスクとなり、さらには、心血管病発症率を大きく上昇させる。消化管ホルモンであるグレリンは、ラット骨格筋ミトコンドリアに作用して酸素消費を増やすと報告された。そこでグレリンがCKDに伴うミトコンドリア不全を改善する可能性を考え、5/6腎摘CKDモデルマウスにグレリンを週3回腹腔内投与し、1ヶ月後に骨格筋ミトコンドリアと身体能力を検討した。グレリンは5/6腎摘マウスの筋力と持久力を増加させ、5/6腎摘により低下した身体能力を効率よく改善した。グレリン投与マウスの下腿筋では、ミトコンドリアの活性化に加えて筋肉量の増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is a representative age-associated disease which impairs physical performance. We found that decrease in muscle mitochondria rather than muscle mass was a major cause of physical decline in 5/6 nephrectomized (5/6Nx) CKD model mice (Kidney Int 85: 1258, 2014). Because ghrelin has both muscular hypertrophy and mitochondrial oxidation effect, we examined the usefulness of ghrelin for a recovery of physical decline in 5/6Nx mice, focused on the epigenetic modification of PGC-1alpha. 5/6Nx mice were intraperitoneally administered acylated ghrelin for a month. The methylation level of the cytosine residue at 260 base pairs upstream (C-260) of initiation point of PGC-1alpha gene, which was demonstrated to decrease the gene expression, was evaluated by methylation specific PCR and bisulfite sequencing. Ghrelin treatment efficiently improved both muscle mass and mitochondria, associated with the epigenetic modification of PGC-1alpha (Endocrinology 156:3638, 2015).

研究分野：内分泌学、代謝学、抗加齢医学

キーワード：身体能力 サルコペニア ミトコンドリア 骨格筋 グレリン

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う骨格筋の退行性変化は身体能力を低下させ、メタボリックシンドロームを誘発することで健康寿命を短縮させる。慢性腎臓病(CKD)は患者数 1300 万人にのぼる国民病であり、高血圧や高血糖を伴う生活習慣病の終末像の一つとして、その対策が喫緊に求められている。CKD では、身体能力の低下が腎機能を悪化させるリスクとなり、さらには、心血管病発症率ならびに死亡率を大きく上昇させることが、最近明らかにされた。したがって CKD 患者のライフロングケアにおいて、身体能力の維持は極めて重要な役割を果たすと認識されつつある。

### 2. 研究の目的

本研究では身体能力低下の原因となる遺伝子発現変化をエピゲノムの観点から解析し、身体能力低下を低下させるエピゲノム変容を、ホルモンによるエピゲノム制御で是正する方法を開発する。食事療法と運動療法で対応する現状では限界がある身体能力の低下に、エピゲノムの観点からの画期的な新治療を提案し、健康寿命の延長を目指す。

### 3. 研究の方法

3年間の研究期間で、1. CKD における身体能力低下の経時的解析、2. CKD における身体能力低下の原因となる液性因子の同定、3. ホルモンを用いた身体能力の改善、を目指した検討を行った。

(1) 6 週齢の雄マウス(C57Bl/6)に 5/6 腎摘を施行し、5/6 腎摘マウスを作成した。マウス用握力計を用いて筋力(握力)を、トレッドミルを用いて持久力(走行距離)を評価し、20 週齢、50 週齢で骨格筋を回収した。回収した骨格筋において、ミトコンドリア機能に関連した遺伝子発現を解析した。

(2) 培養骨格筋細胞 C2C12 に、腎不全で増加するサイトカインを添加し、ミトコンドリア活性や酸素消費量への影響を評価した。

(3) ミトコンドリア活性化作用が報告された消化管ホルモンであるグレリンを、8 週齢から 1 か月間 0.1 nmol/gBW ずつ週 3 回腹腔内投与した。代表的な筋肉増強因子である IGF-1 を同様に 8 週齢から週 3 回腹腔内投与した。

### 4. 研究成果

(1) CKD における身体能力低下の経時的解析  
CKD に伴う身体能力の低下を観察する目的で、血清クレアチニンが正常マウスの 2 倍程度となる 5/6 腎摘 CKD モデルマウスを作成し、その後 50 週齢まで、マウス握力計とトレッドミルを用いて身体能力を評価した。

