

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月1日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08916

研究課題名(和文) 鍼治療による加齢性サルコペニア予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of prevention method for sarcopenia in elderly by acupuncture therapy

研究代表者

大田 美香(Ohta, Mika)

神戸大学・医学部附属病院・学術研究員

研究者番号：20274706

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)： これまでに我々は、マウスへの鍼通電刺激が骨格筋幹細胞の増殖を誘導し筋萎縮を予防と、その作用機序を分子レベルで解明してきた。他方、高齢社会の進展により、加齢に伴う筋肉量の減少と筋力の低下、結果として日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)も低下する、加齢性サルコペニアが問題となっている。

そこで本研究では、加齢性サルコペニアを鍼通電刺激により予防可能な治療法確立を目標に研究した。具体的には、(1)フェムト秒レーザー照射刺激、(2)刺鍼技術の一つである切皮刺激、がそれぞれ骨格筋に及ぼす効果を解析した。また、(3)老化促進モデルマウス(SAM)への鍼通電刺激の有効性、も解析した。

研究成果の概要(英文)： In our previous molecular biological study, we elucidated that electroacupuncture (EA) treatment led to a satellite cell-related proliferative reaction and prevent muscle atrophy in mice. On the other hand, the recent problem in our aging society in Japan is sarcopenia in elderly, which is characterized by a progressive age-related loss of skeletal muscle mass and strength. It results in the decrease in the levels of activities of daily life (ADL) and quality of life (QOL).

The aim of this study was to establish a treatment method that can prevent age-related sarcopenia by EA stimulation. We analyzed the efficacy of femtosecond lasers irradiation and seppi, which is one type of acupuncture technique. We then investigated the efficacy of EA in senescence-accelerated mice (SAM).

研究分野：東洋医学

キーワード：鍼通電刺激 加齢性サルコペニア 老化促進モデルマウス 東洋医学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、反復の鍼通電刺激でミオスタチン遺伝子発現が抑制され、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞（サテライト細胞）が増殖すること、を明らかにした（*Physiol Genomics*, 30, 102-110, 2007）。このことから、鍼通電刺激による骨格筋萎縮の予防が予測され、後肢懸垂での筋萎縮マウスへの鍼通電刺激で、その効果を解析した。その結果、鍼通電刺激は筋萎縮を抑制した（日本温泉気候物理医学会雑誌 74, 103-111, 2011）。次に、フェムト秒レーザー照射による骨格筋のミオスタチン遺伝子発現抑制を報告し（*Appl Phys A*, 110, 613-616, 2013）、特許を取得した[米国特許(No. US8, 317, 847 B2)、国内特許(特許第 5164080 号)]。

近年我が国は高齢者の増加が著しく、加齢性サルコペニアが問題となっている。加齢性サルコペニアは加齢に伴う筋肉量の減少と筋力の低下により生じ、その筋量の維持には筋肉への負荷を伴う運動が有効だが、運動の継続は高齢者にとって困難である。また、加齢性サルコペニアは高齢者の転倒の主原因であり、健康寿命の短縮をもたらす。よって超高齢社会の我が国では、加齢性サルコペニアの予防法が重要である。

以上を踏まえ、これまでの我々の研究成果を基盤とし、加齢性サルコペニアの予防法を確立する研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、①加齢性サルコペニアを予防可能な刺激方法の解明、②その予防効果の有効性の解析、③分子メカニズムの解明、に取り組み、加齢性サルコペニア予防を可能にする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー照射刺激

① グループ分けとフェムト秒レーザー照射方法

8週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを麻酔のみの無刺激のコントロール群(n=5)と、フェムト秒レーザー照射群(n=6)に分けた。

フェムト秒レーザー照射条件は、麻酔下のマウス下腿後面 1.2 x 1.2cm に 0.5 mm 間隔で 625 点のフェムト秒レーザー照射を行った。エネルギー量は 300 μ J/pulse、集光点は直径 400 μ m、照射時間は 150fs であった。

② 解析方法

照射 5 時間後、麻酔下のマウス下腿三頭筋を摘出し、ウェスタンブロット法でミオスタチンのタンパク質量と、mTOR と p70S6K のリン酸化について解析した。

(2) 切皮刺激

① グループ分けと切皮刺激方法

8週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを麻酔のみのコントロール群(n=5)と、切皮刺激群(n=5)に分けた。

切皮刺激は日本独自の東洋医学の治療手技の 1 つであり、鍼の刺入は皮膚のみに限局する。麻酔下で切皮刺激群の下腿部分を脱毛し、ステンレス鍼(0.16 mm 径)を用いて切皮刺激を 30 回行った。

