

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07412

研究課題名(和文) 神経筋接合部変化に着目した糖尿病におけるサルコペニア発症メカニズムについての検討

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism of sarcopenia with diabetes mellitus from the viewpoint of neuromuscular junctions

研究代表者

栗波 仁美 (Kurinami, Hitomi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10638555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニア発症において糖尿病がその危険因子となることメカニズムを当初神経筋接合部に着目して研究した。そのマーカーとして考えたC-terminal Agrin fragment(CAF)であったが、モデル動物において差が認められず、同時並行で行っていたユビキチンプロテアソーム系からの蛋白分解に着眼点を移した結果、高血糖時にはユビキチンプロテアソームの発現が上昇し、それによって骨格筋減少が起こる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会において健康寿命の延長が急務であるが、高齢者の活動性の低下を招く要因の一つがサルコペニアであると考えられる。今回の成果により、糖尿病を治療することによってAGEs/RAGEによって引き起こされるユビキチンプロテアソーム系の活性を抑制することとなり結果として骨格筋量減少を抑制できるという可能性が示唆されたと考える。すなわち糖尿病の治療によりサルコペニアの進展を抑制できるということを、そのメカニズムの解明によって証明できつつあるという点で意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus is a well-established risk factor for sarcopenia. At first, we focused on the protein associated with neuromuscular junction in diabetes. Our hypothesis was that C-terminal Agrin fragment(CAF), which is a marker of muscle wasting, increased in diabetics. So we measured serum CAF in diabetic animal model. However, there was no differences between control group and hyperglycemic group. We also investigated the expression of ubiquitin proteasome genes in this animal model and found that the expression of Atrogin1 and MurF1 increased in the diabetic group via AGEs/RAGE. These results suggest that muscle protein degradation is caused by activation of ubiquitin proteasome genes in diabetic model.

研究分野：老年医学

キーワード：サルコペニア 糖尿病 神経筋接合部 CAF(C末アグリニンフラグメント) AGEs(終末糖化産物) ユビキチンプロテアソーム

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは加齢や栄養状態の悪化により引き起こされ、高齢者の活動性の低下、要介護への移行を起こす原因と考えられている。糖尿病がサルコペニアのリスク因子であるとの報告があり、我々のグループにおける研究からもそれを裏付けるデータが出てきている。本研究ではサルコペニアにおける神経筋接合部変化に着目し、糖尿病が神経筋接合部変化をもたらすサルコペニアを促進するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

糖尿病を改善することで神経筋接合部変化の改善があることを確認し、それと共にサルコペニア予防に働くことを確認する。その際のアセチルコリン受容体構造変化のマーカーとして血中 C-terminal Agrin Fragment (CAF) 濃度を用いることとした。動物実験において高血糖により筋線維上のアセチルコリン受容体の構造変化を評価し、筋量の低下がみられるのかを確認し、臨床分野では糖尿病患者のなかでサルコペニアをきたしている群での血中 CAF 濃度を測定し、血糖正常の同年齢群との比較を行っていく。また筋力低下がある群、糖尿病性神経障害がある群、筋力低下および糖尿病性神経障害がある群にわけて治療介入により CAF の値および下肢筋力や筋量に変化がみられるかを確認することを目的とした。

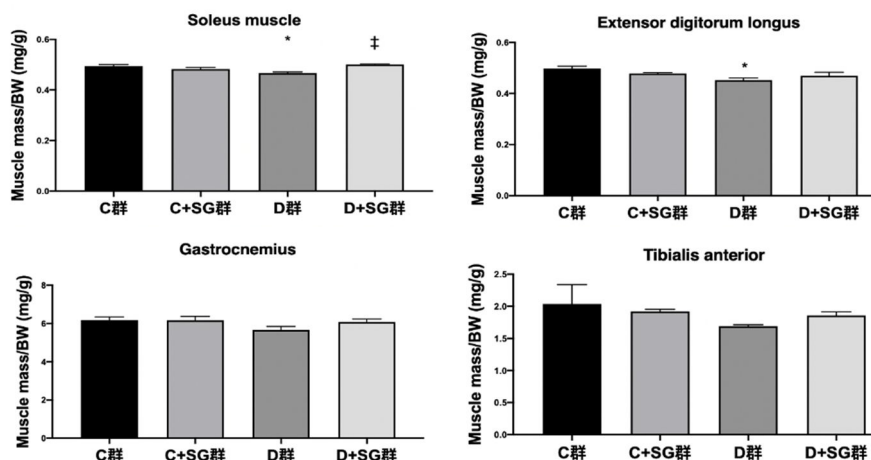
3. 研究の方法 (当初の計画)

- (1) 雄性 Wister ラットにストレプトゾトシンを投与して作成した高血糖モデルラットに、投与 5 週間後より糖尿病治療開始しさらに 4 週間後で Sacrifice して血中 CAF 濃度を測定する。またニューロトリプシンの発現を測定する系を確立していく。筋肉を回収し、アセチルコリン受容体の発現について免疫組織染色にて確認し、高血糖群、治療群、正常群との比較を行っていく。
- (2) 臨床研究のプレ研究として健常高齢者および血糖コントロール目標を達成していない糖尿病患者の血清を用いて、血中 CAF 濃度の測定を行い、これまでのデータ (体重、体組成、身体機能 (筋力、歩行速度、バランス機能)) との対応を行う。
- (3) 65 歳以上で血糖コントロール不良 (HbA1c7.5%以上が 2 か月以上持続) の集団において神経伝導速度を検査装置にて測定、筋力の測定も行い、伝導速度低下 筋力正常群、伝導速度正常 筋力低下群、伝導速度低下 筋力低下群の 3 群を抽出し、各群における血糖評価、血中 CAF 濃度測定を行う。糖尿病治療介入前および介入 6 か月後に身体測定、身体機能測定 (下肢筋力 (等尺性膝進展筋力) 握力、歩行速度、片脚立ち時間、重心動揺検査) 下肢筋エコー、血液検査、尿検査 (尿中ペントシジン、8-OhG 濃度) を測定する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病モデルラットの作成と筋量の評価

