

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：33918

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350639

研究課題名(和文)悪液質(カヘキシー)に由来する骨格筋機能低下に対する新たな予防・治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of a new preventive/therapeutic strategy for skeletal muscle dysfunction derived from cachexia

研究代表者

岩田 全広(IWATA, Masahiro)

日本福祉大学・健康科学部・准教授

研究者番号：60448264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪液質に由来する骨格筋機能低下に対するメカニカルストレスと温熱刺激の効果を検討した。その結果、(1)メカニカルストレスはインテグリン $\alpha 1/3$ および mTOR の活性化によるタンパク質合成経路の促進を介して筋肥大を誘導する可能性があること、(2)温熱刺激は p38MAPK および FoxO1/3a の不活性化によるタンパク質分解経路の抑制を介してカヘキシーに由来する筋萎縮を抑制する可能性があること、(3)メカニカルストレスは p38MAPK および JNK の不活性化と AS160/TBC1D1 の活性化を介してインスリン抵抗性を改善する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of mechanical stress and heat stress on skeletal muscle dysfunction derived from cachexia. As a result, it was suggested that 1) mechanical stress may induce muscle hypertrophy through promotion of protein synthesis pathway by activation of integrin $\alpha 1/3$ and mTOR, 2) heat stress may suppress muscle atrophy derived from cachexia through inhibition of protein degradation pathway by inactivation of p38MAPK and FoxO1/3a, and 3) mechanical stress may improve insulin resistance through inactivation of p38MAPK and JNK and activation of AS160/TBC1D1.

研究分野：細胞生物学, 骨格筋生物学

キーワード：悪液質 カヘキシー 骨格筋 萎縮 代謝 メカニカルストレス 温熱刺激

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) が 2011 年に発表した「WHO レポート：非感染性慢性疾患の世界情勢」によると、2005 年に心血管疾患、糖尿病、癌および慢性呼吸器疾患を中心とする慢性疾患が原因で死亡した人の総数は 3500 万人にのぼると報告されている。これは世界の全死亡の 60% を占め、その数は今後 10 年間でさらに 17% 増加すると推計されており、急速に増大しつつある慢性疾患との闘いは 21 世紀の発展にとって大きな課題の一つとなっている。

慢性疾患患者の疾病構造として、疾病自体から起こる一次障害に加え、悪液質 (カヘキシー：炎症の亢進、インスリン抵抗性、タンパク質異化の亢進など多くの因子を包括した病態概念) により二次的な廃用症候群を来し、障害が重度化することが挙げられる。そのため、リハビリテーション医療では、慢性疾患に伴う悪液質を如何にして予防・治療していくかが、介助量の軽減や自宅復帰など、患者の自立生活を大きく左右する。そして、悪液質の典型的な症状として挙げられるのが筋萎縮とそれに伴う代謝異常であり、これはすべての患者に認められるといっても過言ではない。悪液質により引き起こされる筋萎縮の特徴は、抗酸化能の劣る速筋に顕著な萎縮が観察されることであり、その発生メカニズムは低レベルの遷延する炎症をトリガーとした筋細胞を構成する様々なタンパク質 (筋構成タンパク質) の合成抑制と分解亢進である。つまり、悪液質による筋萎縮を予防・治療するためには骨格筋に対する負荷量や活動量を増加させ、筋構成タンパク質の合成を促すことにより、筋組織を構成する個々の筋細胞の肥大と新たな筋細胞の形成による筋肥大が必要であり、臨床場面において最も効果的な方法は、レジスタンス運動やトレッドミル走行といった積極的な身体運動といわれている。しかしながら、臨床で遭遇する患者は、原疾患そのものの特異的な病態や二次的な廃用症候群のために、運動を十分に実施できないことが多い。さらに、糖尿病性合併症や心血管系合併症などの臓器障害により、運動制限を有する患者も多く認められ、これらの人々への運動処方、慢性疾患対策が直面している大きな課題の一つとなっている。したがって、積極的な身体運動が行えない患者を対象にした場合においても、優れた運動効果をもたらすことができる、他の方法論の早期開発が求められている。

