

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12940

研究課題名（和文）漢方薬によるサルコペニア予防・改善に関わるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名（英文）Effect of traditional herbal medicine on sarcopenia

研究代表者

町田 修一（Machida, Shuichi）

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授

研究者番号：40421226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：高齢期骨格筋の特徴として、骨格筋量の低下と筋肉内脂肪量が増加することが知られている。本研究では、漢方薬がサルコペニアの予防・改善のための筋肉増強（再生）因子となりうるかについて、筋損傷モデルや不活動モデルのギブス固定を用いて、生薬である黄耆の筋萎縮や筋損傷に及ぼす影響を科学的エビデンスに提示することが本研究の主たる目的である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の漢方薬に関する研究は、現象論的な報告が多く、生体制御機構にまで踏み込んだ系統的・統合的研究は少ない。本研究の特色としては、漢方薬のサルコペニアの予防効果について、筋サテライト細胞に何らかの形で記憶（メモリー）されているというエピジェネティクス制御機構を関連付けて検討しようとしている点である。今回の研究成果から、漢方薬の服用が骨格筋の幹細胞の諸機能に影響を及ぼし、筋再生を促進するエビデンスとメカニズムを提示することができれば、リハビリテーション医学やスポーツ科学への応用も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Loss of skeletal muscle mass and function occurs with aging. In this study, we aimed to investigate whether administration of traditional herbal medicine traditional herbal medicine protects against sarcopenia. Two models, downhill running-induced muscle damage and muscle atrophy induced by cast immobilization, were used to determine effect of traditional herbal medicine traditional herbal medicine on muscle damage/regeneration and muscle atrophy.

研究分野：運動生理学

キーワード：漢方 サルコペニア 筋サテライト細胞 生薬 筋損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）の発症機序の詳細については十分に解明されていない。骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし、加齢に伴い筋再生能は低下する。サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷からの再生が補いきれないために顕在化するという考えがある（Grounds, 1998）。骨格筋は、多核の筋線維から構成されているが、筋線維の筋形質膜と基底膜の間には筋サテライト細胞と呼ばれる単核の組織幹細胞が存在する。骨格筋が損傷や過負荷等を受けると、筋サテライト細胞は増殖因子やサイトカイン等の刺激で活性化されて増殖を開始し筋芽細胞となる。増殖した筋サテライト細胞は、互いに、あるいは既存の筋線維と細胞融合することによって筋組織を再構築し肥大を促す。そのため、筋の再生能力の大半は筋サテライト細胞が担っていると考えられ、骨格筋の再生において重要な役割を演じている（Hawke ら, 2001）。しかし、筋サテライト細胞は加齢に伴い数および諸機能が低下することが知られており、現時点では、筋サテライト細胞の増殖や筋分化等の制御機構は多くが未解明である。

漢方薬は、加齢に伴う体の不快や不調、病後・術後の体力低下や虚弱体質の改善などの目的に使われることが多く、サルコペニア該当者やその予備軍が何かしらの漢方薬を日常的・長期的に服用していることが予想される。現代の健康や医療にとって、漢方薬はなくてはならない重要な治療手段の一つとなっており、科学的な研究も進み、複雑でわかりにくいとされてきた薬理作用も徐々に解明されてきている。しかしその一方で、よりよい漢方薬の利用には高いレベルのエビデンスの集積が必要であり、そのメカニズムの解明が待たれているのも事実である。

