

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659379
 研究課題名（和文）サルコペニアモデル動物の開発と成因解明：慢性閉塞性肺疾患モデルマウスを用いた検討
 研究課題名（英文）The establishment of animal model for sarcopenia and clarification of the mechanism of sarcopenia: An investigation using an animal model for chronic obstructive pulmonary diseases
 研究代表者
 楽木 宏実（RAKUGI HIROMI）
 大阪大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20252679

研究成果の概要（和文）：高週齢の慢性閉塞性肺疾患モデルマウス（CD9/CD81ダブルノックアウトマウス（DKO））の骨格筋を中心に検討を行ったところ、ヒラメ筋重量はDKOで対照のC57BL/6Jマウス（B6）より低値であり、長指伸筋重量は両群間で差を認めなかった。両筋の網羅的遺伝子解析により、DKOのヒラメ筋ではアポトーシスや炎症関連の遺伝子発現変化を、長指伸筋では筋タンパク増加に関連する遺伝子発現変化を認めた。DKOでは、筋成分の違いで遺伝子発現パターンが異なることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We performed comparative analyses for phenotypes and molecular mechanisms between aged CD9/CD81 double knockout mice (DKO), an animal model for chronic obstructive pulmonary diseases and C57BL/6J mice (B6). Soleus muscle (SOL) mass was lower in DKO than in B6, however there was no difference in extensor digitorum longus muscle (EDL) mass between DKO and B6. The comprehensive genetic analysis using both muscle revealed the elevation of gene expressions related to apoptosis and inflammation in SOL and the change of gene expressions related to muscle protein synthesis in EDL of DKO. These findings suggest that DKO shows different gene-expression patterns among muscle fiber types.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 内科学一般（含心身医学）

キーワード：老年医学

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の社会問題として、寝たきりを含む重度の要介護者の増加がある。高齢者が寝た切りになる原因として、脳血管障害や認知症、骨折のほか、筋力低下があげられる。単純な廃用性症候群だけでなく、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と総称されるものである。サルコペニアは、まだ定義を含めて疾患概念が定着しておらず、成因も不明な点が多い。研究進歩が緩徐な原因として、サルコペ

ニアに関するモデル動物が確立されていないことが挙げられる。

これまでの研究で、加齢に加え全身性の慢性炎症の存在がサルコペニアを発症させることが報告されており、その慢性全身性炎症症候群として慢性閉塞性肺疾患（COPD）の関与が注目されている。COPDは、心血管疾患と直接関連する高血圧や糖尿病などが減少する一方で増加を辿っている唯一の生活習慣病であり、呼吸筋の疲弊に加え、全身の筋力

低下が認められる。

また誤嚥性肺炎など高齢者に特徴的な疾患では、しばしば抗炎症治療や栄養補充に抵抗性であり、筋肉減弱も著明となる例がみられるが、その機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的の第1は、ヒトのサルコペニアに近いモデル動物を確立することで、第2は、確立したモデルを用いてサルコペニアの発症機序とサルコペニアの予防・治療の標的を解明することである。

第1の点については、慢性炎症における筋肉減弱のモデル、廃用性症候群に相当する筋不動負荷モデル、両者の組み合わせを作成する。慢性炎症モデルとして、2008年に研究分担者である立花らが COPD 合併を発見した tetraspanins CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスを用いる。このマウスは、COPD への炎症の関与や骨粗鬆症の合併などヒト COPD に極めて近く、前実験により骨格筋量の低下も確認している。筋不動負荷は我々が独自に開発した後肢懸垂システムを用いる。第2の点については、特に、骨格筋における炎症性サイトカインや酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常などに着目し解析する。野生型マウスに対する後肢懸垂負荷との比較により、慢性炎症がサルコペニアに与える影響を解明できる。

3. 研究の方法

(1) COPD モデルマウスを用いたサルコペニアモデル

動物の作成

本学呼吸器内科が所有する COPD モデルマウスである、tetraspanins CD9/CD81 ダブルノックアウトマウス (DKO) と、コントロールとして C57BL/6J マウス (B6、オリエンタル酵母社より購入) を用いる。8 週齢において、小動物用 CT 装置 (LCT-200) を用い骨格筋量の測定と、ブドウ糖負荷試験 (GTT) を行う。10 週齢まで飼育した後、後肢懸垂システムを用いて、2 日間非加重負荷を加える群 (HS) と加えない群 (CO) を作成する。この方法により得られた B6-CO、B6-HS、DKO-CO、DKO-HS の 4 群間で、運動耐用量、全身性炎症の程度、組織学的検査、筋表現型、骨格筋内脂肪蓄積の程度、ミトコンドリア含有量を比較するために、以下の項目を検討する：

