

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560283

研究課題名(和文)漢方薬はサルコペニアを予防改善できるのか？

研究課題名(英文)Effect of a herbal medicine on muscle atrophy

研究代表者

町田 修一 (Machida, Shuichi)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・准教授

研究者番号：40421226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：漢方薬や生薬は複数組み合わせることで服用できることから複数のメカニズムをターゲットとして筋萎縮を抑制する可能性が期待される。生薬Aは、遅筋線維優位なヒラメ筋の筋重量の低下を抑制することが報告されている。そこで本研究は生薬Aがギプス固定によって生じる筋萎縮に与える影響を筋線維タイプ別に検討することを目的とした。10週齢の雄性F344ラットを対象とした。14日間のギプス固定終了後、生薬Aはギプス固定によって生じる遅筋線維優位なヒラメ筋の萎縮をコピキチン・プロテアソーム系の抑制を介して部分的に抑制するが、速筋線維優位な足底筋の萎縮は抑制しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate whether administration of a herbal medicine prevents immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles fiber. Twenty-seven 10-week old male F344 rats were divided into three experimental groups: control, immobilized (IM), and immobilized and a herbal medicine administration (IM+HM). IM and IM+HM groups were immobilized both lower extremities by casting-tape for 14 days. As expected, IM group induced significant decreases soleus muscle and plantaris muscle compared with CON group. However a herbal medicine administration significant reversed the weight reduction of soleus muscle compared with IM group. On the other hand, IM+HM group did not reverse the weight reduction of plantaris muscle. This study suggests that administration of a herbal medicine has beneficial effects only on slow-muscle fiber dominant soleus muscle atrophy.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋萎縮 漢方薬 生薬 廃用性筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症機序の詳細については十分に解明されていない。骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし、加齢に伴い筋再生能は低下する。サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷や筋萎縮からの再生や再成長が補いきれないために顕在化するという考えがある。

骨格筋は極めて可塑性の高い組織である。筋力トレーニングは筋の肥大をもたらす。これに対してケガや骨折によるギプス固定や安静状態、疾病の治療に伴うベッドレスト、無重力空間での滞在など、身体の不活動状態は廃用性筋萎縮をもたらす。特に、萎縮した骨格筋の回復は、高齢になるほど遅延することから、そのまま寝たきりに繋がる危険性もあり、超高齢社会を迎えた本邦において筋萎縮の予防あるいは改善を目的とした運動や栄養、薬物などによる治療法の確立は健康寿命延伸の観点からも重要視されている。

骨格筋には主に遅筋線維と速筋線維の2種類が存在する。廃用性筋萎縮では、筋線維の萎縮は両タイプでともに認められるが、その程度や応答性については、不活動を引き起こすために用いたモデル、期間、対象とした筋、ヒトか動物かなどの条件によって異なる。

例えばラットを用いた実験では、およそ90%以上が遅筋であるヒラメ筋において、不活動による萎縮の程度が顕著であることが広く知られている。このことから廃用性筋萎縮に関する研究の多くは、尾部懸垂を用いて、遅筋線維に焦点が当てられてきた。しかし実際にヒトにおける報告ではベッドレストにより外側広筋において速筋線維と遅筋線維が同程度に萎縮することが報告されている。さらに、サルコペニアおよびガンや感染症の末期に生じる悪液質において、速筋線維に選択的な萎縮が認められることが示されている。また、筋萎縮のメカニズムとして主要な役割を担う筋特異的コピキチンリガーゼの活性化が、遅筋線維と比較して速筋線維において、より顕著に増加することが報告され、筋タンパク質分解系シグナルにおいても筋線維タイプによって異なる分子メカニズムにより萎縮が制御されることが示唆された。

このような観点から筋萎縮の抑制に有効な治療法を創出するために、筋線維タイプを考慮した筋線維タイプ特異的な治療法の開発が萎縮メカニズムの解明と対策が求められる。

漢方薬は、加齢に伴う体の不快や不調、病後・術後の体力低下や虚弱体質の改善などの目的に使われることが多く、サルコペニア該

当者やその予備軍が何かしらの漢方薬を日常的に服用していることが予想される。現代の健康や医療にとって、漢方薬はなくてはならない重要な治療手段の一つとなっており、科学的な研究も進み、複雑でわかりにくいとされてきた薬理作用も徐々に解明されてきている。しかしその一方で、よりよい漢方薬の利用には高いレベルのエビデンスの集積が必要であり、そのメカニズムの解明が待たれているのも事実である。

