

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17975

研究課題名(和文) 高血圧症に関連するサルコペニア治療の新規分子レナラーゼの網羅的開発研究

研究課題名(英文) Comprehensive development study of novel molecular renalase for sarcopenia treatment related to hypertension.

研究代表者

吉田 保子 (YOSHIDA, Yasuko)

つくば国際大学・医療保健学部・講師(移行)

研究者番号：60759851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアのリスクと塩分摂取量との関連を調べるため、ボランティア114名の随時尿より塩分摂取量を算定し、比較した結果、高塩分摂取群は体重、体格指数、体脂肪率、また血中のIL-6、中性脂肪、インスリン、ALT濃度が有意に増加し、握力/体重、長座体前屈(柔軟性)、30秒椅子立ち上がりテストが有意に低下した。マウス対象研究では骨格筋内の遺伝子発現解析により様々な遺伝子発現が変化していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは、骨格筋の筋量・筋力・瞬発力などを低下させ、高齢者のADLを著しく損ない、フレイルや認知症の誘因となり、要介護状態となる大きな社会問題である。最近、高血圧患者において下腿骨格筋にNa⁺が蓄積し、骨格筋がすることが報告され、本研究においても高塩分摂取により骨格筋の遺伝子発現が変化し、ヒト研究において筋力等の有意な変化を示すことができた。日本人の食塩平均摂取量は男性11.0g/日、女性9.3g/日と世界保健機関の推奨している5g/日よりかなり多い。本研究により、塩分摂取とサルコペニアリスクの可能性を示すことができた。適切な塩分摂取量はサルコペニアの予防につながる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the relationship between sarcopenia risk and salt intake, a human study compared the salt intake calculated from the occasional urine of 114 healthy male and female volunteers, and as a result, the high salt intake group was compared with the low salt intake group. In comparison, body weight, body weight index, body fat percentage, and blood IL-6, triglyceride, insulin, and ALT levels increased significantly, grip / body weight, long-seat anteflexion (flexibility), 30-second chair. The rise test was significantly reduced. In a mouse study, 10-month-old mice were fed a diet containing 8% NaCl for 4 weeks to examine changes in gene expression in skeletal muscle. As a result, it was found that various gene expressions were changed by gene expression analysis using next-generation sequencing.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：サルコペニア レナラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)研究の背景

我が国では急速に高齢化が進展しており、平成 28 年の高齢化率 (65 歳以上人口割合) は 27.3%、75 歳以上の人口割合は 13.3% となっている [平成 29 年版高齢社会白書より]。超高齢社会における問題である要介護状態になる原因として「認知症」、「転倒」そして「フレイル」があげられる。そしてまた、フレイルの原因の一つに「サルコペニア」が存在する。サルコペニアは筋肉量の減少と筋力の低下を特徴とし、身体機能障害や生活の質の低下などを伴う症候群であるが、原因はいまだ全て解明されているわけではない。

(2)食塩感受性高血圧と骨格筋

世界保健機関 (WHO) の推奨している食塩摂取量は 5g/日であるが、日本人の平均摂取量は男性 11.0g/日、女性 9.3g/日と、WHO 推奨量の 2 倍程度と摂取量が多い。

食塩感受性高血圧とは、食塩摂取により惹起される本態性高血圧である。腎臓におけるメカニズムとしては、食塩摂取によって亢進される交感神経活性により活性化した $\beta 2$ アドレナリン作動性受容体による刺激が、ヒストンのアセチル化を引き起こし、塩分排泄関連遺伝子「WNK4 遺伝子」の発現を抑制する。WNK4 遺伝子は腎臓の遠位尿細管の $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体 (NCC) 活性を抑制し、ナトリウム排泄を促すが、WNK4 遺伝子が抑制されることでナトリウムは体内に貯留し、血圧が上昇すると考えられている。近年このナトリウムの貯留が骨格筋においてもおこり、また年齢依存的な増加も報告された [Hypertension. 2013 Mar;61(3):635-40]。

一方、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC) が阻害されることにより、骨格筋の形成、肥大が抑制され、またこの抑制作用が運動により改善されることも近年報告された [Scientific Reports 2017]。以前から哺乳類の骨格筋では、特にクロールイオンの膜輸送機能が加齢や腎不全によって低下することや、運動により増加することが知られているが、それを司る骨格筋 NKCC1 の骨格筋細胞の分化や肥大における役割はこれまで知られていなかった。これらのことより、食塩感受性高血圧と骨格筋、そしてサルコペニアが連携する可能性が示唆される。

