

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15383

研究課題名（和文）サルコペニアモデルマウスにおける、漢方薬補剤の筋萎縮抑制効果のメカニズム解明

研究課題名（英文）Effects of herbal medicines on the muscle atrophy of sarcopenic mice.

研究代表者

矢可部 満隆（Yakabe, Mitsutaka）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10747265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：高齢者は容易に廃用性筋萎縮をきたす。漢方薬の補中益気湯（TJ-41）は高齢者に用いられる。TJ-41が廃用性筋萎縮に与える効果を検証した。無血清培地で培養したC2C12筋管を筋萎縮モデルとし、TJ-41を投与したところ、筋萎縮関連因子atrogen-1の発現上昇および筋線維径の低下が抑制された。廃用性筋萎縮のモデルである後肢懸垂マウスにTJ-41を投与したところ、骨格筋のAMPK活性が増加し、筋萎縮関連因子の発現上昇が抑制され、筋重量低下が軽減された。後肢懸垂を行っていないマウスではTJ-41投与によりAMPK活性上昇、AktとmTOR活性低下、骨格筋量増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、TJ-41が廃用性筋萎縮を抑制する新たなメカニズムが示唆された。サルコペニアやフレイルを有する高齢者に対しても、TJ-41が有効な可能性がある。高齢者医療において漢方は重要な位置を占めているがエビデンスは未だ不十分である。TJ-41をはじめとする漢方薬の作用メカニズムを明らかにすることで、高齢者の漢方薬使用のエビデンス確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Muscle disuse results in loss of skeletal muscle mass and function in elderly individuals. Hochu-ekki-to (TJ-41) is an herbal medicinal formulation used to treat elderly patients. It has been suggested that two atrogenes, atrogen-1 and MuRF1, are ubiquitin ligases involved in disuse-induced muscle atrophy and AMPK is involved in skeletal muscle metabolism. Serum starvation induced the expression of atrogen-1 and MuRF1 in differentiated C2C12 myotubes, and TJ-41 significantly downregulated the expression of atrogen-1 and ameliorated the loss of myotube width. Male mice were subjected to tail-suspension to induce hindlimb atrophy, and administered TJ-41 by gavage. Tail-suspension induced the expression of atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle as well as its muscle atrophy, whereas TJ-41 treatment downregulated the expression of atrogen-1 and ameliorated the loss of the muscle weight. TJ-41 also activated AMPK and inactivated Akt and mTOR in skeletal muscle in non-suspended mice.

研究分野：老年医学

キーワード：サルコペニア 廃用性筋萎縮 補中益気湯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)サルコペニアは筋量と筋力の進行性かつ全身性の減少に特徴づけられる症候群で、高齢者に多く見られ、身体機能障害、QOL低下、死のリスクを伴う¹。サルコペニアは一次性と二次性に分けられる。前者は純粋に加齢によるもの、後者は他の原因によるものであるが、複数の病態を有することが多い高齢者において両者を厳密に区別することは困難な場合が多い。二次性の中では廃用性筋萎縮が問題になる。予備能の少ない高齢者は短期間の不動や活動度低下でも廃用性筋萎縮が生じうる。未曾有の超高齢社会を迎えた我が国では喫緊の課題であるが、予防法や治療法は確立していない。

(2)筋萎縮関連因子である MuRF1, atrogin-1 はユビキチンリガーゼであり、廃用性筋萎縮、神経切断などの幅広い筋萎縮病態において発現が上昇し、筋萎縮を促進するとされる。筋萎縮関連因子はタンパク合成系である PI3K/Akt/mTOR 系によって制御されていて、この系の活性化により Akt が FoxO の核内移行を抑制することで、MuRF1, atrogin-1 の転写が抑制される。

AMPK は、①ATP 消費を最小化するための同化抑制作用、②ATP 産生を刺激するための異化作用活性化、という 2 つの役割を持ち、骨格筋の代謝にも関与している。AMPK は繰り返される筋収縮や運動により活性化される一方で、mTOR を抑制することで筋肥大を抑制する。筋萎縮関連因子抑制と AMPK 活性化は廃用性筋萎縮の治療戦略となる可能性がある。

(3) 高齢者診療において漢方薬は重要な位置を占める。漢方薬は複数の補剤から構成されていて様々な化合物を含むが、それらの性ホルモン様効果や抗炎症効果を示唆する研究もある。