臨床場面において治療手段の一つとして施行されるストレッチや電気刺激誘発性の骨格筋収縮は、骨格筋や関節構成体全体に対して、他動的に張力刺激 (メカニカルストレス) を負荷することができ、寝たきり患者や体力が低下した患者であっても施行可能である。また、このようなメカニカルストレスは、筋構成タンパク質の合成を促進し、筋細胞を肥大させることが明らかにされており、

筋萎縮や代謝異常の予防・治療を目的とした応用が試みられている。例えば Agata らは、坐骨神経を切除した除神経ラットを用い、1 日 15 分 (毎日) 麻酔下で徒手的に足関節背屈位 5 秒間と中間位 5 秒間を繰り返す間欠的ストレッチを 2 週間にわたって行った結果、除神経によるヒラメ筋の萎縮が抑制できたと報告している (Muscle Nerve: 2009)。また、骨格筋の糖代謝能に対するストレッチ効果を検証したものでは、摘出したラットのヒラメ筋をストレッチし、その効果を筋収縮させた場合と比較したところ、糖取り込み活性が筋収縮によるそれと同程度に亢進できたとの報告がなされている (Ihlemann J, et al. Am J Physiol: 1999)。

これらのことは、動物・培養実験の結果ではあるが、ストレッチや電気刺激誘発性の骨格筋収縮のようなメカニカルストレスでも悪液質により引き起こされる筋萎縮や代謝異常の進行を予防できる可能性を示しており、前述のような臨床応用に向けた科学的根拠の構築につながるものと考えられる。ただ、悪液質の進行過程では、酸化ストレスによる活性酸素種の産生増大とそれに関連したタンパク質分解酵素の活性化が認められている。酸化ストレスに曝された萎縮筋は、筋構成タンパク質の分解が亢進されるためそれ自体が極めて脆弱で、メカニカルストレス負荷によって筋線維損傷の発生を招く危険性がある。事実、ストレッチの強度や頻度などの条件によっては筋線維損傷を惹起する可能性があること (Stauber WT, et al. Eur J Appl Physiol: 2002) や、筋萎縮進行を助長する可能性もあること (Gomes AR, et al. Braz J Med Biol Res: 2004) が指摘されている。したがって、メカニカルストレスの萎縮進行抑制効果を安全かつ効果的に発揮させ得るには、酸化ストレスによる悪影響を排除する方法論を検討する必要があり、これには温熱刺激を併用した手段が有効ではないかと考えている。

この点に関して Selsby らは、分子シャペロン機能や損傷タンパク質の修復機能を有する heat shock protein (HSP) 72 に着目し、以下の実験結果を報告している。すなわち、ラットの足関節を最大底屈位で 8 日間不動化 (ギプス固定) する過程で、30 分間、約 41 °C の全身温熱暴露を 1 回/2 日の頻度で行うと、ヒラメ筋内の HSP72 が温熱暴露を行わない群より増加し、不動による筋細胞内の酸化ストレスの発生を抑えるとともに、筋重量の減少も有意に抑制できたとしている (Am J Physiol 289: 2005)。我々もこれまで Selsby らの報告を参考に、グルココルチコイドを投与するとタンパク質の分解亢進が生じる培養骨格筋細胞を用いて、タンパク質分解亢進に対する温熱刺激の効果と HSP72 の関連性について検討してきた。その結果、予め筋細胞に温熱暴露 (41 °C の環境温に 1 時間の暴露) を行うと筋細胞内の HSP72 が増加し、タンパ

