

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460897

研究課題名(和文)サルコペニア肥満における筋ミトコンドリア機能賦活の意義

研究課題名(英文)The significance of activation of muscle mitochondrial function in sarcopenic obesity

研究代表者

杉本 研 (Sugimoto, Ken)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20437403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然発症高血圧ラット(SHR)とWistar Kyotoラット(WKY)を用いた検討では、60週齢SHRはサルコペニアの表現型を示し過食負荷による影響を受けない一方で、60週齢WKYは過食によりサルコペニア肥満の表現型を示すことが明らかとなった。ミトコンドリア賦活作用を有するとされるカルニチン負荷により、筋量は増加しないものの筋力は増加し、その変化はSHRで顕著で、遅筋におけるミトコンドリア機能賦活の関与が考えられた。骨格筋エコーは、臨床的に下肢筋力低下を簡便に捉える方法として有用であり、特に前頸骨筋の筋厚と筋輝度の評価がサルコペニアの評価に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the basic study using Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) and Wistar Kyoto Rats (WKY), SHR aged 60 weeks showed the phenotype commensurate with sarcopenia rather than that with sarcopenic obesity and were not influenced by high fat & carbohydrate diet, however WKY aged 60 weeks showed the phenotype commensurate with sarcopenic obesity after 4 months' high fat & carbohydrate diet. The administration of L-carnitine resulted in the increase of muscle strength without changes of appendicular muscle mass especially in SHR, and this effect might be associated with activation of mitochondrial functions in muscles contained mostly slow-twitch fibers. It is confirmed in this study that skeletal muscle ultrasonography is very useful as a simple method for detecting reduced lower leg muscle strength in clinical, and our findings revealed that the assessments of muscle thickness and brightness in tibialis anterior (TA) muscle might be useful for detecting sarcopenia.

研究分野：老年医学

キーワード：モデル動物 サルコペニア 肥満 ミトコンドリア機能 骨格筋エコー

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた現在、転倒・寝たきりといった生活機能の低下を招く身体的変化のひとつとして、サルコペニアが注目されるようになり、サルコペニアをターゲットにした臨床的、基礎的検討が現在も盛んに行われている。一方、肥満も近年高齢者でその増加がみられているが、肥満とサルコペニアの合併である「サルコペニア肥満」は、サルコペニア単独、肥満単独よりも身体機能が低下しやすい病態として注目されている。サルコペニア肥満は、加齢による筋量、筋力の低下に加え、相対的な脂肪量増加に伴う肥大化脂肪細胞由来のアディポサイトカインにより脂肪酸過多や炎症が惹起され、筋量低下や筋代謝低下が助長されることが基礎的な機序とされている。しかし、一般に低栄養で生じるサルコペニアでみられる骨格筋での変化と、過栄養で生じるサルコペニア肥満でみられる骨格筋での変化との共通点が何であるか、また肥満でサルコペニアを合併するかないかを規定する因子が何であるかについては、不明である。

これまでの報告において、サルコペニア肥満は動揺性の悪化や片脚立ち時間を低下に關係し、転倒リスクを上昇させるなど、予後が悪いとされているが、サルコペニア肥満の明確な診断基準がなく日常診療で捉えにくいことも問題である。そのため、機序解明のためのサルコペニア肥満のモデル動物の構築とともに、簡便にサルコペニア肥満を同定する臨床診断法の確立が必要である。

我々は、若齢でサルコペニアの表現型を呈することが報告されている自然発症高血圧ラット (SHR) と野生型である Wister Kyoto ラット (WKY) を用い、過栄養負荷による骨格筋量や骨格筋代謝プロファイルへの影響を検討しており、32 週齢の高脂肪食 SHR が、通常食 SHR と比較し、有意な骨格筋への炎症細胞の浸潤、骨格筋量 (速筋) の減少、コピキチンリガーゼ発現の増加を示し、サルコペニア肥満に合致する病態を呈するという知見を得ており、このモデルを使用することとした。

