

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15273

研究課題名(和文)サルコペニア治療薬の臨床応用に向けた基礎的検討

研究課題名(英文)The basic research for clinical application of anti-sarcopenic medication

研究代表者

山本 浩一 (Yamamoto, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00528424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性に筋量や筋力が低下するサルコペニアの介入方法の開発は重要な課題である。我々はレニン-アンジオテンシン(RA)系の構成要素であるACE2とその産生物質のアンジオテンシン1-7(A1-7)に着目し、ACE2やA1-7が加齢性の筋力低下を抑制するメカニズムを検討した。その結果、ACE2欠損がマウスの加齢性の筋力低下を増悪させること、高齢期でのA1-7投与が筋力を回復させることを見出し、メカニズムとして骨格筋における老化関連遺伝子p16の発現制御が関与する可能性を見出した。また、このような効果には従来A1-7の受容体とされるMasを介する系と介さない系が関与していることが示唆される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is an aging-related loss of skeletal muscle quantity and function, and the treatment of sarcopenia is an emerging strategy of preventing falls in the elderly. In this study, we focused on ACE2 and A1-7 that are components in the renin-angiotensin system, and investigated whether and how these components contribute to the prevention of sarcopenia. Using knockout mice, we found that the deletion of ACE2 exaggerated aging-related skeletal muscle weakness, and A1-7 infusion improved skeletal muscle function in aged mice. These findings were accompanied by up-regulation of p16, a senescence-associated gene in ACE2 knockout mice. Using mice deleted for Mas, a known receptor of A1-7, we also found the results supporting the notion that ACE2-A1-7 improves aging-associated skeletal muscle weakness via both Mas dependent and independent pathway.

研究分野：老化疾患

キーワード：サルコペニア レニン-アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

老化に伴う骨格筋萎縮と骨格筋機能の低下を称する疾患概念であるサルコペニアは高齢者の生活の質や生命予後を悪化させることから、その介入療法の開発は超高齢社会の本邦において喫緊の課題である。従来介入療法である運動療法や栄養療法には限界があり薬物療法の開発が期待されるが、これまでに確立された薬物療法は存在しない。一方、昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II (AngII) は様々な疾患の病因に関与することが知られるが、我々は AngII を分解するアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) とその分解産物であるアンジオテンシン 1-7 (Ang1-7) に着目し研究を行ってきた。Ang1-7 は AngII への拮抗作用を有する事が知られるが、我々は ACE2 の欠損がマウスのインスリン感受性を悪化させることを示した研究において、骨格筋の転写因子である Myocyte enhancer factor (MEF)2 発現が Ang1-7 により制御されており ACE2 欠損が MEF2 発現を著明に減少させることを示した (2013 Diabetes)。MEF2 は骨格筋分化に重要な役割を果たすことから我々は ACE2 や Ang1-7 が骨格筋機能に影響を与えることを想起し検討を開始した。MEF2 は骨格筋分化に重要な役割を果たすことから我々は ACE2 や Ang1-7 が骨格筋機能に影響を与えることを想起し検討を開始した。これまでに、ACE2 欠損はマウスの加齢による握力の低下を促進させることを見出した。また、少数例での検討ではあるが、24 ヶ月齢の高齢マウスへの Ang1-7 の4週間投与が握力を著明に改善させることを確認している。一方、2003年に Proto-oncogene の Mas は腎臓や血管における Ang1-7 の受容体であることが報告された。但し、Ang1-7 の受容体が mas 以外に存在しないことや骨格筋の Ang1-7 受容体が mas であることは証明されていない。

2. 研究の目的

Ang1-7 受容体を標的としたサルコペニアの薬物療法の実現に向けての基盤構築を目的とする。尚、申請時には、以下の計画 1-4 を立案したが、計画 3-4 に関しては研究期間中に得られた結果から、必要性が低いと考えて本期間中には施行しなかった。

計画 1 ACE2 欠損や Ang1-7 投与が高齢マウスの骨格筋機能や筋量に及ぼす影響の検討

ACE2 によって産生される Ang1-7 が加齢に伴う骨格筋機能や筋量の低下に保護的に働くことを示す。また Ang1-7 投与が加齢による骨格筋機能や筋量の低下を改善することを示す。

計画 2 Ang1-7 による骨格筋機能改善作用における Ang1-7 受容体 (mas) 依存性の検討

Ang1-7 による骨格筋機能改善作用が既知の Ang1-7 受容体である mas を介する作用か否かを示す。

計画 3 計画 2 を基にした Ang1-7 系賦活化を機序とする新規薬物療法の探索

計画 2 に基づき Ang1-7 による骨格筋機能改善作用の責任受容体を同定しアゴニスト探索の起点とする。

計画 4 ACE2 欠損や Ang1-7 が認知症マウスの認知機能に及ぼす影響の検討

MEF2 は中枢神経系に豊富に存在し認知機能に影響を及ぼすことが報告されている。MEF2 賦活化作用を有する Ang1-7 が認知機能に及ぼす影響を検討し薬物療法の付加的効果や負の作用の有無を示す。

3. 研究の方法

(申請時から一部変更あり)