補中益気湯 (TJ-41) は 10 の生薬で構成され、フレイル、易疲労感、食思不振など的高齢者に処方される。TJ-41 に含まれる化合物の 1 つである Ginsenoside Rb1 が androgen receptor (AR) を介して血管石灰化を抑制することを、我々は示した²。ヒトを対象とした研究で、TJ-41 は late-onset hypogonadism の高齢男性の血中遊離テストステロン値を上昇させ、慢性閉塞性肺疾患の高齢者のプレアルブミン増加と血中炎症性サイトカイン低下をもたらした³。牛車腎気丸は老化モデルマウスである SAMP8 の骨格筋において、PGC1 α を介したミトコンドリア活性化作用、Akt 系を介した MuRF1 抑制作用を持ち、骨格筋量を改善させた⁴。

以上より、TJ-41 はアンドロゲン様作用や抗炎症効果を有し、廃用性筋萎縮の改善に有用である可能性がある。しかし TJ-41 やその構成補剤が骨格筋に与える影響を検討した研究は少なく、その作用機序は全く解明が進んでいない。

2. 研究の目的

(1)*In vitro* において筋萎縮細胞モデルに TJ-41 を投与し、筋萎縮抑制効果やその分子メカニズムを検証する。

(2)廃用性筋萎縮モデルマウスに TJ-41 を投与し、骨格筋量、筋力、耐運動能の改善効果、炎症抑制効果の有無を検討し、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)マウスの筋芽細胞である C2C12 細胞を 10%ウシ胎児血清を含む DMEM で増殖させた。80-90% confluent に達してから培地を 2%ウマ血清を含む DMEM に交換して 4 日間培養することで筋管に分化させ、その後の実験に用いた。C2C12 筋管を無血清培地で 24 時間培養したものを *in vitro* における骨格筋萎縮モデルとした。

1g の TJ-41 を、10mL の水、エタノールまたは DMSO に入れて超音波で破砕して成分を抽出し、遠心分離を行って上清を採取した。これらの抽出物を溶媒で希釈した上で C2C12 筋管に投与した。C2C12 筋管に対して F-actin の蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で撮像し、Image J により筋管径を定量した。

(2)後肢懸垂モデルマウスはマウスの尾を吊り上げることによってマウスの後肢が床につかない状態を維持し、後肢に廃用性筋萎縮を生じさせる。マウスの尾全体を医療用テープで包み、テープの遠位端にクリップを付け、クリップをスイベル金具につけた。スイベル金具はケージの上部のクロスバーに取り付けられて、マウスが後肢を挙上したままケージの中を自由に動き餌や水にアクセスできるようにした。

実験には C57BL6J のオスマウスを使用した。TJ-41 1g を水 10mL に溶かして超音波で粉砕し、その原液または水で 3/10 に希釈した液をマウスに強制経口投与した。実験後、マウスを二酸化炭素により安楽死させて腓腹筋を回収し、重量測定をおこなった。

In vitro, in vivo ともサンプルにおける遺伝子発現はリアルタイム PCR により定量した。タンパク質量やリン酸化の定量は Western blotting により行った。

本実験は東京大学動物研究倫理委員会に承認され、マウスの苦痛が最小限になるように配慮した。

4. 研究成果

(1)分化 C2C12 筋管を血清除去培地で 24 時間培養したところ、MuRF1 と atrogen-1 の発現は上昇し(Fig. 1)、筋管径は有意に低下した。TJ-41 の水抽出物、エタノール抽出物を投与しても、これらに対する影響は見られなかった。一方 TJ-41 の DMSO 抽出物を加えたところ、MuRF1 の発現は低下しなかったが、atrogen-1 の発現は濃度依存性に有意に低下した (Fig. 1)。さらに血清除去による筋管の低下は、TJ-41 の DMSO 抽出物により有意に抑制された (Fig. 2)。

Western blotting で、TJ-41 投与により Akt, p70, mTOR, AMPK の活性は変化せず、FoxO1 のリン酸化も変化しなかった。