20 週齢までに、5/6 腎摘マウスの持久力が低下した。筋力と筋肉量の低下は、その時点では認めなかった。20 週齢で大腿四頭筋を回収して解析したところ、筋線維径の変化は明らかではなかったが、電子顕微鏡観察にてミ

トコンドリア量の減少が顕著であった。50 週齢の解析では 5/6 腎摘マウスの筋肉量が低下し、持久力のみならず筋力の低下を認めた(Tamaki Kidney Int. 2014)。

(2) CKD における身体能力低下の原因となる液性因子の同定

腎不全早期から増加する炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ や IL-6 を培養骨格筋細胞に添加したところ、これらは用量依存性にミトコンドリア生合成のマスター遺伝子である PPAR $\gamma$ コアクチベーター-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )の発現を低下させ、骨格筋細胞のミトコンドリア量を減少させることを見出した。

(3) ホルモンを用いた身体能力の改善

食欲亢進作用を有する消化管ホルモングレリンは、ラット骨格筋ミトコンドリアに作用して酸素消費を増やすことが報告された(Barrazoni Kidney Int. 2010)。そこでグレリンが、5/6 腎摘 CKD モデルマウスのミトコンドリア不全を改善する可能性を考え、8 週齢からグレリンを週 3 回腹腔内投与し、1 ヶ月後に骨格筋ミトコンドリアと身体能力を検討した。また PGC-1 $\alpha$ の発現が、プロモーター領域のメチル化で制御されることより(Barres. Cell Metabolism 2009)、5/6 腎摘の施行ならびにグレリン投与が、マウス骨格筋 PGC-1 $\alpha$ 遺伝子のエピゲノムに与える影響を検討した。

グレリンは 5/6 腎摘マウスの筋力と持久力を増加させ、5/6 腎摘により低下した身体能力を効率よく改善した。グレリン投与マウスの下腿筋では、ミトコンドリアの活性化に加えて、筋肉量の増加を認めた。5/6 腎摘により、骨格筋 PGC-1 $\alpha$ 遺伝子プロモーター領域のシトシンメチル化が亢進して、遺伝子発現が低下したが、グレリン投与によりそのシトシンメチル化が有意に低下し発現が回復した。一方、代表的な筋肉量増加因子である IGF-1 は、5/6 腎摘マウスの筋肉量を増加させたものの、PGC-1 $\alpha$ 遺伝子プロモーター領域のシトシンメチル化に影響を与えず、ミトコンドリア量と筋力、持久力を効果的に改善しなかった。(Tamaki Endocrinology, 2015)。

### 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 5 件)

1. Fujii C, Miyashita K\*, Mitsuishi M, Sato M, Fujii K, Inoue H, Hagiwara A, Endo S, Uto A, Ryuzaki M, Nakajima M, Tanaka T, Tamaki M, Muraki A, Kawai T and Itoh H. Treatment of sarcopenia and glucose intolerance through mitochondrial activation by 5-aminolevulinic acid. Scientific Reports 2017, in press. 査読あり

2. Tamaki M, Miyashita K\*, Hagiwara A, Wakino S, Inoue H, Fujii K, Fujii C, Endo S, Uto A, Mitsuishi M, Sato M, Doi T, and Itoh H.

Ghrelin treatment improves physical decline in 5/6 nephrectomized CKD model mice through muscular enhancement and mitochondrial activation.

Endocrine J. 2017, in press. (review article) 査読あり

### 3. 宮下和季

腎不全に伴うサルコペニアとホルモンによるサルコペニア治療の可能性

内分泌糖尿病代謝内科 43: 440-445, 2016 (2016.11) 査読なし

4. Tamaki M, Miyashita K\*, Wakino S, Hagiwara A, Inoue H, Fujii K, Fujii C, Mitsuishi M, Muraki A, Hayashi K, Doi T, Itoh H.

Improvement of physical performance in 5/6 nephrectomized CKD model mice by a gastric hormone ghrelin.

