

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590303

研究課題名(和文)サルコペニアの総合研究ラットからヒトへ：生体・運動単位から細胞・分子・核酸まで

研究課題名(英文)Total research for the sarcopenia from rats to human using multiple level analysis, such as motor unit in vivo, cell, molecule and nucleic acid.

研究代表者

玉木 哲朗(TAMAKI, Tetsuro)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10217177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：老化に伴う筋萎縮(サルコペニア)の予防を目的として、その発生機序をラット及びヒトの細胞を用いて行った。その結果、実際にサルコペニアの症状が出る以前に、すでに筋機能の低下(脊髄運動神経機能応答の変調、筋収縮速度の低下、筋小胞体機能の低下)は始まっており、筋萎縮の症状が出る前の中年期における予防策の重要性が示された。即ち、まだ体の動く40歳代に速い運動と柔軟体操の実施を習慣づけることが重要なカギとなると考えられる。さらに、筋肉を構成する個々の細胞群の機能低下は、生体内の環境因子(身体中の水の成分)によるところが大きく、栄養状態・ホルモンバランスを整えることの重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The physiological mechanisms of the age-related loss of muscle mass (sarcopenia) was investigated for preventive purposes. The results suggested that the symptoms such as alteration of motor units, slower muscle contraction velocity and the functional reduction of sarcoplasmic reticulum, already began in middle aged that showed no other signs of sarcopenia. Thus, prevention should be started in middle age that could be retained relatively higher movement ability. In addition, in vivo cellular environment, such as the cachexia with reduced physical activities, may be a major cause for sarcopenia and/or dynapenia with a functional depression of muscle-derived cells. Therefore, stable nutrient intake and maintaining of humoral balance are important for the prevention.

研究分野：神経筋生理学、運動生理学

 キーワード：運動単位 アミノ酸代謝 サイミジン代謝 lb抑制 筋張力測定 放射性同位元素 骨格筋内幹細胞 d
ynapenia

1. 研究開始当初の背景

近年、医療技術の進歩に伴い、いわゆる高齢化社会現象が刻々と進んでいる。そんな中でサルコペニア(Sarcopenia: 加齢に伴う廃用性筋萎縮と機能低下)は、高齢者における寝たきり・要介護状態に至る根本的な要因の一つと考えられている。また、高齢者の運動機能低下は生活環境を単純化し、いわゆる「認知症」への加速原因となることから、高齢化社会における要解決問題として、その予防策が国内・国外を通じて検討・報告されている。その主たる原因は、加齢現象に継続的な身体活動量の低下が加わることで生じると考えられている(原発性サルコペニア)。しかし、原因といくつかの現象は明らかにされているが、その発現機序に関しては十分に解明されておらず、より効率的な予防対策の提示には至っていない。例えば、加齢現象と身体活動量の低下の因果関係(加齢が先か、活動量低下が先か? 加齢が先として、運動は加齢現象を予防できるのか? 逆に、活動量低下が加齢現象を誘発するのか?)や、栄養関連分子の動向、筋関連転写因子を含む遺伝子発現など、根本的な解決に向けて不明な点が残されている。即ち、1) 報告されている現象が必ずしもコンセンサスのあるものとは限らない(ばらつき有り)こと。2) 現象-現象間の因果関係がはっきりしないケースが多いこと。3) 原因から現象に至るメカニズムが明らかでないケースが多いこと等があげられる。そして、これらの問題点が生じる原因の一つとして、「サルコペニアそのものの基準が曖昧である」ことが挙げられる。ヒトでは進行程度による分類、例えば、前、中、重症サルコペニア等も提案されているが⁽¹⁾、これは特に、動物実験で顕著である。即ち、動物の場合加齢が進めば進むほど個体差は大きくなるのが通常であるにもかかわらず、単に一定の年齢(週齢)を過ぎた動物、あるいは早期老化を示す動物のデータから成る報告が多く、サルコペニア筋そのものに対する基準を満たしていないケースがしばしば見られる。従って、年齢は基準に到達していても筋萎縮はそれほど進んでいない動物のデータ等も含まれることになり、その結果、ばらつきを生むことになっていると考えられる。従って、サルコペニア予防に対して「なるべく運動しましょう、あるいは身体活動量を維持するように努めましょう」という対処療法に留まり、根本的な解決、より効率的な解決方の提案には至っていないのが現状である。この現