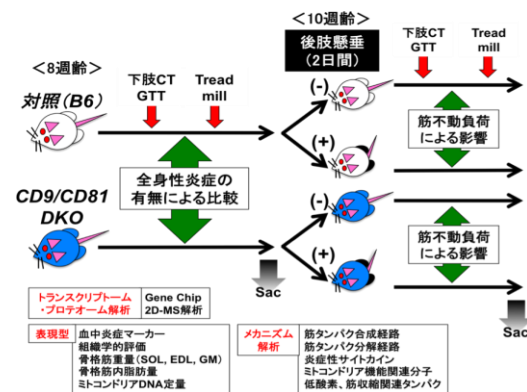
走行可能距離測定 (トレッドミル使用、10 度傾斜、10m/分で 1 週間の走行練習後に最大パフォーマンスにて判定)、血中炎症マーカー測定 (TNF α 、IL-6、IL-1 β)、組織像 (HE 染色、SDH 染色、F4/80 染色、oil red 染色)、骨格筋 (ヒラメ筋、長指伸筋、腓腹筋) 重量、骨格筋内 TG 濃度測定、ミトコンドリア DNA コピー数解析。

尚、CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスは不妊であり、シングルノックアウトでは COPD の表現型を示さないため、シングルノックアウト同士の交配からダブルノックアウトを得る必要がある。そのため、数多くのマウスの交配と時間を必要とするために、初年度については、各群最低 n=5 を得ることに専念し、前述の検討は進捗状況によっては次年度に持ち越す可能性が大きい。

(2) サルコペニアモデル動物を用いた発症メカニズムの解明

前年に十分な匹数のサルコペニアモデルマウスが得られ、臨床上のサルコペニアモデルとしての妥当性が、主に骨格筋の表現型と組織学的検査によって証明されれば、次にそのメカニズム解明を行う。

前述の B6-CO、B6-HS、DKO-CO、DKO-HS の 4 群間において、骨格筋 (ヒラメ筋、長指伸筋、腓腹筋) から mRNA と核タンパク、ミトコンドリアを抽出し、それぞれを用いてトランスクリプトーム解析 (Gene Chip, Affymetrix 社製) と、蛍光標識二次元ディフュージョン電気泳動 (2D-MS) 法を用いたプロテオーム解析 (Ettan DIGE, GE 社製) を行う。



また同時に、これまでにサルコペニアに関連が報告されている分子群 (筋タンパク合成関連: IGF-1、Akt/mTOR/p70S6K 経路など、筋タンパク分解関連: Akt/PKB/FOXO 経路、MuRF1、atrogen1 など、炎症性サイトカイン: TNF α 、IL-6、IL-1 β など) と、ミトコンドリア機能関連分子、筋小胞体 Ca²⁺-ATP タンパク

(SERCA1, II)、さらには低酸素状態関連分子 (HIF-1、PI3K/Akt/eNOS 経路など) に至るまで、現在サルコペニアについて報告のある分子についても検討し、これまでの報告との差異について解析する。このような分子生物学的見地からも、本モデル動物のサルコペニアモデルとしての妥当性が判定可能である。

網羅的解析によって得られた遺伝子群のうち、過去に筋萎縮との関連が報告されている遺伝子を除く新規遺伝子を選出する。また 2D-MS 解析の群間比較により同定されたタンパクについては、分離・解析を行い、同様に新規分子を選出する。そのうち発現変化を示

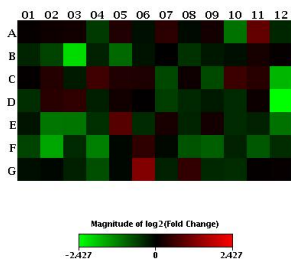
すものについて、分子生物学的手法により *in vivo* で発現を制御することにより、候補分子のサルコペニアへの関与を推定する。