(3)レナラーゼと骨格筋

レナラーゼ (renalase) は 2005 年に発見された FAD (flavin adenine dinucleotide) 依存性モノアミンオキシダーゼ (MAO) である [J Clin Invest 2005;115:1275-80]。主に腎臓から分泌されカテコールアミンによる反応性を抑制する。すなわち、その MAO 活性により循環カテコールアミンの代謝亢進を介して交感神経系由来の興奮性を低下させ心機能を制御・全身血圧を低下させる。従って、レナラーゼ欠損または分泌量の低下は、循環カテコールアミンレベルの上昇を維持し、高血圧を惹起する。実際、レナラーゼ遺伝子 (RNLS) ノックアウトマウスでは著明な血中カテコールアミン増加に伴い血圧が上昇し、同マウスにレナラーゼを静注することで著明に血圧が低下する [Kidney Int 2011;79:853-60]。したがってヒトの高血圧発症においても、レナラーゼは重要な因子であることが示唆される。さらに、レナラーゼは運動負荷により増加することを以前報告した。 [The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine; 2017; VOL. 6, NO. 3]。そして、骨格筋にカテコールアミン添加を添加するとレナラーゼの発現が増加することも報告している。 [International Journal of Analytical Bio-Science. Volume 9, Issue 4, 2017]。

2. 研究の目的

日本人の塩分摂取量が多い。そしてその塩分 (Na) が骨格筋に貯留し、骨格筋の形成、肥大が抑制される可能性があることより高塩分摂取がサルコペニアリスクに関連するのではないかと考えた。また食塩感受性高血圧の観点から血圧制御に関連する新規酵素であるレナラーゼの血中濃度もサルコペニアリスクに関連するのではないかと考えた。そこで、塩分摂取と骨格筋の関連を調査することにより、サルコペニアを予防、またはサルコペニアの創薬ターゲットになることを検討していく上での基礎研究となることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト対象研究

健康な成人ボランティア (n = 122、年齢 [標準偏差 (SD)]: 56.3 (12.3) 歳) から、腎機能はナトリウム摂取とレナラーゼレベルに関与しているため、推定糸球体濾過量が $90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ 以下と検査値が正常範囲でない参加者を除外し、114 人の参加者のデータが分析された。まず、スポット尿検査を使用して推定塩分摂取量を計算し、参加者を平均推定塩分摂取量が 9.37 g/日で 2 群に分け、塩分摂取量が平均より少ない参加者を「減塩分群」、多い参加者を「高塩分群」とした。さらに全体の平均年齢 [56.3 (12.3)] で「若年群」と「高齢群」年齢層別の分析も行った。したがって、参加者は 4 つのグループ (「若年低塩分群」、「若年高塩分群」、「高齢低塩分群」、「高齢高塩分群」) に分けられ、血液検査の結果、身体測定、および身体測定の評価を行った。

(2)マウス対象研究

C57BL/6 の雄 9 週齢 Wild-Type のマウス 10 匹、renalase-Knockout マウス 10 匹を一般的な 0.3%NaCl 餌を摂取させるマウス (コントロール) と 8%NaCl 高食塩餌を摂取させるマウス (高塩分摂取) を 2 週間飼育後、腎臓と骨格筋 (ヒラメ筋: 赤筋、足底筋、腓腹筋: 白筋等) を採取し、遺伝子発現の差異を次世代シーケンサー (NGS) による RNA シーケンス分析を実施した。

4. 研究成果

(1) ヒト対象研究【減塩分群と高塩分群の2群比較】

「減塩分群」と「高塩分群」の2群比較の結果、性別比、年齢、身長に有意差なかったが、下記の項目に有意差が見られた。血圧の収縮期血圧 (SBP) と拡張期血圧 (DBP) の両方。体格については体重、ボディマス指数 (BMI)、体脂肪率 (BFP)。筋力については、握力/体重 (HGS/BW)。骨格筋機能については体前屈 (Flex)、30秒椅子立ち上がりテスト (30CS)。血液検査項目についてはインターロイキン6 (IL-6)、中性脂肪 (TG)、インスリン、およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) であった。