Endocrinology. 156:3638-3648, 2015. 査読あり

5. Tamaki M, Miyashita K\*, Wakino S, Mitsuishi M, Muraki A, Hayashi K, Itoh H.

5/6 nephrectomy reduces muscle mitochondria and exercise endurance in mice associated with further exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase.

Kidney Int. 85:1330-1339, 2014. (Editorial comments in Kidney Int 85:1258, 2014) 査読あり

[学会発表](計 32 件)

### 1. 宮下和季, 伊藤 裕

加齢に伴う身体能力低下機構の解析とミトコンドリア活性化を介したサルコペニア肥満治療の試み

第 37 回 日本肥満学会 2016 年 10 月 8 日 東京ファッションタウン (東京都江東区) (招待講演)

### 2. K. Miyashita, C Fujii, H. Itoh

5-aminolevulinic acid, a material for mitochondrial electron carrier, improves exercise endurance through both muscle enhancement and activation of muscle mitochondria in sarcopenic mice.

26th Scientific Meeting of International Society of Hypertension, 25 Sep. 2016, Seoul (South Korea). (Moderated poster session, Travel grant award)

### 3. M Tamaki, K. Miyashita, A. Hagiwara, H. Inoue, K. Fujii, H. Itoh

A gastric hormone ghrelin improves physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation in 5/6Nx CKD model mice.

26th Scientific Meeting of International Society of Hypertension, 25 Sep. 2016, Seoul (South Korea) (Travel grant award)

### 4. 宮下和季, 三石 正憲, 伊藤 裕

マウスへの長期高蛋白食負荷が骨格筋ミト

コンドリアと身体能力に与える影響の解析

第 35 回 日本肥満症治療学会学術集会 2016 年 7 月 1 日 東京コンベンションホール (東京都中央区)

5. 藤井千華子, 宮下和季, 藤井健太郎, 井上博之, 萩原あいか, 田蒔昌憲, 三石正憲, 村木絢子, 河合俊英, 伊藤裕

ミトコンドリア活性化分子であるアミノレブリン酸を用いたサルコペニア治療の試み

第 35 回 日本肥満症治療学会学術集会 2016 年 7 月 1 日 東京コンベンションホール (東京都中央区)

6. 藤井千華子, 宮下和季, 藤井健太郎, 井上博之, 萩原あいか, 田蒔昌憲, 河合俊英, 伊藤裕

電子キャリア前駆体アミノレブリン酸を用いたミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療の試み

第 16 回 日本抗加齢医学会総会 2016 年 6 月 24 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

7. 宮下和季, 田蒔昌憲, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 藤井千華子, 遠藤翔, 宇都飛鳥, 佐藤正明, 脇野修, 伊藤裕

慢性腎臓病における身体能力低下機構の解明と、ミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療の試み

第 1 回 CKD-MBD 交流会 2016 年 6 月 24 日 渋谷エクセルホテル東急 (東京都渋谷区) (招待講演)

8. 田蒔 昌憲, 宮下 和季, 萩原 あいか, 脇野 修, 土井 俊夫, 伊藤 裕

グレリンによる慢性腎臓病マウスの身体能力改善におけるミトコンドリアエピゲノム制御の意義

第 89 回 日本内分泌学会総会 2016 年 4 月 22 日 京都国際会議場 (京都府京都市)

9. 田蒔 昌憲, 萩原 あいか, 宮下 和季, 脇野 修, 林 晃一, 土井 俊夫, 伊藤 裕

グレリンによる PGC-1 エピゲノム制御を介したミトコンドリア活性化による慢性腎臓病マウスの身体能力改善

第 53 回 日本臨床分子医学会学術総会 2016 年 4 月 15 日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

10. 宮下和季, 田蒔昌憲, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 藤井千華子, 遠藤翔, 宇都飛鳥, 佐藤正明, 脇野修, 伊藤裕

慢性腎臓病における身体能力低下機構の解明と、ミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療の試み

第 8 回 日本腎臓リハビリテーション学会 2016 年 3 月 26 日 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市) (招待講演)

### 11. 宮下和季

心血管ホルモンによるミトコドリア制御の解明と生活習慣病発症における意義の研究

第 19 回日本心血管内分泌学会総会 2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) (高峰譲吉研究奨励賞受賞)

