

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18027

研究課題名(和文) テリパラチドの筋肉脂肪変性に対する抑制効果の解明

研究課題名(英文) Exogenous parathyroid hormone attenuates ovariectomy-induced skeletal muscle weakness in vivo

研究代表者

藤巻 太郎 (Fujimaki, Taro)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：70836155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスに骨粗鬆症薬であるテリパラチド(PTH)を20週間投与した。投与後運動能力を測定し骨格筋も採取し筋肉の変化を評価した。また、筋芽細胞にPTH投与することでの細胞の増殖、遊走、分化、脂肪化を評価した。PTH投与により筋力低下は改善し、運動による乳酸値上昇が抑制された。また卵巣摘出マウスで起こる骨格筋の線維変化が改善し、筋内の脂肪滴の増加を抑制された。筋芽細胞においてPTHは増殖、遊走、分化を促進させ、脂肪滴分泌を減少させた。PTHは骨だけでなく、筋肉の機能を調節する因子である可能性があり、筋萎縮、機能障害の治療のための有望で新しい戦略の可能性はある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会により筋量・骨量の低下が誘因となる転倒や骨折の頻度は増加し、これにより引き起こされる健康寿命低下の予防が社会的喫緊の課題である。これまで骨粗鬆症薬であるテリパラチドの骨格筋に対する役割に着目した研究はほとんどない。今回、我々はテリパラチドが閉経後骨粗鬆症マウスモデルの運動能力の低下を改善させ、骨格筋線維の変化や筋内脂肪滴増加を抑制させることを確認し、テリパラチドの骨格筋に対する調整因子になりうる可能性について示した。このメカニズムが解明されることで筋力低下・身体機能低下の予防の一助となり、将来的には、効果的なりハビリも可能となり健康寿命延伸につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We administered the osteoporosis drug teriparatide (PTH) to the ovariectomized mice, which is a postmenopausal model for 20 weeks, analyzed their exercise performance and changes in skeletal muscle. In addition, we investigated administration of PTH to myoblasts, proliferation, migration, differentiation, and fat accumulation. Administration of PTH to postmenopausal model mice improved muscle weakness and suppressed the increase in lactate level due to exercise. In addition, the fiber changes in skeletal muscle that occur in postmenopausal model mice were improved, and the increase in fat in the muscle was suppressed. In myoblasts, Administration of PTH enhanced proliferation, migration, and differentiation and reduced lipid droplet secretion. Administration PTH may be a factor that regulates the function of muscle as well as bone, and may be a promising new strategy for the treatment of muscle atrophy and dysfunction.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨格筋 テリパラチド OVX NADH 筋肉脂肪変性 Wntシグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会となったわが国では、単に生存寿命を延長するだけでなく健康寿命の延伸が求められており、健康寿命の阻害要因である運動器障害を予防することが重要な課題である。骨粗鬆症は高齢者の罹患率が高く、死亡率にも関連し、大きな社会経済的負担を課すとされる。骨と筋肉は互いに影響しあい、加齢、性ホルモンの低下、遺伝的素因など共通の要因から影響を受けることが報告されている。閉経後の骨粗鬆症モデルとして用いられる卵巣摘出マウス(OVX)は、骨格筋の筋重量低下や筋線維の萎縮、酸化的線維(遅筋、赤筋)の割合が減少し解糖系線維(速筋、白筋)の割合が上昇する。そして筋肉内に脂肪滴の沈着を示すことも報告され、骨だけでなく筋肉への影響を及ぼす例としても報告されている。

テリパラチドはヒト副甲状腺ホルモン(PTH)1-34の合成形態であり、骨折のリスクが高い患者の骨粗鬆症治療で広く使用されている。PTH受容体は骨だけでなく心血管系の内皮細胞や平滑筋細胞に存在することや*in vitro*でも筋細胞にPTH受容体が発現し幹細胞から筋芽細胞への誘導にテリパラチドが関与することが報告されている。テリパラチドの骨形成促進作用のメカニズムの1つとして、Wnt/ $\beta$ -catenin経路を阻害し骨形成抑制を引き起こすスクレロスタチンの作用をテリパラチドが抑制するとされている。このWnt/ $\beta$ -catenin経路は骨格筋の衛星細胞数の調整にも関与するとされる。このように筋肉におけるPTH受容体の存在やWnt/ $\beta$ -catenin経路の関連が確認されている中、テリパラチドの骨格筋への影響について評価を行った報告はほとんど見られない。

我々は加齢に伴う骨格筋の萎縮、脂肪変性に注目し、卵巣摘出マウスを用いテリパラチドの骨格筋への作用を明らかにすることで、高齢化社会における筋肉の老化を抑制する効果へ発展させることを最終的な臨床的目標としている。