糖尿病モデルラットはストレプトゾトシン投与後 2 週間後より体重増加が止まり、何も投与しないコントロール群 (C 群) と比較し体重が低い傾向を認めたと、ルセオグリフロジン投与開始後からは糖尿病治療群 (D+SG 群) は未治療群 (D 群) に比べ食餌量や水分摂取量が少ない傾向があるもののやや体重が増加する傾向を認めた。血糖に関しては糖尿病治療群では正常とまではいかないものの未治療群と比較すると優位に低下を認めた。Sacrifice 後各群の下肢筋量を測定したところ、D 群では C 群に比べヒラメ筋や長趾伸筋において有意に筋量が低い傾向を認めた



が、糖尿病治療によりそれが回復する傾向がみられることがわかった。

図 1 糖尿病モデルラットにおける下肢筋量の比較

(2) 糖尿病治療による筋量低下抑制のメカニズム

当初糖尿病によって発症するサルコペニアのメカニズムとして高血糖が神経筋接合部の破綻を引き起こすと考え、そのマーカーとして CAF の測定を設定した。共同研究者が以前サルコペニアの臨床研究で採取した 65 歳以上の方のサンプル（血清）を用いて CAF の測定を行ったところ非サルコペニア群とサルコペニア群とではサルコペニア群の方が予想通り CAF が高い傾向があった。

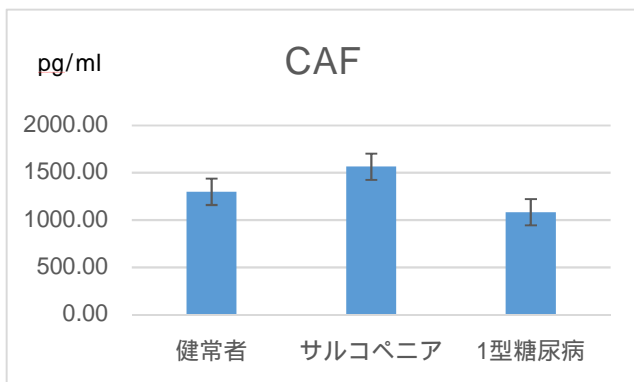


図2 サンプル血清中の CAF 濃度

しかし同じく 65 歳以上で 1 型糖尿病の群ではむしろ CAF が低い傾向がみられた。1 型糖尿病群の血清を用いたのは動物実験にあわせてであったが、今回用いた 1 型糖尿病群の方々の血糖コントロールが比較的良好のため高血糖での筋量低下という条件にそぐわないことが考えられた。臨床における検証時には当初計画した研究の方法のとりの集団を対象に行う予定であったが、対象者を集めることが難しく今回は見送りとなった。

(3) 動物モデルにおいても血清 CAF の測定を ELISA にて行ったが、1 検体あたりのサンプル量の少なさからか D 群と D+SG 群の間に有意な差を認めなかった。

(4) 一方高血糖によるサルコペニアのメカニズムとして酸化ストレスおよび終末糖化産物

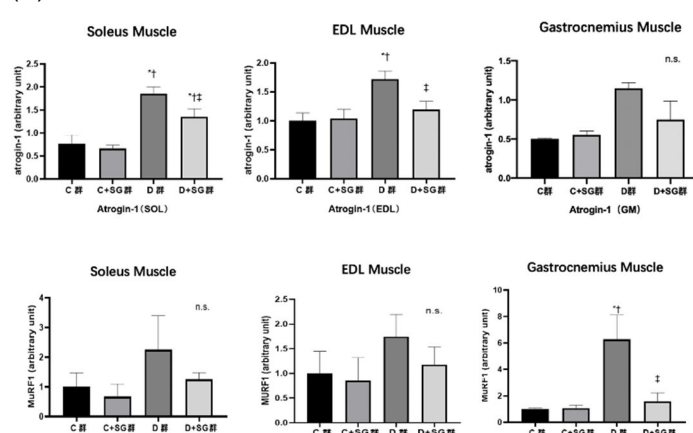


図3 Atrogin1 および MuRF1 の発現

行ったところ、D 群においては特に速筋においてユビキチンプロテアソームである Atrogin1 と MuRF1 の発現が上昇し FoxO1 の発現が低下するが糖尿病治療によってその傾向が抑えられる結果になった。これらの結果から高血糖によって AGEs/RAGE の発現が上昇し、酸化ストレスの上昇や FoxO1 の発現低下がユビキチンプロテアソーム系蛋白発現の上昇を促し骨格筋減少につながる可能性が示唆された。こちらの仮説についてはまだシグナル伝達を埋めるデータが必要であるため、今後の研究課題とした。

(Advanced Glycation Endproducts, AGEs)の関与についても同時に研究しており、同じ動物実験モデルにおいてこれらの分子発現をウェスタンブロッティング法にて確認したところ、D 群では AGEs の発現が上昇している傾向があり、その受容体である RAGE についても有意に発現が上昇していることがわかった。AGEs および RAGE は糖尿病治療により低下みられることがわかり、この分子メカニズムについて解明するため下肢骨格筋

から抽出したサンプルの RT-PCR を

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 研 (Sugimoto Ken) (20437403)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	赤坂 憲 (Akasaka Hiroshi)		
研究協力者	藤本 拓 (Fujimoto Taku)		
研究協力者	安延 由紀子 (Yasunobe Yukiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関