状を打開するには、一定の基準を満たしたサルコペニア筋(動物)に対して、一貫した機能、代謝応答、分子・遺伝子発現、細胞増殖能力等の解析を加えることで解決できると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画は一定の基準(後述)を満たしたラットサルコペニア筋に対して、1) in vivo 麻酔下電気刺激における筋収縮機能解析から、緊張力低下、疲労耐性、脊髄運動神経機能応答、筋小胞体機能応答を解析する。2) ラジオアイソトープを用いたアミノ酸・サイミジン(細胞増殖能)代謝応答を解析する。3) 代償性肥大モデルを利用して筋内幹細胞の増殖・分化能を解析する。4) 代償性肥大モデルを利用して筋肥大・萎縮関連遺伝子発現を解析する。5) 代償性肥大モデルを利用して筋萎縮に対する分子・蛋白レベルの変化を解析する。6) さらに、ヒト骨格筋より実際に細胞群を抽出・培養し、上記3~5)を比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではサルコペニア筋の定義として、次の三点を設定した。1) 400 匹を超えるスタンダード成長曲線(上記2)から、完全に逸脱して筋萎縮していること。2) 萎縮筋に fiber type grouping が起こっていること。3) 動物(ラット)年齢が 2.5 年齢以上であること。従って、老齢ラット(2.5 年齢以上)で明かに体重・筋重量減少が認められたものに対して以下の解析を行った。

【実験1】:「in vivo 麻酔下電気刺激における筋収縮機能解析から、緊張力低下、疲労耐性、脊髄運動神経機能応答、筋小胞体機能応答を解析」

ここでは、平成 7-8 年度文部科学省科学研究費(基盤研究C: 2年間、研究代表者: 玉木哲朗)「新しい運動系の機能解析法」で開発した測定システムを利用した。従来の in vivo 実験系(電気刺激を用いた骨格筋の収縮機能測定法)と最新の OA 技術による計測法を応用し、小動物における骨格筋の生理機能をより正確に定量化する方法を開発した。完全デジタル化により、マイクロ秒単位の計測を可能とした。In vivo と in situ(坐骨神経切断後)の両実験が可能であるため、運動単位としての機能(in vivo)と神経筋接合部の機能、さらに単収縮をマイクロ秒単位で解析(in situ)することで、Ca²⁺のリリース(リアノジン受容体 Ca²⁺チャネル)及び Ca²⁺ポンプの機能として評価可能であるのが特徴である^(2,3,4)。

【実験2】:「代償性肥大モデルを利用して放射性同位元素(ラジオアイソトープ)を用いたアミノ酸・サイミジン(細胞増殖能)代謝応答を解析」

老齢ラット右脚に代償性肥大モデルを作成(左脚は対照群)し、術後24, 48, 72, 96, 120時間、さらに7日、10日、14日後にサンプリングを行う。筋サンプリングの3時間前に¹⁴Cロイシン、1時間前に³Hサイミジンを腹腔内投与し、タンパク合成細胞及び増殖期細胞を標識する。サンプリング後、筋ホモジネートを作成し、トリクロロ酢酸(TCA)にて洗浄、TCA不溶分画より¹⁴Cと³Hの取り込み量を測定・定量する。アミノ酸の中には細胞内のシグナル伝達においても重要な役割を果たすものがあり、サルコペニアとの関連ではロイシンが注目されている。また、本法はアミノ酸代謝と細胞増殖能の両方を同時に評価できることが特徴である^(5, 6, 7, 8)。

【実験3】:「ヒト骨格筋由来細胞群(幹細胞群を含む)の抽出・精製・培養増幅」

ヒト骨格筋サンプルの採取について:腹直筋と下肢筋群を得る。腹直筋は本学泌尿器科で内視鏡にて前立腺ガン摘出手術時のカメラポート挿入口より採取する。下肢筋群は本学整形外科にて切断に至った下肢の切断足より採取する。ヒトサンプルの取得は、本学医の倫理委員会、臨床研究委員会承認の方法に基づいて、連携研究者の整形外科内山、泌尿器科星が担当した。

・細胞抽出: 骨格筋組織を酵素処理し、骨格筋内に存在する細胞群を総合的に抽出する。この方法に関してはすでに動物実験にて確立している(Tamaki et al, 2002; 2003)。

・細胞精製: 使用細胞表面マーカー抗体CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49, CD56(NCAM), CD73, CD105, CD117, CD133, CD166。上記のマーカーを組み合わせて、1) サテライト細胞、2) おそらく筋肉系のmulti-myogenic 幹細胞群を効率よく分離する方法を検討した。

・細胞増幅: 上記の細胞群を効率よく、増幅する方法を検討する。IMDM/20% FCS/ペニシリン・ストレプトマイシン・ゲンタマイシン/メルカプ/メルカプトエタノールを常に基本培地とし、各種添加物(bFGF, EGF, HGF, Dexamethasone, IGF-1, Vitamin (B1, B6, B12, C), Insulin)を適正に組み合わせることによって、効率的な増幅方法を検討する。上記で確立された条件下で各年齢層の被験者(17-79歳)に対する細胞増殖・分化能及び各細胞群の分布比率等を検討した。