4. 研究成果

(1) 研究分担者の立花先生の教室から、高週齢の C57BL/6J マウス (B6) と CD9/CD81 ダブルノックアウトマウス (DKO) を供与頂いたが、問題点にも挙げているように、交配により得られるマウスの数が少ないため、予定していた匹数のマウスは得られなかった。しかし、2011 年度供与分と 2012 年度供与分の骨格筋を併せて、分子生物学的検討を行った。尚、n 数が少ないため、当初予定していた、後肢懸垂システムを使用した不動化の有無での検討は行えていない。

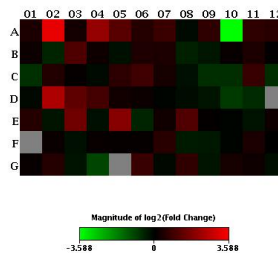
体重は既報どおり DKO で B6 より低値、脂肪量も低値であった。骨格筋量は、ヒラメ筋(遅筋成分)において DKO で B6 より低値であり、長指伸筋(速筋成分)においては両群間で差を認めなかった。プールしたヒラメ筋、長指伸筋由来の RNA に対して、RT² Profiler PCR Array (KIAGEN 社) を使用して網羅的遺伝子解析を施行した。その結果、ヒラメ筋においては、アポトーシス関連遺伝子の変化 (Bcl2 低下、Caspase3 上昇でアポトーシス促進型変化)、炎症関連遺伝子の変化 (IL1 β 上昇、IL-6 上昇で炎症性変化) を認め、DKO マウスによる全身性の炎症に起因すると思われる変化を認めた。また Myogenin 遺伝子の発現の増加を認め、遅筋成分維持のための代償性変化と推察された。

(ヒラメ筋の遺伝子発現ヒートマップ)



また、長指伸筋においては、アポトーシス関連遺伝子や炎症関連遺伝子の変化はほとんど認められず、線維芽細胞増殖因子 (FGF2) 遺伝子の発現増加を認めた。また IGF2 遺伝子発現の増加と筋衛星細胞マーカー (Pax7) 遺伝子の発現低下を認めたことから、長指伸筋では筋タンパク増加に関連する遺伝子が活性化されており、ヒラメ筋での筋量低下を代償していると考えられ、その結果、上記の表現型が生じていると推察された。今後、このことを検証するために、一定数の n での筋成分毎の解析が必要である。

(長指伸筋の遺伝子発現ヒートマップ)



DKO は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を呈する全身性慢性炎症モデルとして確立されているが、前述のようにその炎症は骨格筋にも及んでいること、また COPD 自体による体重減少 (B6 38.7 \pm 7.8g, DKO 18.8 \pm 2.6g)、運動耐用能低下に起因する廃用障害が存在することにより、それを基盤とした遅筋成分を主とした筋量の低下がみられていると考えられた。そのため、本動物はむしろ2次性サルコペニアのモデルとして使用可能であると考えられるが、なぜ、前の2つの図からも容易にわかるように、筋成分によって遺伝子発現プロファイルが変化するかについての検討が必要である。

研究計画にも示したとおり、DKOは不妊であるため交配により適当数の動物を準備するのに時間を要しており、結局この2年間では、計画通りに必要数のDKOを用意することができなかったのが、非常に残念である。したがって、方法(2)に示した実験は全くできていないが、引き続き予定匹数の獲得に尽力していく。小生が所属するグループ員数が異動等により減少していたことも研究進行遅延の一因と考えられたが、本年度(平成25年度)に2名の増員があり、本年度から頂いている基盤研究Cの内容とともに、本学呼吸器内科の協力のもと、引き続き研究を行う予定である。

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)

[学会発表] (計2件)

1. 杉本 研、楽木宏実. 生活習慣病が骨格筋に及ぼす影響：自然発症高血圧ラット (SHR) を用いた検討. 第22回日本老年病学会近畿地方会. 平成23年11月5日神戸.
2. 武田吉人、金 英姫、杉本 研、熊ノ郷淳、楽木宏実. 多様な老化表現型を示す新たな老化モデル：テトラスパニン CD9/CD81 二重欠損マウス. 第55回日本老年医学会総会. 平成25年6月5日.

[その他]

ホームページ等

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/geriat/index_g.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗木 宏実 (RAKUGI HIROMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20252679

(2) 研究分担者

大石 充 (OHISHI MIRSURU)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50335345

杉本 研 (SUGIMOTO KEN)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20437403

立花 功 (TACHIBANA ISAO)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60324761