12. 宮下和季, 三石正憲, 田蒔昌憲, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 藤井千華子, 伊藤裕

高血圧における臓器代謝異常 ホルモンによるミトコンドリア制御と身体能力  
第 38 回日本高血圧学会総会 2015 年 10 月 10 日 ひめぎんホール (愛媛県松山市) (招待講演)  
13. 田蒔昌憲, 宮下和季, 三石正憲, 村木絢子, 藤井千華子, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 伊藤裕  
Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice.  
第 38 回日本高血圧学会総会 2015 年 10 月 10 日 ひめぎんホール (愛媛県松山市) (若手研究奨励賞受賞)  
14. 宮下和季, 三石正憲, 村木絢子, 田蒔昌憲, 藤井千華子, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 伊藤裕  
マウスへの長期高蛋白食投与に伴う骨格筋ミトコンドリア量変化の解析  
第 38 回日本高血圧学会総会 2015 年 10 月 10 日 ひめぎんホール (愛媛県松山市)  
15. 宮下和季, 田蒔昌憲, 脇野修, 伊藤裕  
CKD-MBD と他臓器連関(臨床への提言) 慢性腎臓病における身体能力低下のメカニズムとグレリンのミトコンドリア作用を介したその改善  
第 60 回日本透析医学会総会 2015 年 6 月 26 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) (招待講演)  
16. 田蒔昌憲, 宮下和季, 脇野修, 三石正憲, 林晃一, 伊藤裕  
グレリンによるミトコンドリアエピゲノム制御を介した CKD モデルマウスの身体能力改善  
第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015 年 6 月 5 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)  
17. M Tamaki, K. Miyashita, A. Hagiwara, H. Inoue, K. Fujii, H. Itoh  
Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice.  
53th ERA-EDTA congress, 26 May 2016, Vienna (Austria)  
18. M Tamaki, K Miyashita, M. Mitsuishi, M Sato, A Hagiwara, H Inoue, K Fujii, H Itoh  
Improvement of physical performance in 5/6 nephrectomized CKD model mice through epigenetic modulation of PGC-1 $\alpha$  expression by a gastric hormone ghrelin.  
52nd ERA-EDTA congress 26 May 2015, London (UK) (Travel grant award)  
19. 宮下和季, 藤井千華子, 伊藤裕  
心腎血管障害に関する神経心血管ホルモンによるミトコンドリア制御とサルコペニア治療

第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 23 日 ホテルニューオータニ (東京都千代田区) (招待講演)  
20. 宮下和季, 三石正憲, 村木絢子, 田蒔昌憲, 藤井千華子, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 伊藤裕  
高蛋白食によるサルコペニア治療のピットフォールとグレリン・IGF-1 の治療効果  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 23 日 ホテルニューオータニ (東京都千代田区)  
21. 田蒔昌憲, 宮下和季, 三石正憲, 脇野修, 林晃一, 伊藤裕  
グレリンによるミトコンドリアエピゲノム制御を介した慢性腎臓病マウスの身体能力改善  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 23 日 ホテルニューオータニ (東京都千代田区)  
22. 藤井千華子, 宮下和季, 藤井健太郎, 井上博之, 萩原あいか, 田蒔昌憲, 三石正憲, 村木絢子, 河合俊英, 伊藤裕  
アミノレブリン酸を用いたミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療の試み  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 23 日 ホテルニューオータニ (東京都千代田区)  
23. C Fujii, K Miyashita, M Tamaki, K Fujii, H Inoue, A Hagiwara, H Kawai, H Itoh  
5-Aminolevulinic acid, a precursor of mitochondrial electron carrier, improves exercise endurance and glucose tolerance through activation of muscle mitochondrial biogenesis in sarcopenic mice  
17<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, 8 Mar. 2015, San Diego (USA)  
24. 宮下和季, 藤井千華子, 萩原あいか, 井上博之, 藤井健太郎, 村木絢子, 三石正憲, 田蒔昌憲, 伊藤裕  
骨格筋ミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療と生活習慣病対策  
第 163 回日本体力医学会 2015 年 2 月 28 日 慶應義塾大学芝共立キャンパス (東京都港区) (招待講演)  
25. K. Miyashita, C. Fujii, M. Mitsuishi, A. Muraki, M. Tamaki, K. Fujii, H. Inoue, A. Hagiwara, T Kawai, H. Itoh  
5-Aminolevulinic acid improves physical performance and glucose tolerance of sarcopenic mice through activation of muscle mitochondrial biogenesis.  
2nd International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS2), 16 Nov 2014, Tokyo (Japan) (Invited lecture)  
26. 田蒔昌憲, 宮下和季, 脇野修, 三石正憲, 林晃一, 伊藤裕  
消化管ホルモングレリンは CKD における身体能力低下を改善する  
第 18 回日本心血管内分泌学会総会 2014 年 11 月 21 日 横浜市開港記念会館 (神奈川県