【実験4】:「RT-PCR法による筋の発育・発達・増殖関連因子、発育阻害因子、加齢関連因子の網羅的解析」

解析項目として、筋芽細胞分化関連因子としてMyoD, Pax7, c-met, M-cad, Myogenin, NCAM, 末梢神経関連因子Pmp22, 血管新生関連因子smoothelin, VE-cadherin, TEK, 細胞膜関連因子Dystroglycan, dystrophin, a7integrin, b1-integrin,筋小胞体、リアノジン受容体Caチャンネル関連因子SERCA1&2, Ryr1, calstabin1,そしてCbl-b, IRS1, Myostatinを解析した。これらの根拠として、筋肉の発育・発達因子としてはinsulin-like growth factor (IGF-1)、逆に発育阻害因子としてはmyostatinが注目されている。近年、無重力あるいはunloading環境で生じる筋萎縮で、IGF-1のレセプターやその関連タンパクをコビキチン化し分解させる、コビキチンキナーゼCbl-b(Casitus B-ligeage lymphoma-b)が増大していることが報告された^(9, 10)。従って、サルコペニアにもこのCbl-bやMyostatinの動向が関連していることが示唆される。さらに、リアノジン受容体の酸化的ダメージが加齢に伴う筋の弱体化に影響するという報告もあることから⁽¹¹⁾、ヒト培養細胞に対してもRT-PCR解析を行い、動物実験データと比較した。

4. 研究成果

1)【実験1】 In vivo 麻酔下電気刺激における筋収縮機能解析から、緊張力低下、疲労耐性、脊髄運動神経機能応答、筋小胞体機能応答を解析した結果、実際にサルコペニアの症状が出る以前に、筋機能の低下(脊髄運動神経機能応答の変調、筋収縮速度の低下、筋小胞体機能の低下)は始まっており、筋萎縮の症状が出る前の中年期における予防策の重要性が強く示された。特に、目立った症状がない状態でFast type (FF)のモーターユニットの消失がすでに始まることを示すデータとして、新しい発見となった。さらに、筋の柔軟性の低下がゴルジ腱受容器の感度を上げる結果となり、いわゆるIb抑制が収縮中の筋に生じることが明らかとなり、高齢者の転倒の原因を示唆するデータとして新しい見解となった。これらの結果は、Front Aging Neurosci 6:296. 2014)に報告した。

2)【実験2】本実験の特徴として、代償性筋肥大モデルは骨格筋の持つ肥大に対する機能を総合的にほぼ全て引き出すモデルである^(12, 13)。従って、Sarcopenia筋の持つ機能を全て引き出して、対照群と比較できる利点がある。その結果、対照群が術後5週時点で約70%の肥大率を示し、以後5週間その値を維持していたのに対し、

Sarcopenia群は5週時点で肥大率約17%、10週時にほぼ0%となった。これは、筋肥大を起こすためのタンパク代謝が対照群に対して1/4に減少したことに加えて、僅かでも増加した筋質量を維持するための代謝が保てなかったことを示していた。このデータを裏付けるように、ロイシン代謝は術後最も炎症が激しい72~96時間時で、対照群の約70%、その後の維持期で約50%に減少していた。同様に、サイミジン代謝も細胞分裂最盛期でもある術後72~96時間時で約40%に低下していた。これらのデータから、Sarcopenia筋内の筋肥大関連細胞群の増殖・タンパク合成能ともに、対象群と比べて大幅に低下していると考えられた。

3)【実験3】上記実験2の結果を受けて、実際に「ヒト骨格筋内の細胞群に対する増殖・分化・再生能の検討」を行った。まず、最適な抽出・精製・培養条件を決定した。その後、一定の培養条件下年齢17~79歳の男女から得た腹直筋、大腿四頭筋、下腿三頭筋群の細胞を比較した結果、増殖・分化・再生能に一定の変化は認められなかった。これは、上記の動物によるIn vivo実験と異なる結果であったことから、老化に伴う生理機能変化は、各細胞そのものの機能低下よりむしろ、生体の内部環境維持に作用する液性変化の影響が大きいことが示唆された。この内容の一部を学会(第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会、神戸)で発表すると同時に、現在、論文を国際誌に投稿中である。

4)【実験4】上記、実験2,3の結果をふまえて、「RT-PCR法による筋の発育・発達・増殖関連因子、発育阻害因子、加齢関連因子の網羅的解析」を行った。しかし、現在のところ網羅的解析では、顕著な傾向は認められていない。そこで、現在、目標を「発育阻害因子」に絞り込んだ集中的解析、及び定量的解析を行っている。結果が出しだい、追って報告したい。