### 2. 研究の目的

閉経後骨粗鬆症マウスモデルを用い、テリパラチドを投与することによる筋線維萎縮や脂肪化に対する影響、また運動機能への効果について評価を行うこと、同時に*In vitro*に筋芽細胞に対しテリパラチドを投与することに対する効果やWnt/ $\beta$ -catenin経路との関連についても検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣摘出マウス(OVXマウス)に対するテリパラチドの効果

閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウス(OVX)を使用した。偽手術群(Sham)、OVX、OVX PTHにそれぞれ20匹に3群に分け、PTH非投与群には0.1% BSA inPBS、PTH投与群にはPTH80  $\mu$ g/kgをそれぞれ週3回、20週間投与した。投与終了後、運動能力(握力、トレッドミルテスト、運動後血中乳酸値)を測定し、運動能力測定後に骨格筋として前脛骨筋を採取した。前脛骨筋からは、PTH受容体の発現の確認(IF、WB)、筋線維径(ImageJ)、筋線維のタイプ(NADH-TR染色)、脂肪滴(Oil red O染色)を評価した。

#### (2) テリパラチドの筋芽細胞へ与える効果、Wnt/ $\beta$ -catenin経路との関与

筋芽細胞株であるC2C12、G8を使用し、PTH受容体の発現を評価した(IF、WB)。C2C12にテリパラチドを投与し、増殖能(WST)、遊走能(Migration assay)の変化、そして筋衛星細胞から筋線維へと分化する際に発現される分化マーカーを測定することで分化能(WB)の評価も行った。C2C12を脂肪分化培地(MDI)で培養させることで脂肪分化されるモデルを使用し、テリパラチド投与による脂肪化に対する抑制効果を顕鏡下に評価した(Oil red O染色)。それに対し、筋芽細胞におけるテリパラチドの効果がWnt/ $\beta$ -catenin経路と関与するのかが検討するため、Wnt/ $\beta$ -catenin抗体(XAV939)を用い評価した(WST、Migration assay、Oil red O染色)。

### 4. 研究成果

(1) Sham、OVX、OVX PTHの3群に分け、運動能力(握力、走行最高速度、運動後血中乳酸濃度)を測定した。Shamと比較しOVXで握力、走行可能速度が低く、血中乳酸濃度が高くなった。テリパラチド投与することによりOVXで引き起こされた運動能力の変化が改善された(図1)。運動能力測定後に、前脛骨筋を採取し、PTH受容体の発現を確認した(図2)。筋線維径、筋線維のタイプの比率の変化を測定するためにNADH-TR染色を行った。NADH-TR染色はミトコンドリアが存在すると多く染まる傾向にあり、クエン酸回路と関与するミトコンドリアの多い酸化的線維で強く染まる。NADH-TR染色により細分化された筋線維は、酸化的線維(A、D/X)と解糖系線維(B)に大別される。それぞれのタイプの線維径(cross sectional area: CSA)をImageJで計測した。OVXにおいてすべてのタイプで断面積が低下し、テリパラチド投与することで改善を示した。また、Shamと比較しOVXで酸化的線維の比率が減少したが、テリパラチドを投与す

ることにより改善を示した(図3)。筋内の脂肪滴数は、NADH-TR染色で細分化したそれぞれの筋線維においてShamと比較し、OVXの筋細胞内の脂質含有量は増加したが、テリパラドを投与することにより減少を示した(図4)。

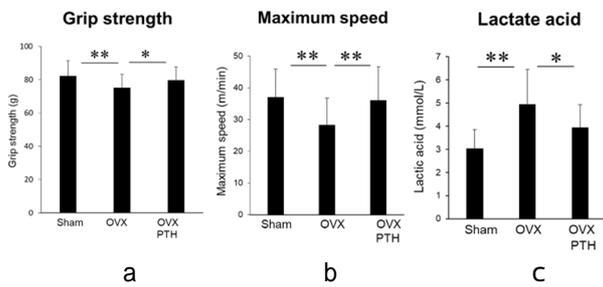


図1. 運動能力 (a. 握力、b. 走行最高速度、c. 血中乳酸濃度)

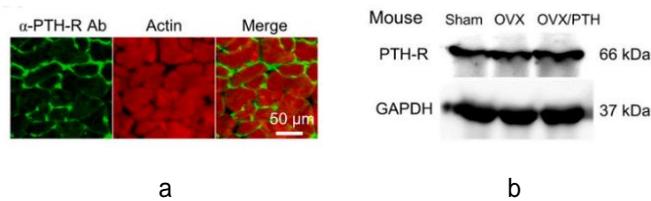


図2. 筋線維におけるPTH受容体発現 (a. IF、b. WB)