サルコペニア治療のゴールドスタンダードはトレーニングとタンパク摂取であるが、サルコペニア肥満においては、骨格筋ミトコンドリア機能賦活作用を有する、選択的 PPAR 作用性アンジオテンシン II 受容体阻害薬 (SPPARM) やカルニチン製剤がその候補であることが基礎実験では示されているが、サルコペニア予防または治療に及ぼす影響を臨床的に明らかにすることは、今後増加の一途を辿るサルコペニアの予防または進展抑制を介した健康寿命延伸に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

サルコペニア肥満における筋ミトコンドリア機能賦活の意義を、基礎的かつ臨床的に明らかにすることを目的とする。

サルコペニア肥満モデル動物の確立と、筋ミトコンドリア機能との関連性の検討

SHR と WKY を用い、比較的高年齢での骨格筋を中心とした表現型の検討 (筋重量、組織学的検査、骨格筋内脂肪量、脂肪酸酸化能など) と分子生物学的検討 (ミトコンドリア機能、筋再性能など) を行い、既報のサルコペニア動物モデルでみられる変化との比較により妥当性の検証を行うと同時に、過栄養負荷により誘導されるインスリン抵抗性や炎症によるミトコンドリア機能、筋再生能への影響を中心に検討する。同時に若年齢との比較も行う。

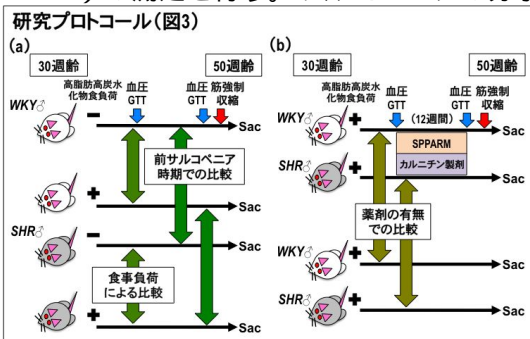
骨格筋ミトコンドリア機能賦活を目的とした介入研究 (動物実験、臨床研究)

前述と同様のプロトコルを用い、SHR、WKY とともに過栄養負荷下での、ミトコンドリア機能賦活作用を有する 2 薬剤 SPPARM、カルニチン製剤) を一定期間投与し、その効果を、筋ミトコンドリア機能関連項目だけではなく、筋量や筋再性能への影響も含め検討する。また、高齢生活習慣病患者を対象に、筋力、筋量、バランス機能の測定に加え、超音波を用いた骨格筋評価を行い、一定期間カルニチン製剤を投与した後に同様の検討を行うことでその影響を検討する。

3. 研究の方法

サルコペニア肥満動物モデルの確立 (図 3)

30 週齢の雄性 SHR、WKY に対して、血圧測定 (tail-cuff 法) 血液採取、耐糖能検査を行った後、SHR、WKY とともに普通食群 (ND) と高脂肪高炭水化物食群 (HFHS) に分け、20 週間後に、再度血圧測定、血液採取、耐糖能検査を施行する。また、両側大腿上部を切開し、筋膜下に坐骨神経を露出させ、その坐骨神経に電極を装着し、うち片側には電気刺激を与え一定時間下肢筋を収縮させた後、両側の下腿筋 (ヒラメ筋 (SOL)、長指伸筋 (EDL)、腓腹筋 (GM)) の摘出、血液採取 (大腿動脈を切断し回収)、各種臓器摘出し、全ての重量測定を施行する。摘出した骨格筋と各種臓器から mRNA の抽出とタンパク抽出を行う。また骨格筋については、中性脂肪 (TG) 含有量の測定、組織学的検討 (HE 染色、SDH 染色) を施行する。採取した血液を用い、血糖値、インスリン値、サイトカイン (IL-6、IL-15、TNF α) の測定を行う。サルコペニアの分子



病態については、ミトコンドリア代謝関連、

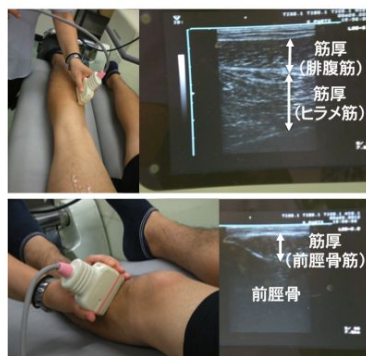
筋サテライト細胞機能、筋タンパク合成・分解関連、マイオカイン（IL-6、IL-15、BDNF）を中心に検討する。以上の結果を総合し、既報のサルコペニアモデル（FBNF1 ラット、米国 NIA で作成）でみられる表現型や分子生物学的变化との比較により、本動物のサルコペニアモデルとしての妥当性を検証する。