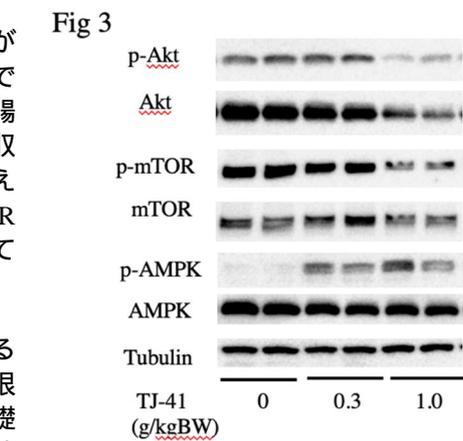
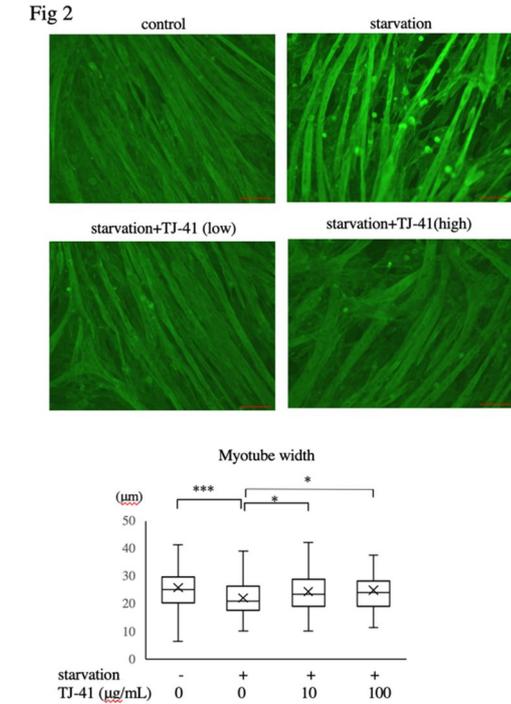
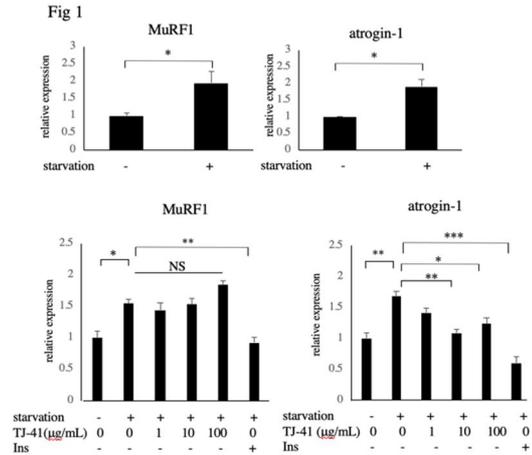
(2)C57BL/6J オスマウス 11 週齢に vehicle (水)、低用量 TJ-41 (0.3g/kg 体重)または高用量 TJ-41 (1.0g/kg 体重)を 21 日間投与し、腓腹筋のタンパクを Western blotting で解析した。Akt と mTOR の活性は低用量 TJ-41 では変化しなかったが、高用量 TJ-41 で低下した。AMPK の活性は、低用量、高用量 TJ-41 のいずれでも増加した(Fig. 3)。マウスに後肢懸垂を行い腓腹筋の筋重量と筋萎縮関連因子の発現の経過を検討した。MuRF1, atrogen-1 はいずれも懸垂開始の 24 時間後にピークとなり、その後は 14 日間で元のレベルに低下した。筋重量は 14 日目まで単調に減少した。

(3)これを踏まえ、筋萎縮関連因子の定量は後肢懸垂開始の 24 時間後、筋重量は 14 日後に測定した。vehicle または TJ-41 の投与は後肢懸垂開始日の 7 日前から安楽死の前日までとした。マウスの体重は後肢懸垂により減少し、TJ-41 投与による有意な改善は見られなかった。また後肢懸垂や TJ-41 投与により餌の摂取量の有意な変化は認めなかった。後肢懸垂を行っていない群では、TJ-41 により腓腹筋における MuRF1, atrogen-1 の発現が低下した。後肢懸垂マウスにおいて、TJ-41 投与により MuRF1 は低下しなかったが、atrogen-1 は高用量の TJ-41 投与により有意な低下を認めた。後肢懸垂を行う行わないに関わらず、TJ-41 投与により腓腹筋重量は増加した(Fig. 4)。