② 解析方法

切皮刺激 5 時間後、麻酔下のマウスの下腿三頭筋の摘出と採血を行い、解析に供した。皮膚組織はホルマリン固定後に HE 染色を行った。血清中クレアチンキナーゼ活性の測定と、骨格筋のミオスタチン遺伝子の発現を解析した。

(3) 老化促進モデルマウス(SAM)への鍼通電刺激

① グループ分け

SAM は促進老化・短寿命を示す P 系と正常老化を示す R 系からなる。SAMP 系の寿命は約 15~17 月齢である。長期間の飼育途中で死亡するマウスの匹数を考慮して、マウスを準備した。10ヶ月齢の SAMP8 と SAMR1 を鍼通電刺激群とコントロール群に分け、合計 4 群(1 群は約 5 匹)を実験に使用した。

② 鍼通電刺激方法

麻酔下のマウス下腿三頭筋に 2 本のステンレス鍼(0.16 mm 径)を刺入し、針電極低周波治療器で鍼通電刺激を約 30 分間行った。鍼通電刺激の期間を 2 週間とし、隔日で行った。2 週間の刺激期間終了後に、麻酔下で全てのマウスの採血と下腿三頭筋の摘出を行い、シグナル伝達の解析、組織解析等に供した。

③ ヒラメ筋の相対筋量と筋線維径

ヒラメ筋の萎縮の程度を評価するため、マウス解剖時に体重とヒラメ筋の重量を測定した。各群から 3 匹のヒラメ筋の横断切片を作成し、筋線維径(横断面の短径)を計測した。

④ シグナル伝達の解析方法

タンパク質の合成と分解について、ウェスタンブロット法で mTOR と p70S6K のリン酸化を解析した。そして、Wnt シグナルにより活性化される β -カテニン経路の実験条件を検討した。

(4) 統計解析・その他

結果は、全て平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較には t 検定、4 群間の比較には一元配置分散分析を行った。全て 5%未満を有意水準とした。

マウスを用いた動物実験に際し、「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日文科科学省告示第71号)」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日日本学術会議)」に基づき、奈良先端科学技術大学院大学動物実験委員会(承認番号:1132)と神戸大学動物実験委員会(承認番号:P160208)の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) フェムト秒レーザー照射刺激の解析結果

① ミオスタチンタンパク質の量

図1に示すように、フェムト秒レーザー照射(FL)では、コントロール群と比較すると、照射部位である下腿三頭筋のミオスタチンタンパク質の量が有意に減少した。この結果から、骨格筋幹細胞の増殖誘導が生じる可能性が示された。

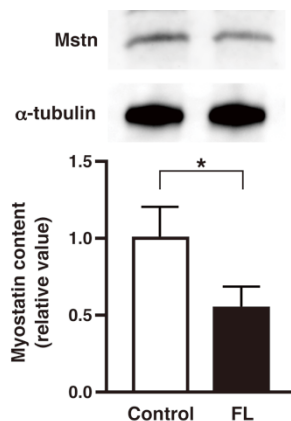


図1 フェムト秒レーザー照射後のミオスタチンタンパク質の量

② シグナル伝達

mTOR/p70S6K シグナル伝達はタンパク質の合成に関与し、骨格筋の量と質を維持するうえで重要な役割を担う。フェムト秒レーザー照射群はコントロール群に比べて、mTORのリン酸化は高い傾向を示した。そして、mTOR下流のp70S6Kのリン酸化は有意に高かった。このことから、タンパク質の合成が活性化されたことが示唆された。

③ 血清クレアチンキナーゼ活性

フェムト秒レーザー照射群の血清クレアチンキナーゼ活性はコントロール群と同レベルであった。この結果は、フェムト秒レーザー照射刺激では骨格筋の損傷がないことを示した。フェムト秒レーザー照射後の組織像では、皮下1100 μ mまでの表皮と真皮に微細な損傷が認められたが、筋肉へは達していなかった。フェムト秒レーザー照射刺激は、骨格筋に対して非侵襲的な刺激法であることが明らかになった。

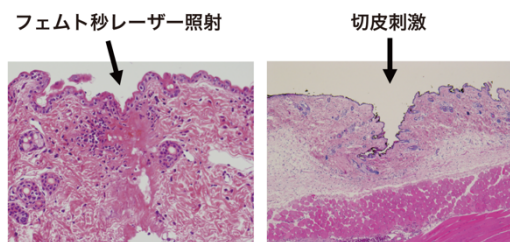


図2 フェムト秒レーザー照射後と切皮刺激後の組織像

フェムト秒レーザー照射刺激が骨格筋へ及ぼす有効性は認められたが、現在医療器具としての実用化はされていない。フェムト秒レーザー照射と切皮刺激後の組織像が、図2に示すように皮膚組織の損傷が類似していることから、刺鍼よりもマイルドな刺激である切皮刺激の効果を検討した。