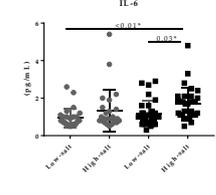
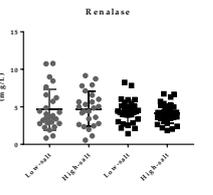
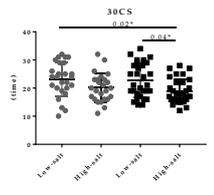
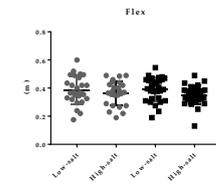
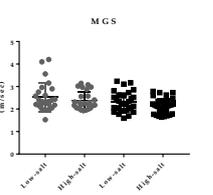
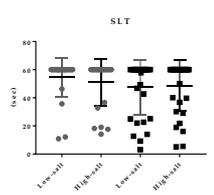
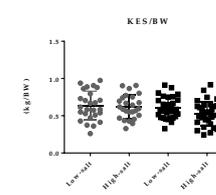
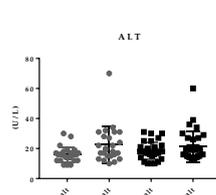
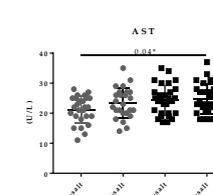
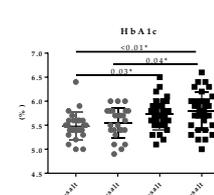
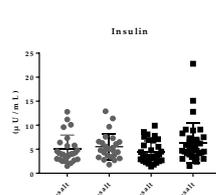
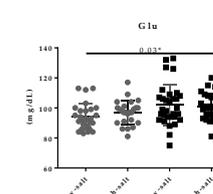
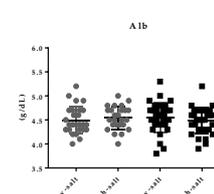
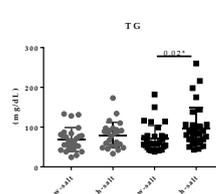
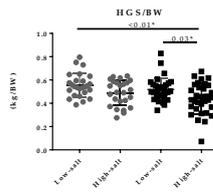
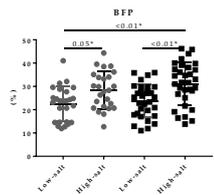
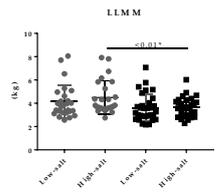
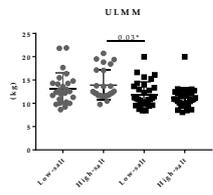
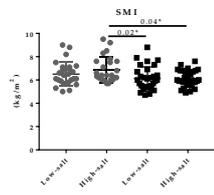
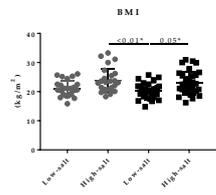
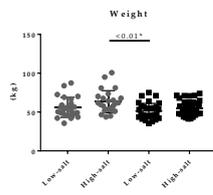
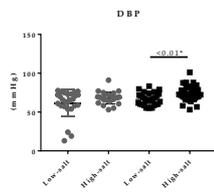
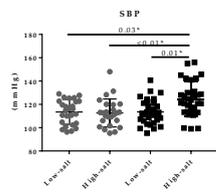
次に推定食塩摂取量とサルコペニア関連パラメータの相関を表1に示す。相関係数は、ピアソン相関係数、スピアマン相関係数 [§] を示した。*: P < 0.05 である。サルコペニア関連パラメータは、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP)、BMI、骨格筋量指数 (SMI)、上肢の筋肉量 (ULMM)、下肢の筋肉量 (LLMM)、BFP、HGS / BW、膝伸筋筋力 (KES)、片足立脚時間 (SLT)、最大歩行速度 (MGS)、Flex、30CS、IL-6、尿素窒素 (UN)、シスタチンC (CysC)、トリグリセリド (TG)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glu)、グリコヘモグロビン (HbA1c)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、ALT である。結果として SBP、体重、BMI、SMI、ULMM、BFP、HGS/BW、Flex、30CS、IL-6、TG、インスリン、および ALT に有意差があった。そして SBP、体重、SMI、ULMM、HGS/BW、Flex、30CS、IL-6、TG、インスリン、および ALT は弱い相関が、BMI と BFP に中程度の相関がみられた。

