

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650161

研究課題名（和文）サルコペニアにおける腸内細菌の役割

研究課題名（英文）The role of gut bacterial flora in the development of sarcopenia

研究代表者

永富 良一（NAGATOMI RYOICHI）

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：20208028

研究成果の概要（和文）：サルコペニアには単に骨格筋の廃用性萎縮だけではなく加齢にともなう消化吸收機能や腸内フローラの変化が寄与するという仮説を検証することを目的とした。震災の影響により高齢マウスおよびTLRノックアウトマウスの使用ができなくなったが、腸内細菌の除去が廃用性萎縮からの回復を著しく遅延させることを見いだした。ペプチドグリカンの経口投与は腸内細菌除去による骨格筋の損傷からの回復遅延を防ぐことはできなかった。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify whether sarcopenia associated with ageing depends upon gut function maintained by gut flora, we investigated the effect of antibiotics treatment, by which majority of gut flora was eliminated, on the process of skeletal muscle damage and recovery and the process of skeletal muscle disuse atrophy and its recovery after reloading. We found that bacterial elimination resulted in a significant delay in the process of skeletal muscle recovery from disuse atrophy. In a separate experiment, we found that unlike LPS, peptide glycan (PGN) administration to antibiotics treated mice was not as effective in reversing the delayed recovery from chemically induced muscle damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：体力科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：腸内細菌、筋損傷、腸管平滑筋、骨格筋、LPS、プロテオグリカン、乳酸菌、廃用性萎縮

1. 研究開始当初の背景

- (1) サルコペニアの社会的重要性：高齢者にみられる廃用症候群を構成する重要な症候として筋肉減少症、いわゆるサルコペ

ニアがある。加齢に伴う身体活動量の低下、負荷強度の減弱、高齢期の抑鬱、低栄養あるいは慢性炎症や悪液質、動脈硬化などがその要因としてあげられている。

一方、サルコペニアは身体活動の低下、閉じこもりや転倒骨折リスクの増大を招き、高齢者の生活の質（QOL）の低下に関与し、医療費や介護負担の増大につながる。サルコペニアの評価にはまだ明確な基準はなく、DEXA法や超音波法あるいはインピダンス法を用いた筋量の測定およびさまざまな方法による筋力測定による指標化の試みが進行中である。

- (2) サルコペニアの原因探索の現状：高齢者における身体機能の低下に対してはレジスタンストレーニングなどの運動トレーニングが奏功するが、サルコペニアに陥った高齢者はトレーニング効果が減弱することが報告されている。骨格筋においてトレーニング効果が得られるには骨格筋の損傷とその再生過程が重要である。骨格筋の線維レベルの損傷はトレーニングに限らず日常生活でも起こるので、筋線維損傷の修復不全がサルコペニアの一因になる可能性がある。いわゆるモーターニューロンからの刺激の低下や局所血流の低下の関与が指摘される一方、動物モデルでは、高齢マウスの notch シグナルの低下 (Conboy IM ら, Nature 2008) や再生を阻害するマクロファージサブセットの増加 (Tidball JG ら, J Physiol 2007) が筋損傷からの回復不全につながるおとが示されている。しかしなぜ高齢マウスにおいて notch s シグナルが低下するあるいは筋組織の再生を阻害するマクロファージサブセットが誘導されるのかは明らかになっていない。一方、若年マウスと血管をつなぐパラビオーシスを行うと損傷からの回復が著しく改善することから、液性の因子の関与が推測されている (Conboy IM ら, Nature 2005)。しかし未だその原因因子は明らかになっていない。
- (3) 腸内細菌の認識欠如により腸管機能低下がサルコペニアに関与する可能性：H21-23 にわれわれが取り組んだ研究課題「運動に伴う免疫系の変動のメカニズムとその意義に関する研究」（基盤研究B）においてわれわれは腸管粘膜上皮をストレス時に破綻から守る熱ショック蛋白 70 (HSP70) が腸内細菌の菌体成分リポポリサッカライド (LPS) とストレスホルモンである糖質コルチコイド双方の働きで誘導されており、いずれが書けても誘導が低下することを明らかにした糖質コルチコイドは上皮細胞間のタイトジャンクションを減少させ、腸管内腔の