骨格筋ミトコンドリア機能賦活化によるサルコペニア予防を目的とした介入研究：

動物実験における効果を臨床的に検証するため、筋量、筋の質的变化を捉えることができ、かつ簡便な方法として、我々は、超音波を用いた骨格筋評価法に着目した（図4）。高

齢者の骨格筋は若年者と比較し、筋組織が少なく、脂肪や結合組織が多いが、超音波を用いた骨格筋評価において、高齢者では若年者よりも筋厚が減少しているのみならず、高輝度を呈することが報告されている。

超音波を用いた下腿筋の評価(図4)



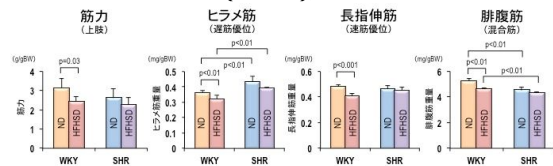
当科に入院または外来通院中の 65 歳以上の患者対象に、血液検査、アンケート調査、筋量、筋力測定（膝伸展筋力、握力）、バランス機能測定、10m 歩行速度と同時に、前述の超音波を用いた骨格筋評価法により、下腿筋（ヒラメ筋（SOL）前脛骨筋（TA）腓腹筋（GM））の筋厚、筋輝度を測定する。対象症例のうち、筋量、筋力が既報の各年齢における平均値の-2SD を満たし、かつ BMI が 22kg/m²以上の症例を、次の 2 群にランダムに分割する：(1) 運動療法のみ、(2) 運動療法+カルニチン製剤投与。6ヶ月後、カルニチン製剤の効果、特に筋量、筋力、筋質（超音波による筋輝度）について、(1)、(2)との比較により検討する。以上により、サルコペニア肥満者に対するカルニチン製剤介入の有用性を検証する。

4. 研究成果

サルコペニア肥満動物モデルの確立と筋ミトコンドリア機能との関連性の検討（基礎研究）：

60 週齢の SHR、WKY を用い、過食負荷（12 週間）の有無で 4 群に分けてモデル妥当性を検討した（各群 n=4-5）。WKY との比較し、SHR では体重が有意に低く、過食負荷群でよりその差は顕著であった。インスリン値は過食負荷群で高値であるが SHR、WKY 間では差がなかった。筋力は WKY で過食負荷による低下はみられたが、SHR では差がなかった。SOL、EDL、GM と WKY でのみ過食負荷による重量低下がみられたが、SHR との比較では、SOL は SHR