(4)以上より、TJ-41 は骨格筋において筋萎縮関連因子の抑制効果、AMPK 活性化作用を発揮することで筋肉量増加作用を持ち、廃用をはじめとする筋萎縮関連が関与する病態の予防に有効である可能性が示唆された。

In vitro における TJ-41 の atrogen-1 抑制作用はタンパク合成系や FoxO1 に非依存性あることから、NFκB などの別の経路を介したものである可能性が示唆された。また、AMPK の活性化が *in vivo* のみで観察されたことから、TJ-41 に含まれる化合物は腸内細菌叢で代謝を受けて変化し、それが体内に吸収されることで AMPK 活性化作用を発揮すると考えられた。*In vivo* で AMPK 活性化により Akt, mTOR は抑制されたが、TJ-41 の炎症抑制作用を介して atrogen-1 の発現が低下したと考えられた。

(5)本研究結果は、廃用性筋萎縮やフレイルを有する高齢者に対する TJ-41 の有効性を示唆し、処方の根拠となりうる。TJ-41 をはじめとする漢方薬の基礎的研究により、高齢者の漢方薬使用のエビデンス確

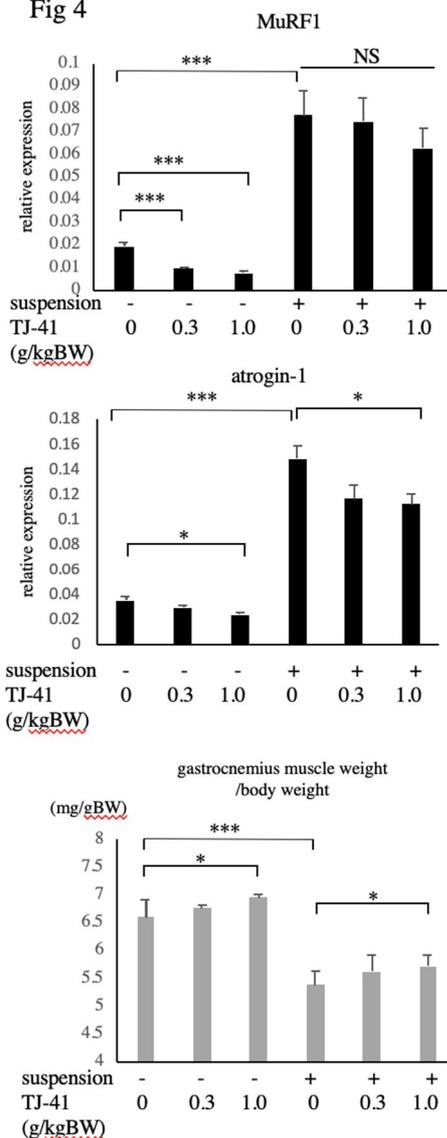


立の一助となることが期待される。

<引用文献>

- ¹ Yakabe M et al. Biomedical Sciences 2015; 1: 10-17
- ² Nanao-Hamai M et al. Eur J Pharmacol 2019;859:172546
- ³ Tatsumi K et al. J Am Geriatr Soc 2009;57:169-170.
- ⁴ Kishida Y et al. Phytomedicine 2015;22:16-22

Fig 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yakabe Mitsutaka, Hosoi Tatsuya, Akishita Masahiro, Ogawa Sumito	4. 巻 38
2. 論文標題 Updated concept of sarcopenia based on muscle?bone relationship	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 7~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-019-01048-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yakabe Mitsutaka, Kojima Taro, Okumura Taisaku, Takiyama Shinya, Umeda Kameyama Yumi, Akishita Masahiro, Ogawa Sumito	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum free testosterone levels are positively correlated with skeletal muscle mass in older women aged over 75 years	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 460~461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.13642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yakabe Mitsutaka, Ogawa Sumito, Ota Hidetaka, Iijima Katsuya, Eto Masato, Ouchi Yasuyoshi, Akishita Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0191318~0191318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0191318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢可部満隆、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 後肢懸垂モデルマウスの骨格筋萎縮に対する補中益気湯の効果の検討
3. 学会等名 第61回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢可部満隆
2. 発表標題 (シンポジウム4 筋と他臓器との連関) : サルコペニアからダイナペニアの時代へ
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会, 東京 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋下 雅弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 232
3. 書名 シリーズ超高齢社会のデザイン 老化と老年病	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------