申請者らはこれまで、ヒトのサルコペニアと類似した表現型を示す加齢実験動物を用いて、筋サテライト細胞の増殖や筋分化能が加齢に伴い低下することや、高齢期の骨格筋では筋損傷後の再生過程で脂肪蓄積が顕著に認められることを報告してきた。そして最近、サルコペニアの予防改善を目的に、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) のように筋再生を促進もしくは筋サテライト細胞の諸機能を高める物質を探索する過程で、数種類の漢方薬が筋損傷後の筋再生を促進させることや株化された筋芽細胞 (C2C12) の筋分化を高めて筋肥大を促進する知見を得ていた。そのため、介護・寝たきりの予防のための新規な介入方法をエビデンススペースに開発するために、組織幹細胞である筋サテライト細胞が長期的な漢方薬服用によってどのように影響されるのか検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、漢方薬がサルコペニアの予防・改善のための筋肉増強（再生）因子となりうるかについて、筋損傷モデルやギプス固定による不活動性筋萎縮を用いて、生薬の筋損傷および筋萎縮に及ぼす影響を科学的エビデンスに提示することが本研究の主たる目的であった。

3. 研究の方法

【筋損傷モデル】

若年期ラットを用いて下り走（ダウヒル）による伸張性筋収縮の筋損傷モデルの確立を試みた。下り走は傾斜 -16 度、速度 16m/min、5 分のランニングと 2 分の休憩による伸張性収縮運動を疲労困憊に至るまで負荷した。この筋損傷モデルを用いることによって、筋サテライト細胞の諸機能（活性化、増殖、分化）に対する漢方の影響を *in vivo* レベルで検討することが可能と考えた。下り走後、3 日目と 5 日目のタイミングでヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋を摘出し、連続凍結切片を作成した。一般的な病理所見を把握

するため、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。さらに、筋組織の脂肪化を Oil Red O 染色、繊維化についてはアザン染色を用いて評価した。筋サテライト細胞(Pax7)や諸機能(活性化、増殖、分化)を特異的に認識する抗体(MyoD、Ki-67、myogenin)を用いて免疫組織化学染色法にて検討し、高性能高解像度を備えた蛍光顕微鏡を用いて筋サテライト細胞の諸機能を評価した。

【ギプス固定】

若年期ラットを用いて、筋萎縮モデルとして14日間の足関節底屈位でのギプス固定を実施した。下肢のむくみや倦怠感に用いられる漢方薬に含まれる生薬Aを摂取する漢方薬摂取群と対照群の2群に分けた。当該生薬が筋萎縮を抑制するための条件を明らかにするために、服用期間やタイミング、投与量や濃度等を様々に検討した。そして、漢方薬を摂取する群には1日1回の割合で、ギプス固定前1週間とギプス固定2週間の計3週間、経口ゾンデ(FUCHIGAMI)を用いて至適濃度の漢方薬を経口投与(1.5 mL/日)した。14日間のギプス固定終了後、ヒラメ筋および足底筋を摘出し、筋重量測定後、連続凍結切片を作成した。一般的な病理所見、筋線維数および総核数を把握するため、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。さらに、筋線維横断面積と筋線維タイプ組成比を評価するために各種のミオシン重鎖抗体を特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、高性能高解像度を備えた蛍光顕微鏡で比較検討した。その他に、筋萎縮関連遺伝子発現量を Real-time PCR 法を用いて分析した。