ク質の分解亢進に伴う萎縮も著明に抑制できることを確認している(土田和可子・他:理学療法 29: 2012)。したがって、これらの知見を参考にすると、悪液質による筋萎縮とそれに伴う代謝異常の進行予防には、タンパク質合成を促すメカニカルストレスと、酸化ストレスの発生を抑えタンパク質分解を抑制する熱刺激を併用した方法が有効である可能性が高く、メカニカルストレスと温熱刺激をそれぞれ単独で使用するよりも、それらを併用して行うことでより効果的で効率的な予防効果を得ることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、メカニカルストレスや熱などの物理的刺激に対する筋細胞応答に着目し、メカニカルストレスまたは温熱刺激が悪液質による筋萎縮とそれに伴う代謝異常の進行過程に及ぼす影響とその作用機序を解明するとともに、メカニカルストレスと温熱刺激を組み合わせた治療介入が、タンパク質の合成能と分解能を相加的に改善することで、より効果的かつ効率的に筋萎縮の進行を抑制するのではないかとといった仮説を検証することが目的である。

3. 研究の方法

本研究は、培養細胞実験ならびに動物実験の2つの実験系により構成された。動物実験については、名古屋大学動物実験委員会保健学部会に実験計画書を提出し、承認を受けた後、名古屋大学が定める動物実験指針に準じて実施した。

(1) 培養細胞実験

細胞の種類と群分け

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株(C2C12)を筋管細胞に分化させたものを使用した。

ストレッチの効果検証をするために、1)通常培養した群(対照群)、2)ストレッチ(頻度 1/6 ~ 1 Hz、伸張率 110% ~ 115%)を負荷した群(S群)に振り分けた。

電気刺激の効果検証をするために、1)通常培養した群(対照群)、2)電気刺激(パルス幅 0.2 msec、周波数 100 Hz、刺激時間 200 msec、休止時間 800 msec、刺激強度 50 Vの矩形波、5分/時間)を負荷した群(E群)、3) tumor necrosis factor- α を培地に投与することでインスリン抵抗性を惹起した群(IR群)、4)インスリン抵抗性を惹起し、電気刺激を負荷した群(IR+E群)に振り分けた。

温熱刺激の効果検証をするために、1)通常培養した群(対照群)、2)温熱刺激(39 ~ 43 °C の環境温に1時間の暴露)を負荷した群(H群)、3)グラム陰性菌の菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS、1 μ M)を培地に投与することで筋萎縮を誘導した群(LPS群)、4)合成グルココルチコイドであ

るデキサメタゾン(DEX、10 μ M)を培地に投与することで筋萎縮を誘導した群(DEX群)、5) LPSを投与し、温熱刺激を負荷した群(LPS+H群)、6) DEXを投与し、温熱刺激を負荷した群(DEX+H群)に振り分けた。

形態学的検索

ストレッチ、電気刺激、または温熱刺激負荷開始から 12、24、48、72 時間後に、筋管細胞の形態応答を評価した。また、LPS または DEX を投与してから 12、24、48 時間後に、筋管細胞の形態応答を評価した。具体的には、各検索時期の筋管細胞に対してギムザ染色を行い、画像解析ソフトウェアを用いて細胞直径を計測した。

生化学的検索

ストレッチ、電気刺激、または温熱刺激負荷開始から 1 時間後に、筋管細胞の糖輸送能を評価した。具体的には、各刺激開始から 1 時間後に 2-デオキシグルコース(2-DG)を培地に添加することで、一定時間内に細胞が取り込む 2-DG 量を算出した。また、TNF- α を投与してから 3 日目の電気刺激または温熱刺激終了から 24 時間後に、筋管細胞のインスリン感受性を評価した。具体的には、各刺激終了から 24 時間後にインスリンと 2-デオキシグルコース(2-DG)を添加することで、一定時間内に細胞が取り込む 2-DG 量を算出した。

分子生物学的検索

各刺激開始直後(0)、0.25、0.5、1、2、3、6、9、12、18、24、48、72 時間後に real-time RT-PCR 法および western blotting 法を用いて、筋管細胞内の標的 mRNA およびタンパク質発現量を定量した。