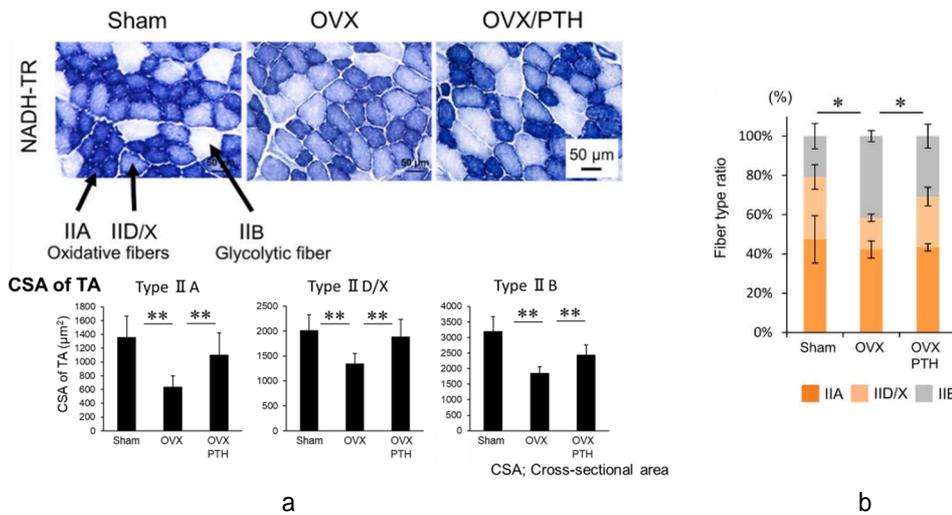


図3. NADH-TR染色により細分化された筋線維 (a. 線維径、b. 酸化的線維、解糖系線維の比率)

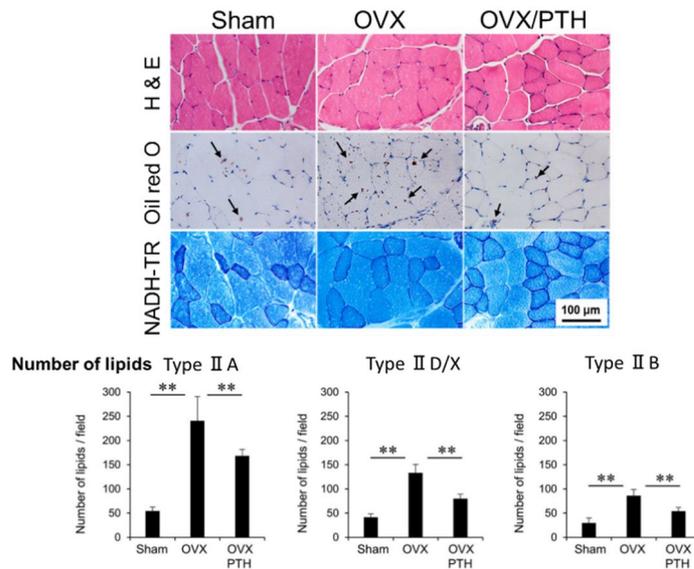


図4. 筋内脂肪滴数

(2) 筋芽細胞において PTH 受容体の発現を IF (C2C12)、WB (C2C12, G8) で確認した (図 5)。また、C2C12 にテリパラチドを投与することにより増殖能、遊走能、分化能が促進された (図 6)。C2C12 を脂肪分化培地 (MDI) で培養することで脂肪滴が増殖し、テリパラチド投与により脂肪滴分泌量が減少した (図 7)。Wnt/ $\beta$ -catenin 抗体である XAV939 を投与することにより、テリパラチドによる増殖能、遊走能促進効果や筋脂肪化抑制効果が抑制された (図 8)。

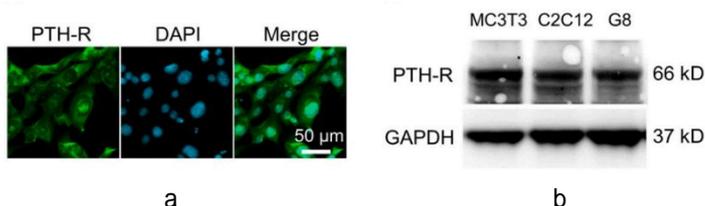


図 5. 筋芽細胞における PTH 受容体の発現 (a. IF : C2C12、b. WB : C2C12, G8)