横浜市) (若手研究奨励賞受賞)  
27. 藤井千華子, 宮下和季, 藤井健太郎, 井上博之, 萩原あいか, 三石正憲, 村木絢子, 田蒔昌憲, 河合俊英, 伊藤裕  
電子キャリア前駆体アミノレブリン酸を用いたミトコンドリア活性化によるサルコペニア治療の試み  
第35回日本肥満学会学術総会 2014年10月25日 シーガイアリゾート (宮崎県宮崎市)  
28. K. Miyashita, H Itoh, K Nakao,  
Natriuretic Peptides/ cGMP-dependent Protein Kinase Cascades Regulate Muscle Mitochondrial Content as to Prevent Obesity.  
The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 11 Sep. 2014, Kyoto (Japan) (Invited lecture)  
29. 宮下和季, 藤井千華子, 藤井健太郎, 井上博之, 萩原あいか, 三石正憲, 村木絢子, 田蒔昌憲, 河合俊英, 伊藤裕  
ミトコンドリア電子伝達系活性化物質を用いたサルコペニア治療の試み  
第32回内分泌代謝学セミナー 2014年7月12日 富士レークホテル (山梨県富士河口湖町) (招待講演)  
30. M. Tamaki, K. Miyashita, S. Wakino, K. Hayashi, H. Itoh  
Exercise endurance of 5/6 nephrectomized mice was improved by gastric hormone ghrelin through PGC-1 $\alpha$ -dependent activation of muscle mitochondria  
16<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology 23 June 2014, Chicago (USA)  
31. 田蒔昌憲, 宮下和季, 脇野 修, 三石 正憲, 林 晃一, 伊藤 裕  
消化管ホルモングレリンはCKDにおける身体能力低下を改善する  
第86回日本内分泌学会学術総会 2014年4月25日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)  
32. 田蒔昌憲, 宮下和季, 脇野 修, 三石 正憲, 林 晃一, 伊藤 裕  
慢性腎臓病の腎筋連関による身体能力低下と消化管ホルモングレリンの治療効果  
第51回日本臨床分子医学会 2014年4月22日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 3 件)

1. 田蒔昌憲, 宮下和季, 伊藤裕  
慢性腎臓病における身体能力低下のメカニズムとグレリンのミトコンドリア作用を介したその改善  
医薬ジャーナル社 最新透析医療, 総ページ数 860 (該当ページ 561-569), 2016  
2. 宮下和季, 田蒔昌憲, 伊藤裕  
腎不全に伴う代謝失調と腎筋連関  
中外医学社 Annual Review 2015 腎臓, 総ページ数 230 (該当ページ 164-171), 2015  
3. 藤井健太郎, 宮下和季, 伊藤裕  
心血管代謝とエイジングプロセス  
メディカルビュー社日本抗加齢医学会認定

テキスト第3版, 総ページ数 230 (該当ページ 164-171), 2014

〔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  
<http://www.keio-emn.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 和季 (MIYASHITA Kazutoshi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師  
研究者番号: 50378759

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

伊藤 裕 (ITOH Hiroshi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授  
研究者番号: 40252457

田蒔 昌憲 (TAMAKI Masanori)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
研究者番号: 90528902

三石 正憲 (MITSUISHI Masanori)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
研究者番号: 50468485