(2) 切皮刺激の解析結果

① 血清クレアチンキナーゼ活性

切皮刺激群の血清クレアチンキナーゼ活性はコントロール群と同程度であった。このことから、切皮刺激はフェムト秒レーザー刺激と同様に骨格筋の損傷がないことが明らかになった。

② ミオスタチン遺伝子発現

切皮刺激群のミオスタチンの遺伝子発現はコントロール群と同レベルであった。この結果から、切皮刺激ではミオスタチン遺伝子の抑制効果は見られず、現時点での侵襲度の低い治療方法は鍼通電刺激である事が再確認された。

(3) SAMへの鍼通電刺激の解析結果

① ヒラメ筋の相対筋量

SAMR1とSAMP8を鍼通電刺激群(R1-C, P8-C)とコントロール群(R1-E, P8-E)に分け、合計4群のヒラメ筋の相対筋量を比較した。いずれのマウスも相対筋量に差は認められなかった。

② ヒラメ筋線維径

各群から

3匹のヒラメ筋の横断切片を作成し、横断面の短径を計測した。SAMP8とSAMR1の両方で、コントロール群より鍼通電刺激

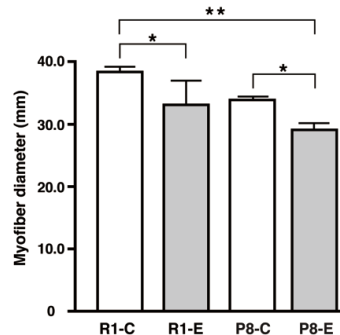


図3 鍼通電刺激後のヒラメ筋短径

群の筋線維径が減少していた(図3)。本実験の鍼通電刺激量は、これまでの実験で筋萎縮が改善された鍼通電刺激量を使用した。筋線維径の結果から、10ヶ月齢という高齢のSAMP8とSAMR1にとって、今回の鍼通電刺激量は筋萎縮の方向へ作用した可能性が考えられた。

③ シグナル伝達

ウェスタンブロッティング法でmTOR/p70S6Kシグナル伝達の活性について解析した。その結果、鍼通電刺激群とコントロール群のmTOR活性に差は認められなかった。一方、p70S6K活性はSAMR1の鍼通電刺激群で低下したが、SAMP8では鍼通電刺激群とコントロール群の間に差はなかった。この結果か

ら、鍼通電刺激が及ぼす骨格筋への反応が、SAMP8 と SAMR1 では異なることが示唆された。

また、老化に関与する Wnt シグナル経路については評価系の確立まで終えた。引き続き、Wnt シグナルやミオスタチンタンパク質の量について解析する。未発表データは学会発表と論文報告を予定している。

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 2 件)

- ① Mika Ohta*, Aki Sugano*, Naoya Hatano*, Hirotaka Sato, Hirofumi Shimada, Hitoshi Niwa, Toshiyuki Sakaeda, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Ken-ichi Yamamura, Yutaka Takaoka: Co-precipitation molecules of Hemopexin and Transferrin may be key molecules for fibrillogenesis in the TTR V30M Amyloidogenesis. *Transgenic Research*, 査読有, 27(1), 2018, pp.15-23 (*: co-first author)
DOI:10.1007/s11248-017-0054-x.
- ② Mika Ohta, Yoichiro Hosokawa, Naoya Hatano, Aki Sugano, Akihiko Ito, Yutaka Takaoka: Efficacy of femtosecond lasers for application of acupuncture therapy. *Lasers Med Sci*, 査読有, 32, 2017, pp.2167-2171, DOI:10.1007/s10103-016-2124-3, 2016

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大田美香、細川陽一郎、波多野直哉、菅野重紀、井上敬夫、鈴木高史、伊藤彰彦、高岡 裕: 鍼治療としてのフェムト秒レーザー照射、生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学大会)、2017. 12. 7、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ② 大田美香、高岡 裕: 新しいレーザー鍼: フェムト秒レーザー鍼の骨格筋への影響、第 66 回全日本鍼灸学会学術大会、2017. 6. 11、東京大学本郷キャンパス (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大田 美香 (OHTA, Mika)
神戸大学・医学部附属病院・学術研究員
研究者番号: 20274706

(2) 研究分担者

高岡 裕 (TAKOKA, Yutaka)
神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20332281

高雄 由美子 (TAKO, Yumiko)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 20332281

一瀬 晃洋 (ICHINOSE, Akihiro)
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
研究者番号: 90362780

(3) 研究協力者

菅野 重紀 (SUGANO, AKI)
神戸大学・医学部附属病院・特命助教
研究者番号: 90362780