表1 推定塩分摂取量とサルコペニア関連パラメータとの相関

	Correlation coefficient	
	p value	r value
Age (y) [§]	0.54	-
SBP (mmHg) [§]	0.03*	0.21
DBP (mmHg) [§]	0.07	-
Height (m) [§]	0.74	-
Weight (kg) [§]	<0.01*	0.39
BMI (kg/m ²) [§]	<0.01*	0.49
SMI (kg/m ²) [§]	0.03*	0.21
ULMM (kg) [§]	0.01*	0.24
LLMM (kg) [§]	0.42	
BFP (%)	<0.01*	0.49
HGS/BW (kg/BW)	<0.01*	-0.38
KES/BW (kg/BW)	0.14	-
SLT (sec) [§]	0.46	-
MGS (m/sec) [§]	0.24	-
Flex (m)	0.03*	-0.20
30CS (time) [§]	<0.01*	-0.32
Renalase (mg/L) [§]	0.67	-
IL-6 (pg/mL) [§]	<0.01*	0.31
UN (mg/dL)	0.25	-
CysC (mg/L) [§]	0.15	-
TG (mg/dL) [§]	<0.01	0.34
Alb (g/dL)	0.67	-
Glu (mg/dL) [§]	0.11	-
Insulin (μU/mL) [§]	<0.01*	0.27
HbA1c (%)	0.12	-
AST (U/L)	0.51	-
ALT (U/L) [§]	0.02*	0.21

(2) ヒト対象研究【若年低塩分群、若年高塩分群、高齢低塩分群、高齢高塩分群の4群比較】

「若年低塩分群」、「若年高塩分群」、「高齢低塩分群」、「高齢高塩分群」の4群比較を一元配置分散分析 (ANOVA)、クラスカル・ウォリス検定で実施した結果、SBP、DBP、体重、BMI、SMI、ULMM、LLMM、BFP、HGS/BW、30CS、IL-6、UN、TG、Glu、HbA1c、および AST で有意差あった。Post hoc test で有意差があったサルコペニア関連パラメータの p 値を図1に示した。「若年群」と「高齢群」の年齢で層別化すると、「高齢群」でのみ減塩分群と高塩分群の間で SPB、DBP、BMI、HGS/BW、30CS、IL-6、TG に有意差があった。BFP は、「若年群」と「高齢群」の両方で減塩分群と高塩分群で有意差があった。体重、SMI、ULMM、LLMM、UN、Glu、HbA1c、AST は、「若年群」と「高齢群」間で有意に異なっていた。結果として、塩分の過剰摂取とレナラーゼの関連は本研究においては不明であったが、サルコペニアリスクとの関連可能性が考えられた。



● Younger
■ Older

(2) マウス対象研究

Wild-Type と renalase-Knockout マウスによる骨格筋内のレナラーゼの遺伝子発現量は図 2 のとおり有意差があることを確認した。まず握力を測定したが握力には有意な差は見られなかった。また各筋肉の質重量に有意な差はみられなかった。