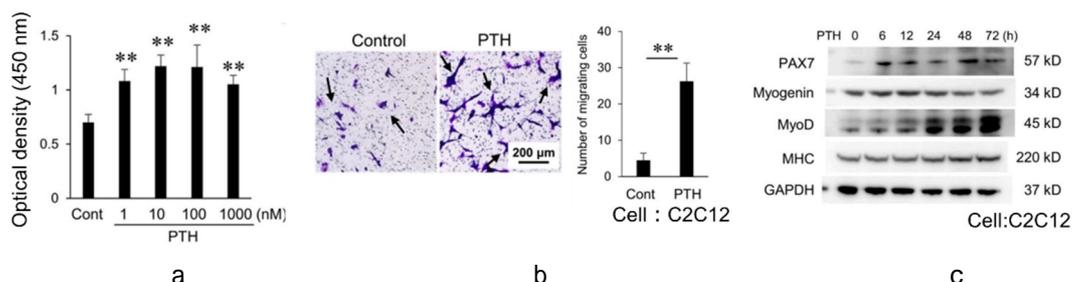


図 6. C2C12 の増殖能、遊走能、分化能 (a.WST、b.Migration assay、c.WB)

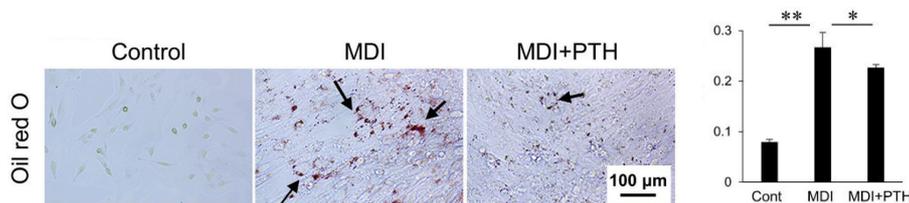


図 7. MDI 培地における C2C12 の脂肪化

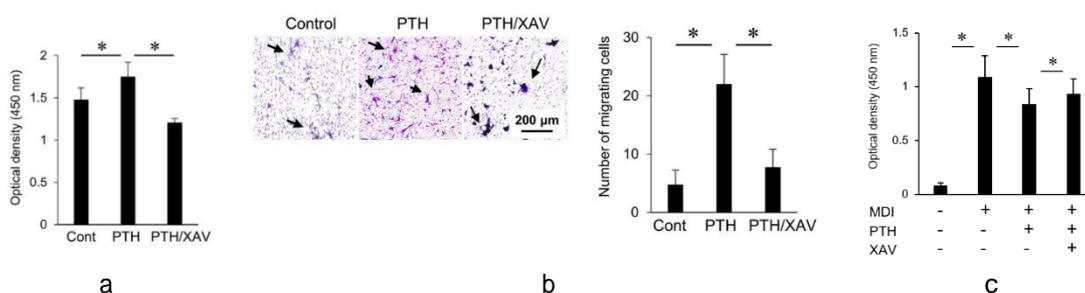


図 8. Wnt/ $\beta$ -catenin 抗体 (XAV939) による PTH の作用に対する影響 (a.WST、b.Migration assay、c.Oil red O 染色)

以上の結果より、PTH 受容体は筋線維と筋芽細胞株で発現し、卵巣摘出マウスにテリパラチドを投与すると、筋力低下が大幅に改善され、運動による乳酸値が低下した。また、筋内のテリパラチドと Wnt/ $\beta$ -catenin 経路との関係は、細胞増殖能、遊走能、分化、そして脂質分泌を調節する可能性があり、テリパラチドは骨格筋機能の調節する新しい因子である可能性が示唆された。高齢者へのテリパラチド投与は、骨粗鬆症治療だけでなく、筋萎縮、機能障害の治療に対する有望で新しい戦略となる可能性があると考えられる。

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 Taro Fujimaki, Takashi Ando, Takanori Hata, Yoshihiro Takayama, Tetsuro Ohba, Jiro Ichikawa, Yoshihisa Takiyama, Rikito Tatsuno, Katsuhiko Koyama, Hirotaka Haro	4. 巻 151
2. 論文標題 Exogenous parathyroid hormone attenuates ovariectomy-induced skeletal muscle weakness in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2021.116029	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤巻太郎、安藤隆、羽田貴礼、高山義裕、大場哲郎、市川二郎、瀧山嘉久、辰野力人、小山勝弘、波呂浩孝
2. 発表標題 卵巣摘出による筋肉変性に対する副甲状腺ホルモン製剤の効果
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	安藤 隆  (Ando Takashi)		
研究協力者	羽田 貴礼  (Hata Takanori)		
研究協力者	高山 義裕  (Takayama Yoshihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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	大場 哲郎  (Ohba Tetsuro)		
研究協力者	市川 二郎  (Ichikawa Jiro)		
研究協力者	瀧山 嘉久  (Takiyama Yoshihisa)		
研究協力者	辰野 力人  (Tatsuno Rikito)		
研究協力者	小山 勝弘  (Koyama Katsuhiro)		
研究協力者	波呂 浩孝  (Haro Hirotaka)		

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