で重く、GM は SHR で軽く、速筋優位の低下がみられたが、SHR では過食負荷による変化がみられなかった（下図）。

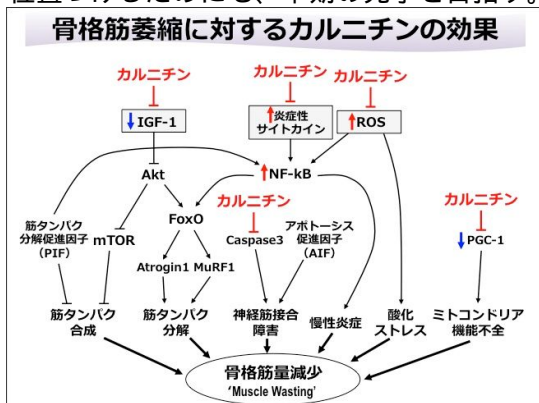


遺伝子発現に関しては、筋タンパク分解マーカーである Atrogin1、MuRF1 は、SOL では SHR で発現上昇傾向であるが過食負荷による変化はみられず、EDL では、SHR、WKY 間では差がなかったが、過食負荷により Atrogin1、MuRF1 の発現が上昇していた。筋由来サイトカインである IL-6 発現に関しては、SOL、EDL と筋収縮による発現上昇はみられたが、過食負荷その上昇度の減弱がみられた。IL-15 に関しては、EDL でのみ SHR で WKY よりベースラインの発現低下がみられたが、筋収縮による変化はみられなかった。以上から、60 週齢の SHR は速筋優位の低下を示す一方で野生型 WKY より体重、脂肪量とも少なく、サルコペニア肥満というよりはサルコペニアモデルの表現型を示すと考えられた。また過食負荷は WKY では筋タンパク分解促進が誘導による筋量減少がみられるものの、SHR では認めなかったことから、高週齢 SHR はすでにサルコペニア表現型を示すために過食負荷の影響が小さいことが示唆された。背景に示した 30 週齢の SHR は過食負荷による体重増加を認めたことから、SHR は早期に老化形質、すなわちカヘキシクな病態を示すモデルである可能性があり、今後この点に着目したいと考えている。

以上の結果を受け、引き続きカルニチン製剤（エルカルチン）を動物に投与し、筋量、筋力に対する検討を行った。60 週齢の SHR と WKY に対し、エルカルチン投与（0.1%濃度）、非投与で 4 群に分け、4 週間後に筋力、筋量、筋由来サイトカインへの影響を検討した。その結果、SHR は WKY に比較し有意に体重は低値であったが、遅筋率（EDL/SOL 比）は高く、GM 重量/体重比が有意に低値であり、速筋優位の低下が再現されていた。その条件下において、投与により、SOL、EDL、GM と筋重量はカルニチンの有無により差はみられず SHR、WKY 間でも差はなかったが、筋力はカルニチン群で有意に上昇しており、特に SHR での変化が顕著であった（WKY: 1.70 ± 0.18kg, 1.94 ± 0.23kg, NS; SHR: 1.53 ± 0.18kg, 1.90 ± 0.10kg, p < 0.05）。骨格筋での遺伝子発現については、SOL においてカルニチン群でミトコンドリア関連遺伝子である SOD2、UCP3 の発現が増加していたが、EDL ではみられず、また筋由来サイトカインである IL-6、IL-15 の発現はカルニチンの有無では変化がなかった。以上から、カルニチンにより明らかな筋量増加はないものの、筋力は増加し、特に遅筋でのミトコンドリア関連遺伝子発現と

関連していることが示唆された。組織学的検討は行っていない。

カルニチンは、骨格筋のミトコンドリア内で遊離脂肪酸の利用調節を担っており、加齢とともに減少することが知られている。カルニチン投与により、PGC-1 を介したミトコンドリア機能深賦活化だけでなく、下図のように、筋同化ホルモンである IGF-1 増加作用、炎症性サイトカイン、活性酸素種 (ROS)、アポトーシス抑制作用が基礎的検討において報告されており、本研究結果を支持するものである。更に詳細に解析を行い、確立されている薬剤がほとんどないサルコペニアに対する有効な治療法としてカルニチン製剤を位置づけるためにも、早期の完了を目指す。



尚、前記結果の一部について、後述の論文にまとめた。

骨格筋ミトコンドリア機能賦活化によるサルコペニア予防を目的とした介入研究(臨床研究):

介入研究を行う前に、骨格筋超音波検査の妥当性と意義を検討した。当院当科入院患者のうち、65歳以上かつ下肢超音波検査を行った34名(平均年齢75.8±7.4歳、男性41.2%)を対象とした。各下腿筋の筋厚(cm)は、それぞれTA: 1.73±0.24、GM: 1.07±0.25、SOL: 1.54±0.51であり、既報の同年代の平均値と同等、またはやや低値であった。各下腿筋の筋輝度は、TA、GM、SOLの筋輝度は、それぞれTA: 63.52±6.32、GM: 59.13±10.10、SOL: 49.36±9.40であり、既報の同年代の平均より高値であった。

各種筋厚は、下腿周径と有意な正の相関を示した(TA; p<0.01、GM; p<0.01、SOL; p=0.04)。TAの筋厚は、握力と有意な正の相関を示し(p=0.020)、開眼片脚立ち時間、総軌跡長と関連する傾向があった。GMの筋厚は、開眼片脚立ち時間と関連する傾向があり、総軌跡長と有意な負の相関を示した(p=0.045)。SOLの筋厚は、握力と有意な正の相関を示した(p=0.02)。また、TAの筋輝度は握力、10m歩行速度と有意な負の相関を示した(ともにp<0.01)。SOLの筋輝度は、握力と有意な負の相関を示した(p=0.03)。表2がそのまとめたものである(は p<0.05、は 0.05<p<0.1)。これらの結果から、TAが最も良く筋力や身体機能と関連していることが明らか