計画 1 ACE2 欠損や Ang1-7 投与が高齢マウスの骨格筋機能や筋量に及ぼす影響の検討

3, 6, 12, 18, 24 ヶ月齢に握力測定を施行した後、Ang1-7 かコントロール (生理食塩水) を浸透圧ポンプにて4週間持続的に投与する。握力測定を施行した後解剖した。マウスの運動量測定を running wheel にて評価し、代謝機能はメタボリックケージで評価した。また耐糖能は腹腔内糖負荷試験で評価した。ACE2 欠損

が骨格筋の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、15 ヶ月齢マウスに骨格筋（前脛骨筋）の坐骨神経刺激時の張力測定を行った後、対側の前脛骨筋を用いて RNA マイクロアレイ解析を行った。

計画2 A1-7による骨格筋機能改善作用における mas 依存性の検討

mas 欠損マウスと野生型マウス、ACE2 欠損マウスに対し 3,6,12,18,24 ヶ月齢に握力測定を施行した後、A1-7 か、コントロール(生理食塩水)を浸透圧ポンプにて 4 週間持続的に投与した。握力測定を施行した後解剖した。薬剤の投与前後に下肢 CT を撮影し骨格筋量を評価した。

4. 研究成果

計画1に関して、24 ヶ月齢のマウスに対する A1-7 投与が握力に及ぼす影響に関して検討したところ、ACE2 欠損マウスにおいては A1-7 投与群で有意な握力の改善を認めた。また、野生型マウスにおいても生食群に比して A1-7 投与群で握力変化は有意に改善しており、高齢マウスへの A1-7 投与が握力改善に寄与することが示された。この結果を説明するメカニズムに関して探索を行ったが、筋重量、CT での筋肉量、運動量、代謝機能、耐糖能に関して ACE2 欠損や A1-7 の影響は認めなかった。15 ヶ月齢マウスを用いた検討では前脛骨筋の張力には差が認められなかったが、坐骨神経連続刺激時の張力低下(筋疲労を反映)は ACE2 欠損マウスで有意に増強していた。同筋における RNA 発現をマイクロアレイ解析にて確認したところ、老化関連遺伝子である p16 の顕著な発現増加を認めた。一方、24 ヶ月齢マウスにおける A1-7 投与は p16 に変化をもたらさなかった。15 ヶ月齢マウス骨格筋の組織解析において、筋疾患で好発する核の中心化を効率に認めたが、線維化や筋繊維の萎縮は認めなかった。A1-7 投与による組織への影響は現在検討中である。

計画2に関して、3 ヶ月の時点で野生型マウ

スと ACE2 欠損マウス、Mas 欠損マウスの間に握力の差を認めなかった。これまでの検討と同様に ACE2 欠損マウスの握力は、野生型マウスより 6 ヶ月以降有意に低かった。一方、Mas 欠損マウスの握力は 18 ヶ月齢で ACE2 欠損マウスと同等度まで低下したが、それ以外の月齢では野生型マウスと同等であった。24 ヶ月齢において野生型マウス、ACE2 欠損マウスでは生食投与群に比べ A1-7 投与前での握力は同等であったが、投与後では A1-7 投与群で有意に高値であった。一方、Mas 欠損マウスでは投与前後に生食投与群と A1-7 投与群で握力に差を認めなかった。以上、本研究期間に新たに得られた結果は以下のよう

にまとめられる。1. ACE2 欠損や A1-7 がマウスの骨格筋機能に及ぼす影響にはインスリン抵抗性、代謝機能、筋肉量、運動量は関与しない。2. ACE2 欠損は骨格筋において老化関連遺伝子 p16 の発現増加や筋疾患に特徴的な組織学的変化をもたらす。3. 高齢マウスへの A1-7 投与による筋力改善効果は p16 発現変化を伴わない。4. Mas 欠損マウスは ACE2 欠損マウスと比し加齢による筋力低下が軽度であり、ACE2 欠損マウスの形質に Mas 非依存性の経路が存在することが示唆される。5. 高齢 Mas 欠損マウスに対する A1-7 投与が筋力を改善させないことから、A1-7 の効果は少なくとも一部は Mas 依存性であることが示唆される。このような結果から、今後 ACE2-A1-7 がもたらす骨格筋への影響の Mas 依存性、非依存性経路の詳細な解明を行っていく予定である。また、ACE2 欠損マウスにおける p16 の早期発現上昇が、ACE2 欠損マウスの早期老化形質発現の原因なのか、あるいは未知の経路を介した老化マーカーとしての上昇なのかについても今後検討を行う予定にしており、将来の臨床応用に向けた基礎的基盤の構築を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice

Takeshita H, Yamamoto K, Nozato S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Yamamoto R, Imaizumi Y, Hongyo K, Yokoyama S, Takeda M, Oguro R, Takami Y, Itoh N, Takeya Y, Sugimoto K, Fukada SI, Rakugi H.

Sci Rep. 2017 Feb 8;7:42323. doi: 10.1038/srep42323.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 浩一 (YAMAMOTO, Koichi)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合
内科学 講師

研究者番号 : 00528424

(2)研究協力者

野里 聡子 (NOZATO, Satoko)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合
内科学 大学院生

竹下 ひかり (TAKESHITA, Hikari)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合
内科学 特任研究員

研究者番号 : 10791577