(2) 動物実験

動物の種類と群分け

実験には、6 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、高脂肪食 [high fat diet (HFD) 32] を 3 週間摂取させることでインスリン抵抗性モデルラットを作成した。3 週間の高脂肪食摂取後、ラットをさらに麻酔のみを 7 日間投与した群(HFD群)と、電気刺激を 7 日間負荷した群(HFD+E群)に振り分けた。電気刺激(周波数 20 Hz、パルス幅 200 μ sec、電流 1.6 mA、duty cycle 1 秒 on-off)は吸入麻酔下で実施し、両側の大腿四頭筋の近位部(-極)と遠位部(+極)に位置する皮膚に表面電極を貼付した後、1日1回、30分間負荷した。対照は同期間に通常の餌を与えて飼育した群(対照群)とし、対照群には電気刺激を負荷せず麻酔のみを 7 日間投与した。

生化学的検索

7日目の電気刺激終了から 24 時間後に高インスリン正常血糖クランプ法を実施し、ラットのインスリン感受性を評価した。具体的

には、頸静脈に挿入したカテーテルからグルコース溶液とインスリン溶液を同時に注入し、血糖値を空腹時と同レベルに維持するグルコース注入速度を求めることで、グルコース注入率を算出した。インスリン注入速度は30.0 mU/kg/minとし、得られたグルコース注入率はインスリン受容体結合部以降でのインスリン作用（インスリン反応性）の指標とした。

分子生物学的検索

高インスリン正常血糖クランプ法を実施した後に大腿直筋を採取し、免疫沈降法および western blotting 法を用いて、大腿直筋内の標的タンパク質発現量を定量した。

(3) 統計処理

得られた結果は、平均値 ± 標準偏差で表記した。各群間の比較には、一元配置分散分析を適用し、有意差を判定した。そして、一元配置分散分析にて有意差を認められた場合には多重比較検定に Tukey 法を適用し、2群間の比較を行った。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

(1) 培養細胞実験

メカニカルストレスまたは温熱刺激による筋肥大効果について

S 群の細胞直径は対照群と比較して有意に増加したが、その細胞直径の増加はインテグリン 1/3 阻害剤および mTOR 阻害剤により有意に抑制され、ホスホリパーゼ D 阻害剤では抑制されなかった。また、S 群の Akt、p70S6K、ERK1/2、p38MAPK リン酸化量は対照群と比較して有意に増加し、p70S6K、ERK1/2、p38MAPK リン酸化量の増加はインテグリン 1/3 阻害剤により抑制されたが、Akt リン酸化量は影響を受けなかった。

E 群の細胞直径は対照群と比較して有意に増加したが、その細胞直径の増加は PI3K 阻害剤および mTOR 阻害剤により有意に抑制された。また、E 群の Akt、p70S6K リン酸化量は対照群と比較して有意に増加し、それらのリン酸化量の増加は PI3K 阻害剤により抑制された。

H 群の細胞直径は対照群と比較して有意差を認めなかった。

温熱刺激による筋萎縮抑制効果について

LPS 群の細胞直径は対照群と比較して有意に低下したが、LPS + H 群のそれは LPS 群と比較して有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。また、LPS 群の p38MAPK リン酸化量は対照群と比較して有意に増加したが、LPS + H 群のそれは LPS 群より有意に低下し、対照群との間に有意差を認めなかった。さらに、LPS + H 群の PGC-1、SOD3、HSP72 mRNA 発現量は対照群、LPS 群と比較して有意に増加した。

DEX 群の細胞直径は対照群と比較して有意に低下したが、DEX + H 群のそれは DEX 群より有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。また、DEX 群の FoxO1/FoxO3a リン酸化量は対照群と比較して有意に低下したが、DEX + H 群のそれは DEX 群より有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。さらに、DEX + H 群の HSP72、HSP25/27 タンパク質発現量は対照群、DEX 群と比較して有意に増加した。