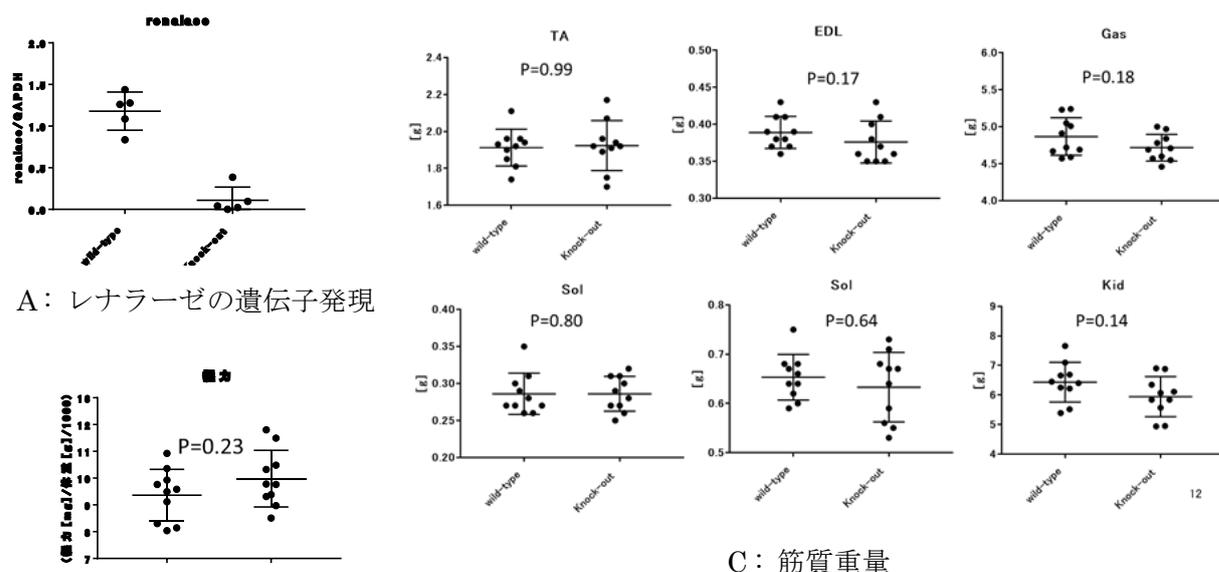


図 2 マウス対象研究

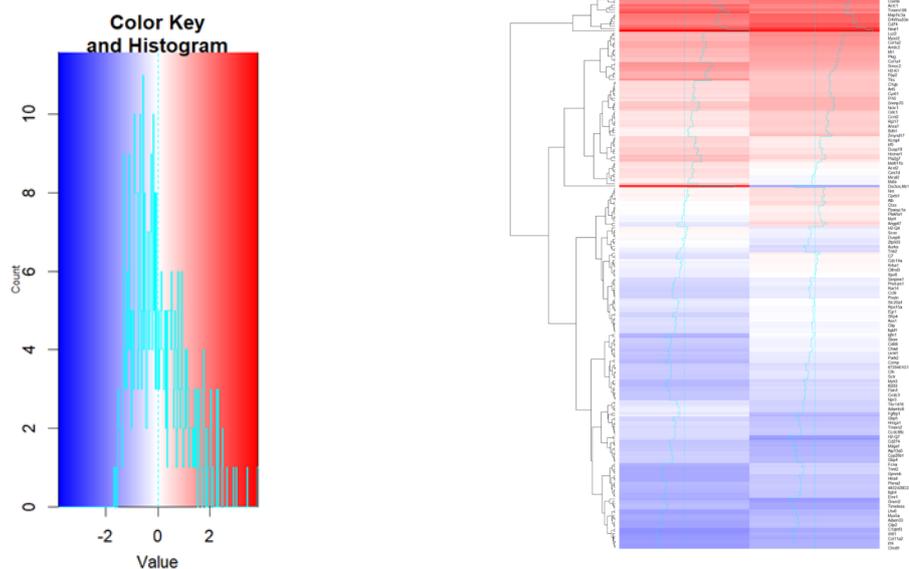


図 3 次世代シーケンサー

次に次世代シーケンサー (NGS) による網羅的解析 (図 3) を実施した結果。複数の遺伝子において発現に差が見られた。特に MYH4 myosin heavy chain の 1.4.6 での差異がみられ骨格筋の速筋と遅筋の割合の変化の可能性が見られた。本研究は 9 週齢における若年のマウスでの実験であった。さらに、高塩分摂取とサルコペニアリスクとの関連についてはヒト対象実験の経験を踏まえて老年マウスによる分析を今後行う予定である。

<引用文献>

- ① Yasuko Yoshida, Keisei Kosaki, Takehito Sugawara, Masahiro Matsui, Masaki Yoshioka, Kai Aoki, Tomoaki Kuji, Risuke Mizuno, Makoto Kuro-o, Kunihiro Yamagata, Seiji Maeda and Kazuhiro Takekoshi, High Salt Diet Impacts the Risk of Sarcopenia Associated with Reduction of Skeletal Muscle Performance in the Japanese population, *Nutrients*, 2020 Nov 12;12(11):3474. doi: 10.3390/nu12113474
- ② 吉田 保子、最先端医療の今「高塩食はサルコペニアの高リスク」(株)ニューサイエンス社、『Medical Science Digest』2020 年 8 月号

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshida Yasuko, Kosaki Keisei, Sugasawa Takehito, Matsui Masahiro, Yoshioka Masaki, Aoki Kai, Kuji Tomoaki, Mizuno Risuke, Kuro-o Makoto, Yamagata Kunihiro, Maeda Seiji, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 High Salt Diet Impacts the Risk of Sarcopenia Associated with Reduction of Skeletal Muscle Performance in the Japanese Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3474 ~ 3474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12113474	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田保子
2. 発表標題 サルコペニアのオートファジーとレナラーゼ酵素の関与について
3. 学会等名 一般社団法人 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田保子
2. 発表標題 高塩食によるサルコペニアのリスクの増加
3. 学会等名 日本サルコペニア・フレイル学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap

https://researchmap.jp/_YasukoYoshida

つくば国際大学 教員紹介

<https://www.ktt.ac.jp/tiu/disclosure/faculty-hs/mt/yoshida-mt.pdf>

・吉田 保子、最先端医療の今「高塩食はサルコペニアの高リスク」(株)ニューサイエンス社、『Medical Science Digest』2020年8月号

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