となった(下図)。

	握力		歩行速度		片脚立ち時間		重心動揺検査	
	筋厚	筋輝度	筋厚	筋輝度	筋厚	筋輝度	筋厚	筋輝度
前脛骨筋	○	○		○	△			△
腓腹筋					△			○
ヒラメ筋	○	○						

TAは脛骨全面にある姿勢保持に関わる速筋優位な下腿筋であり、また体位やエコー手技の影響を受けにくく、膝下であるため露出もしやすいことなど、簡便にサルコペニアを診断する方法としての利点を満たしている上、前述のように身体機能を良く反映している。以上から、前脛骨筋を用いた骨格筋エコーによる筋厚、筋輝度の測定は、サルコペニアの簡便な診断法として、実臨床における有用性が高いと考えられた(2014年度日本老年学会総会にて発表)。本検討での筋輝度の平均値は既報よりも高く、要介護者での平均値に近い値であった。対象症例は糖尿病が多く、糖尿病がサルコペニアの促進因子であり、その基盤にインスリン抵抗性が関与していることが、この結果につながったと考えられ、骨格筋エコーがサルコペニア肥満の同定に適していることが示唆された。現在、さらに症例数を増やした解析を行っており、近日中に論文化予定である。

骨格筋エコーを用いたカルニチン製剤の介入研究は期間中に施行することができなかった。マンパワー不足や超音波装置が期間中に頻回に故障したことがその理由である。現在、本学倫理審査委員会に介入研究のプロトコルを申請中である。

以上すべての結果をまとめると、

60週齢SHRはサルコペニア肥満というよりサルコペニアの表現型を示し、過食負荷による影響を受けない一方で、60週齢WKYは過食によりサルコペニア肥満の表現型を示すことが明らかとなった。

ミトコンドリア賦活作用を有するとされるカルニチン負荷(4週間)により、筋量は増加しないものの筋力は増加し、その変化はSHRで顕著であり、遅筋におけるミトコンドリア機能賦活化の関与が考えられた。

骨格筋エコーは、下肢筋力低下を簡便に捉える方法として有用であり、特に前頸骨筋の筋厚と筋輝度の評価がサルコペニアの評価に有用であると考えられた。

基礎研究についてはすべての検討ができていないこと、臨床研究は介入試験ができていないことが反省点であるが、本助成による成果を現在実施中、計画中の研究に活かしたい。

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2件)

1. 杉本 研. 生活習慣病モデル動物のサル

コペニア研究への応用. 日老医誌. 50: 766-769, 2013.

2. Sugimoto K, Rakugi H. The application of life style diseases-animal models to the research for sarcopenia. Clin Calcium. 24(10):1479-1486, 2014.

〔学会発表〕(計5件)

1. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics. Sugimoto K, Rakugi H, et al. The establishment of animal model for sarcopenic obesity. 2013年6月25日 ソウル(韓国).
2. 中間千香子、杉本 研ほか. 高齢者における筋厚、筋輝度測定の有用性の検討. 第56回日本老年医学会学術集会. 2014年6月13日 福岡.
3. 杉本 研ほか. サルコペニアにおけるマイオカインの意義: 生活習慣病モデルを用いた検討. 第56回日本老年医学会学術集会. 2014年6月12日 福岡.
4. 杉本 研ほか. 高齢者糖尿病患者におけるサルコペニアの頻度とその意義. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015年5月21日 下関. 第57回日本老年医学会学術集会・総会. 2015年6月14日 横浜.
5. 杉本 研ほか. サルコペニア肥満の定義と意義に関する検討. 第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2015年12月11日 神戸.

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 研(SUGIMOTO KEN)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 講師

研究者番号: 20437403

(2)研究分担者

楽木 宏実(RAKUGI HIROMI)

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 教授

研究者番号: 20252679