LPS などの多糖体の粘膜固有層への侵入を許し、LPS は固有層周辺細胞に発現する TLR4 により認識され HSP70 の誘導につながる (Matsuo et al.2009)。腸管の平滑筋は TLR4 を発現する細胞群の一つであり、平滑筋の LPS の認識は腸管の蠕動を直接制御していることを最近明らかにしている (藤田基生ら、日本外科代謝学会 2009 にて発表)。したがってわれわれは腸内細菌との共生が腸管の防御機構だけではなく、機能そのものを制御していると考えに至った。実際に抗生物質を投与して腸内細菌を除去したマウスは筋損傷からの回復が大幅に遅延するが、LPS を投与すると再び回復することを明らかにしている (松生香里ら、日本体力医学会 2009 にて一部発表)。このことから腸管平滑筋に対する腸内細菌の刺激が平滑筋ひいては腸管機能の維持に必要であるという仮説を着想するに至った。本研究課題ではこの仮説を検証し、そのメカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

高齢者に起こる筋肉減少症、いわゆるサルコペニアは廃用症候群の主要な症候である。身体活動の低下、転倒骨折リスクの増大など医療費や介護費用負担の増大に直結している。身体機能の低下した高齢者に対して筋力トレーニングをはじめとする運動処方が行われるが、一部の高齢者すなわちサルコペニアに陥っている高齢者はトレーニングに対する反応が低下しており、未だ有効な解決策は見いだせていない。当初の予定では筋損傷からの回復過程に関係する腸内細菌と腸管組織の相互作用を明らかにする予定であったが、震災の影響により準備していた高齢マウスを失ったことから（遺伝子組み換えマウス以外のマウスの処分）、若年マウスを用いた筋萎縮およびその回復過程に遅延が起こるモデルを確立した上で、予定していた要因およびメカニズムの解析を可能な範囲で実施することにした。

3. 研究の方法、

- (1) 若年マウスによるサルコペニアモデルの作成；片側下肢のギブス固定による筋萎縮を作成、ギブス除去後の骨格筋の回復過程を、抗生物質投与条件と非投与条件で比較を行った。片側の腓腹筋をギブステープで固定し、2 週間飼育した。同時に抗生物質カクテルあるいは水 200ul を毎日 1 週間ゾンデで投与した。2 週後にギブス固定を解除し、同時に再び 1 週間

抗生剤の経口投与を行った。ギブス固定解除3週間後に過剰麻酔による安楽死を経て、摘出した左右腓腹筋の湿重量を測定後、凍結切片を作成し、ラミニンおよび dMHC の二重免疫蛍光染色を行い組織学的に観察を行い、筋線維周囲径の測定を行った。筋線維周囲径は少なくとも4つの異なる切片から無作為に100本の筋線維を選択し、周囲径の測定を行った。対照はギブス固定を行っていない対側の腓腹筋および抗生物質を投与しないマウス群とした。

- (2) 損傷筋回復過程に及ぼす腸内細菌菌体成分のスクリーニング：腸内細菌除去マウス骨格筋にカルディオトキシンを投与し、再生修復が遅延することを確認 (Matsuo et al 2009)。抗生物質投与1週間後に片側の腓腹筋にカルディオトキシンを投与し、損傷からの回復過程を筋湿重量の測定を行い、ラミニンおよび dMHC の二重免疫蛍光染色を行い組織学的に観察し、筋線維周囲径の測定を行った。筋線維周囲径は少なくとも4つの異なる切片から無作為に100本の筋線維を選択し、周囲径の測定を行った (損傷後3, 5, 7, 10, 14日)。対照はカルディオトキシンを投与していない対側の腓腹筋および抗生物質を投与しないマウスとした。同じ条件において LPS, ペプチドグリカン (PGN) を経口投与することにより損傷筋の修復遅延の回復過程が変化するか否かを検討した。PGN については濃度条件の検討を行った (LPS はすでに濃度条件の検討は先行研究において実施している)。菌体多糖体の投与はカルディオトキシン投与による筋損傷直前に経口投与を開始し、毎日ゾンデによる経口投与を行った。