メカニカルストレスまたは温熱刺激による筋代謝亢進効果について

S 群の 2-DG 取り込み量は対照群と比較して有意に増加し、その 2-DG 取り込み量の増加は CaMK 阻害剤により有意に抑制されたが、PI3K 阻害剤および AMPK 阻害剤では抑制されなかった。また、S 群の CaMK2 リン酸化量は対照群と比較して有意に増加した。

H 群の 2-DG 取り込み量は対照群と比較して有意に増加し、その 2-DG 取り込み量の増加は PI3K 阻害剤および AMPK 阻害剤により有意に抑制されたが、CaMK 阻害剤では抑制されなかった。また、H 群の Akt、AMPK リン酸化量は対照群と比較して有意に増加した。

メカニカルストレスによるインスリン抵抗性改善効果について

IR 群の 2-DG 取り込み量は対照群と比較して有意に低下したが、IR + E 群のそれは IR 群より有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。また、IR + E 群の HSP72、HSP25/27 タンパク質発現量は対照群、IR 群と比較して有意に増加した。

(2) 動物実験

メカニカルストレスによるインスリン抵抗性改善効果について

HFD 群のグルコース注入率は、対照群と比較して有意に低下したが、HFD + E 群のそれは HFD 群より有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。

HFD + E 群の HSP72、HSP25/27、GLUT4 タンパク質発現量は対照群、HFD 群と比較して有意に増加したが、HFD + E 群の SOCS3、GLUT1、IRS1 タンパク質発現量は対照群、HFD 群と比較して有意差を認めなかった。

HFD 群の p38MAPK、JNK リン酸化量は対照群と比較して有意に増加したが、HFD + E 群のそれは HFD 群より有意に低下し、対照群との間に有意差を認めなかった。また、HFD 群の AS160/TBC1D1 リン酸化量は対照群と比較して有意に低下したが、HFD + E 群のそれは HFD 群より有意に増加し、対照群との間に有意差を認めなかった。

以上の結果をまとめると、筋肥大・萎縮に関する実験では(1)メカニカルストレスはインテグリン 1/3 および mTOR の活性化によるタンパク質合成経路の促進を介して筋

肥大を誘導する可能性があること、(2) 温熱刺激は p38MAPK および FoxO1/3a の不活性化によるタンパク質分解経路の抑制を介してカヘキシーに由来する筋萎縮を抑制する可能性があること、筋代謝に関する実験では(3) メカニカルストレスおよび温熱刺激は糖代謝能を亢進するが、それらの作用機序は異なる可能性があること、(4) メカニカルストレスは p38MAPK および JNK の不活性化と AS160/TBC1D1 の活性化を介してインスリン抵抗性を改善する可能性があることが示唆された。

以上の検証は、培養細胞実験ならびに動物実験に基づくものであるが、その成果はメカニカルストレス、温熱刺激、またはその併用が悪液質に由来する筋萎縮とそれに伴う代謝異常の予防・治療に有用である可能性を示唆している。

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3件)

Tsuchida W, Iwata M, Akimoto T, Matsuo S, Asai Y, Suzuki S. Heat stress modulates both anabolic and catabolic signaling pathways preventing dexamethasone-induced muscle atrophy in vitro. *J Cell Physiol* 232(3): 650-664, 2017. (査読有)

DOI: 10.1002/jcp.25609.

Kataura S, Suzuki S, Matsuo S, Hatano G, Iwata M, Yokoi K, Tsuchida W, Banno Y, Asai Y. Acute effects of the different intensity of static stretching on flexibility and isometric muscle force. *J Strength Cond Res* 2016 Nov 29. [Epub ahead of print] (査読有)

DOI: 10.1519/JSC.0000000000001752

Matsuo S, Suzuki S, Iwata M, Hatano G, Nosaka K. Changes in force and stiffness after static stretching of eccentrically-damaged hamstrings. *Eur J Appl Physiol* 115(5):981-991, 2015. (査読有)

DOI: 10.1007/s00421-014-3079-3.