<引用文献>

- 1) Cruz-Jentoft, A.J., J.P. Baeyens, J.M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F.C. Martin, J.P. Michel, Y. Rolland, S.M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude, and M. Zamboni. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 39:412-423.
- 2) Tamaki, T., A. Akatsuka, M. Tokunaga, S. Uchiyama, and T. Shiraishi. 1996. Characteristics of compensatory hypertrophied muscle in the rat: I. Electron microscopic and immunohistochemical studies. *Anat Rec*. 246:325-334.
- 3) Tamaki, T., and T. Shiraishi. 1996. Characteristics of compensatory hypertrophied muscle in the rat: II. Comparison of histochemical and functional properties. *Anat Rec*. 246:335-342.
- 4) Tamaki, T., A. Akatsuka, S. Uchiyama, Y. Uchiyama, and T. Shiraishi. 1997. Appearance of complex branched muscle fibers is associated with a shift to slow muscle characteristics. *Acta Anat (Basel)*. 159:108-113.
- 5) Tamaki, T., A. Akatsuka, M. Tokunaga, K. Ishige, S. Uchiyama, and T. Shiraishi. 1997. Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats. *The American journal of physiology*. 273:C246-256.
- 6) 玉木哲朗 (1998) 筋タンパク質と放射性同位元素の測定・解析、「運動生理学実験法」, pp208-212;
- 7) Tamaki, T., S. Uchiyama, Y. Uchiyama, A. Akatsuka, S. Yoshimura, R.R. Roy, and V.R. Edgerton. 2000. Limited myogenic response to a single bout of weight-lifting exercise in old rats. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278:C1143-1152.
- 8) Tamaki, T., S. Uchiyama, Y. Uchiyama, A. Akatsuka, R.R. Roy, and V.R. Edgerton. 2001. Anabolic steroids increase exercise tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280:E973-981.
- 9) Suzue, N., T. Nishikawa, Y. Onishi, C. Yamada, K. Hirasaka, T. Ogawa, H. Furochi, H. Kosaka, K. Ishidoh, H. Gu, S. Takeda, N. Ishimaru, Y. Hayashi, H. Yamamoto, K. Kishi, and N. Yasui. 2006. Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation. *J Bone Miner Res*. 21:722-734.
- 10) Nakao, R., K. Hirasaka, J. Goto, K. Ishidoh, C. Yamada, A. Ohno, Y. Okumura, I. Nonaka, K. Yasutomo, K.M. Baldwin, E. Komiyama, A. Higashibata, K. Nagano, K. Tanaka, N. Yasui, E.M. Mills,

S. Takeda, and T. N ikaw a. 2009. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like grow th factor 1 signaling during m uscle atrophy caused by unloading. Mol Cell Biol. 29:4798-4811.

- 11) Andersson, D.C., M .J. Betzenhauser, S. Reiken, A.C. M eli, A. Um anskaya, W .Xie, T. Shiomi, R. Zalk, A. Lacam pagne, and A.R. M arks. 2011. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and m uscle weakness in aging. Cell Metab. 14:196-207.
- 12) Tam aki, T., Y. Uchiyam a, Y. Okada, K. Tono, M .N itta, A. Hoshi, and A. Akatsuka. 2009. M ultiple stim ulations for m uscle-nerve-blood vessel unit in com pensatory hypertrophied skeletal m uscle of rat surgical ablation m odel. Histochem Cell Biol. 132:59-70.
- 13) Tam aki, T., Y. Uchiyam a, Y. Okada, K. Tono, M .N itta, A. Hoshi, and A. Akatsuka. 2009. Anabolic-androgenic steroid does not enhance com pensatory m uscle hypertrophy but significantly dim inish m uscle dam ages in the rat surgical ablation m odel. Histochem Cell Biol. 132:71-81.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Tam aki, T., M .H irata, and Y. Uchiyam a. 2014. Q ualitative alteration of peripheral m otor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrom e in m iddle-aged rats. Front Aging Neurosci. 6:296. 査読有り DOI: 10.3389/fnagi.2014.00296
- 2) Tam aki, T., Y. Uchiyam a, M .H irata, H . Hashim oto, N .N akajim a, K. Saito, T. Terachi, J. M ochida. Therapeutic isolation and expansion of hum an skeletal m uscle-derived stem cells for the use of m uscle-nerve-blood vessel reconstitution. Front Physiol. 6:165 査読有り DOI: 10.3389/fphys.2015.00165

〔学会発表〕(計1件)

Tetsuro Tam aki, 他6名、M ultipotent differentiation of hum an skeletal m uscle-derived cells (Sk-Cs): Com parison

to m ouse Sk-Cs. 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2015年3月22日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)
〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉木 哲朗 (TAMAKI, Tetsuro)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 10217177

(2)連携研究者

内山 善康 (UCHIYAMA, Yoshiyasu)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 80317784

(3)連携研究者

星 昭夫 (HOSHI, Akio)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 90453711