4. 研究成果

- (1) ギブス固定による下腿骨格筋萎縮モデルにおいて、ギブス固定解除後の骨格筋回復過程は筋湿重量およびラミニンの免疫蛍光染色切切片画像から計測した筋線維周囲径いずれにおいても有意に遅延することが明らかになった。ギブス固定を行わない対側の腓腹筋には萎縮はみられず、また抗生剤投与の影響はなかった。当初、給水ボトルに抗生剤を加え、腸内細菌除去の徹底を図ったが、飲水量が減少する結果、体重も減少することがわかったため、給水ボトルへの抗生剤混入は行わないこととした。しかし体重あたりの筋重量で補正すると、体重の減少がみられても抗生剤投与による腸内細菌除去が骨格筋の維持に重要であることがわかった。ギブス固定解除後のいわゆる再荷重において筋損傷が起

る結果筋肥大が起きるのか、あるいは筋線維の成熟プロセスが促進されるのか、あるいはその両方なのかは、今後検討していきたい。ギブス固定モデルは薬物的筋損傷よりも再現性、実験誤差が小さく腸管・骨格筋連関のメカニズムを明らかにするための有用なモデルが確立された。今後このモデルを用いて震災による研究の遅れを取り戻したい。

- (2) 抗生剤投与と同時に菌多糖体 LPS あるいはペプチドグリカンを経口投与することにより、カルディオトキシン局所注射による腓腹筋の損傷からの修復過程の遅延が回復するか否かを検討した。LPS 投与は以前にも確認していたように、筋重量、ラミニンの免疫蛍光染色切切片画像から計測した筋線維周囲径の回復遅延がほとんどなくなることを確認した。ウェスタンブロットでみた dMHC の発現は、通常損傷再生初期のみ発現が増強し、再生筋線維の成熟とともに消退していくが、抗生剤投与により腸内細菌の除去を行うと、dMHC の発現が損傷14日を過ぎても観察される。LPS 投与により dMHC の消退もみられ。LPS が筋線維の成熟プロセスに関与していることが示唆された。一方 PGN は 5~40ug の範囲で投与を行ったが、腸内細菌除去にともなう損傷からの回復プロセスの遅延を回復させるような所見はこの濃度の範囲では得られなかった。先行研究から 40ug/個体/日を越える PGN 投与は腸管機能に障害を来す可能性があり、本研究からは PGN の直接効果はないと判断された。
- (3) Lactobacillus は LPS は持たないが、PGN を細胞壁に持つ細菌群である。ヒトを対象とした先行研究では Probiotics として Lactobacillus の投与を行い、健康や体力におけるメリットを観察している研究があるが、本研究からは PGN の直接効果が関与している可能性は少ないと考えられた。むしろ Lactobacillus の投与による microflora の変化などが重要なかもしれない。
- (4) また本研究で除去される microflora は主に大腸の細菌群である。栄養素吸収の場である小腸には通常細菌群はかなり少ないことから、腸内細菌除去による損傷骨格筋の回復過程の遅延や LPS 投与によるその解除は、栄養吸収のプロセスへの直接的関与によるものではない可能性が高いと考えられた。現に、体重の減少や、非損傷筋あるいはギブス固定しない肢の筋萎縮はみられていないこともその傍証となると考えられる。
- (5) 大腸内の microflora が損傷骨格筋の回復過程に影響を及ぼすこと、特に LPS が

それに関与していることは、LPS の大腸における認識がなんらかの経路や物質を介して、損傷回復のプロセスを修飾しているものと考えられ、現在このプロセスの糸口になるような血中・組織中の蛋白やメディエーターの解析に着手している

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. Kaori Matsuo, Motoo Fujita, Izumi Tabata and Ryoichi Nagatomi: Ingestion of *Lactobacillus casei* facilitates regeneration of skeletal muscle in older adult mouse. International Society of Exercise & Immunology Conference, Oxford, UK. July 12, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永富 良一 (NAGATOMI RYOICHI)
東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号： 20208028

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松生 香里 (MATSUO KAORI)
立命館大学・スポーツ健康科学部・助教
研究者番号： 60513570