4. 研究成果

- 伸張性収縮運動を疲労困憊に至るまで負荷した今回の下り走(ダウンヒル)の条件によって、大腿部で筋損傷が生じる部位を特定し、*in vivo*での筋サテライト細胞の諸機能を組織染色法で評価することに成功した。
- 今回の下り走によって、筋損傷・再生過程での筋サテライト細胞の諸機能を評価する上で、下り走の3日目後よりも5日目後の方が増殖や筋分化の機能を評価する上で適切なタイミングであることが明らかになった。
- 使用した生薬を服用することによって、ギプス固定による不活動性筋萎縮を抑制できる条件を見出した。
- 14日間のギプス固定では、遅筋タイプのヒラメ筋と速筋タイプの足底筋で同程度の筋萎縮を認めたが、生薬Aの服用によって筋萎縮を抑制できたのは遅筋タイプのヒラメ筋だけであった。さらに、筋萎縮関連遺伝子発現では、ヒラメ筋における MuRF1 遺伝子発現にギプス固定と生薬Aの服用の影響が認められた。
- 本研究によって、生理的な筋損傷・再生モデルとして、筋サテライト細胞の諸機能(活性化、増殖、分化)が認められる部位やタイミングを特定し、実験動物(ラット)に漢方薬(生薬)を長期的に服用させる方法や条件を確立することができた。よって、今後は、当該生薬を長期的に服用させ、下り走後の筋損傷・再生過程での組織幹細胞である筋サテライト細胞の諸機能をエピジェネティクス制御機構の観点から検討することが可能となったと思われる。
- 今回の研究成果から、漢方薬(生薬)の服用が骨格筋の幹細胞の諸機能に影響を及ぼし、筋再生を促進するエビデンスとメカニズムを提示することができる動物実験モデルが確立できれば、リハビリテーション医学やスポーツ科学への応用が期待できる。
- 生薬Aをはじめ、漢方薬や生薬が筋再生や筋肥大を促進する筋肉増強(再生)因子である

ならば、高齢者を対象に筋力トレーニングと漢方薬を組み合わせた介護・寝たきり予防改善のための新規な介入法の開発に応用できる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Kawanishi N, Takagi K, Lee HC, Nakano D, Okuno T, Yokomizo T, Machida S. Endurance exercise training and high-fat diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314:R892-R901, 2018. doi: 10.1152/ajpregu.00371.2017
2. Kawanishi N, Funakoshi T, Machida S. Time-course study of macrophage infiltration and inflammation in cast immobilization-induced atrophied muscle of mice, *Muscle & Nerve*, 57: 1006-1013, 2018. doi: 10.1002/mus.26061.
3. Funakoshi T, Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo T, Shibata H, Machida S. Quercetin inhibits adipogenesis of muscle progenitor cells in vitro, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13: 39-44, 2018. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.12.003.
4. Nakano D, Machida S. Effect of high-fat diet on mitochondrial fission related protein Drp1 in slow- and fast-twitch muscles. *Juntendo Medical Journal*, 64(suppl1): 103-106, 2018.
5. 後藤亜由美, 町田修一. サルコペニア研究の現状と臨床への応用. *理学療法学*. 45: 332-341, 2018.
6. 町田修一, 田中智美. サルコペニア予防・改善のための運動と栄養の組み合わせ. *日本スポーツ栄養研究誌*. 12: 1-9, 2018.

〔学会発表〕(計8件)

【発表(招待講演)】

7. 町田修一, 高齢者を対象としたレジスタンストレーニングの効果を規定する要因とその分子機序. 日本スポーツ栄養学会第5回大会, 京都, 2018年7月.
8. 町田修一, 筋力アップで延ばす健康寿命 ~持続可能な活力ある社会構築を目指して~. 第53回日本成人病(生活習慣病)学会学術集会, 東京, 2019年1月
9. Machida S. Sex difference in sarcopenia: mechanisms and interventions. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Kobe, Japan. March 29, 2019.

【一般発表】

10. Funakoshi T, Ohta K, Machida S. Damage localization in rat quadriceps frmoris muscle induced by downhill running. The 3rd Congress, International Academy of Sportology, Tokyo, Japan. 2017年10月
11. Nakano D, Machida S. No effect of menstrual cycle phase on endurance training-induced mitochondrial dynamics. ACSM Integrative Physiology of Exercise. San Diego, California, USA. September 5-8, 2018.
12. Hung YL, Ota K, Ishido M, Machida S. Estrogen deficiency leads to decreased water channel aquaporin 4 expression in skeletal muscle. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Kobe, Japan. March 29, 2019.

〔図書〕(計1件)

13. 町田修一(分担執筆). 筋力トレーニングの基礎, トレーニングのための生理学的知識(樋口満監訳), 46-68 頁, 市村出版, 東京, 2018.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=5037>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。