[学会発表](計10件)

岩田全広, 田中健太, 土田和可子, 松尾真吾, 鈴木重行. 骨格筋経皮的電気刺激は SOCS3 非依存的な経路を介してインスリン抵抗性を改善する. 第 26 回愛知県理学療法学会大会, 2017 年 3 月 5 日, ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

Iwata M, Tsuchida W, Ohno Y, Matsuo S, Fujiwara M, Asai Y, Suzuki S. The role of integrins in the regulation of mechanical stress-induced myotube

hypertrophy in vitro. 2016 APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII, 2016 年 11 月 2-4 日, Phoenix (Arizona, USA)

岩田全広, 土田和可子, 大野嘉太, 松尾真吾, 浅井友詞, 鈴木重行. ホスホリパーゼ D はメカニカルストレスによる培養骨格筋細胞の肥大適応に関与しない. 第 71 回日本体力医学会大会, 2016 年 9 月 23-25 日, いわて県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール(岩手県・盛岡市)

森貴史, 土田和可子, 杉野有里, 大野嘉太, 松尾真吾, 浅井友詞, 鈴木重行, 岩田全広. 温熱刺激がグルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行を抑制するメカニズムの検討. 第 20 回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2016 年 3 月 13 日, 中京大学名古屋キャンパス清明ホール(愛知県・名古屋市)

大野嘉太, 岩田全広, 土田和可子, 秋本崇之, 鈴木重行. カヘキシーに由来する骨格筋萎縮の進行抑制を引き起こす温熱刺激条件の検討. 第 70 回日本体力医学会大会. 2015 年 9 月 18-20 日, 和歌山県民文化会館・ホテルアパローム紀の国(和歌山県・和歌山市)

佐藤亜耶, 土田和可子, 松尾真吾, 鈴木重行, 岩田全広. メカニカルストレスによる骨格筋細胞の糖取り込み亢進作用は AMPK 非依存的な経路を介する. 第 24 回愛知県理学療法学会大会, 2015 年 3 月 1 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

土田和可子, 岩田全広, 田中将斗, 大野嘉太, 浅井友詞, 鈴木重行. グルココルチコイド誘導性筋萎縮におけるオートファジー関連遺伝子, カルパイン関連遺伝子, ユビキチン関連遺伝子の発現変動. 第 19 回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2015 年 3 月 7 日, 名古屋大学野依記念学術交流館(愛知県・名古屋市)

熊谷知恵, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行, 岩田全広. 温熱刺激はグルココルチコイド投与に伴う FOXO3a の活性化と MuRF1 の発現増加を抑制する. 第 69 回日本体力医学会大会, 2014 年 9 月 19-21 日, 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市)

佐藤亜耶, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行, 岩田全広. メカニカルストレスによる骨格筋の糖取り込み亢進作用は CaMK II を介する. 第 69 回日本体力医学会大会, 2014 年 9 月 19-21 日, 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市)

岩田全広, 名倉広絵, 塚田有佳子, 土田和可子, 坂野裕洋, 秋本崇之, 鈴木重行. 温熱刺激が悪液質(カヘキシー)による骨格筋萎縮の進行を抑制する可能性. 第

69 回日本体力医学会大会，2014 年 9 月
19-21 日，長崎大学文教キャンパス（長
崎県・長崎市）

〔その他〕

[https://nfu-kg.n-fukushi.ac.jp/nfuhp/Kg
App?kyoinId=ybdbgdgegy](https://nfu-kg.n-fukushi.ac.jp/nfuhp/KgApp?kyoinId=ybdbgdgegy)

6．研究組織

(1)研究代表者

岩田 全広 (IWATA, Masahiro)
日本福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号：6 0 4 4 8 2 6 4

(2)研究分担者

坂野 裕洋 (BANNO, Yasuhiro)
日本福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号：0 0 3 5 1 2 0 5

(3)連携研究者

秋本 崇之 (AKIMOTO, Takayuki)
早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授
研究者番号：0 0 3 5 1 2 0 5