漢方薬を構成する生薬は、植物、動物、鉱物などの天然産物由来の薬物であり、多くの有効成分を含むことから多成分系薬物として知られる。漢方薬や複数の生薬の利用は、単一のメカニズムを標的とした薬剤とは異なり、複数のメカニズムを有するガンや糖尿病などの疾患の治療に有効であるとして近年注目されている。そのため廃用性筋萎縮においても、生薬の複合利用は複数のメカニズムに作用することが期待される。これまで、2種類の生薬の複合投与がラットの尾部懸垂による筋萎縮を抑制したことを報告しているが、その抑制メカニズムは明らかになっていない。さらに生薬の単独の利用による筋萎縮抑制効果を検討した研究も少ないことから、生薬の複合利用の検討ための基礎的知見を得るために廃用性筋萎縮抑制効果を有する生薬を探索し、そのメカニズムを検討することが重要であると考えた。

生薬の黄耆(おうぎ)は、尾部懸垂による筋萎縮に対しヒラメ筋の筋重量の低下を抑制したことが報告されている。しかし、生薬の利用による筋萎縮抑制効果を検討した研究は少ないことに加え、投与条件や抑制メカニズム、速筋線維に対する抑制効果は明らかになっていない。生薬の複合利用の検討ための基礎的知見を得るために、まずは単独の利用で筋萎縮を抑制する生薬を探索し、分子メカニズムの標的を明らかにした上で、生薬を複合利用し検討することが重要である。

2. 研究の目的

本研究は生薬の先行研究から最も筋萎縮に対する有効性の期待された黄耆が、ギプス固定によって生じる筋萎縮に与える影響を筋線維タイプ別に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には12週齢のF344雄性ラットを用いた。体重が等しくなるように以下の3群に分けた: コントロール群(CON)、ギプス固定群(IM)、ギプス固定+黄耆摂取群(IM+AR)。なお、本実験は、順天堂大学動物実験委員会によって承認された。

ラット下肢へのギプス固定処置は、イソフ

ルラン麻酔下によって弛緩した状態にて、両下肢を足関節底屈位にし、キャストリングテープを用いて行った。先行研究の方法に基づいて、足関節 30° 屈曲位、膝関節角度 75° 屈曲位になるよう固定措置を行った。ギプス固定期間は 14 日間とした。

投与煎薬は、生薬の黄耆（刻み、ウチダ和漢）をとろ火で煎出し、生薬の滓を濾すことにより得た。IM+AR 群のラットには煎薬を、CON 群および IM 群のラットには水を、ギプス固定の 7 日前からギプス固定終了までの 21 日間、明期である 12 時間の絶食後、毎日定時に 1.5ml、胃ゾンデを用いて投与した。

実験期間終了後、ペントバルビタール麻酔下（50mg/kg）にて、左右下肢の遅筋線維優位であるヒラメ筋および速筋線維優位である足底筋を摘出し、湿重量を測定した。摘出した筋は、凍結ブロックを作製するために、筋腹部が残るようにカットしコルク上に垂直に固定し液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結を行い、その後 -80 °C で保存した。

筋サンプルの凍結ブロックから 10 μm の切片を作製し、Myosin heavy chain (MyHC) に対する免疫組織化学染色に用いた。一次抗体には、Type 、 a、 b 線維およびラミニンに対する抗体としてそれぞれ BA-F8、SC-71、BF-F3 (Developmental Studies Hybridoma Bank) および Anti-Laminin (Sigma Aldrich) を用いた。染色した試料は、光学顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon) に接続された顕微鏡カメラ (DS-Qi2, Nikon) で撮影し、画像解析ソフト (NIS Elements, Nikon) を用いて筋線維横断面積の測定を行った。筋線維横断面積の分析は、1 検体につき 1 つの切片試料を用い、1 つの切片試料につきラミニンで囲まれた約 150 本の筋線維から横断面積を求めた。また、約 500 本の筋線維から筋線維タイプ別に筋線維数を計測し、筋線維タイプ組成比を求めた。結果は、BA-F8 で染色された部分を Type 、SC-71 で染色された部分を Type a、BF-F3 で染色された部分およびその他の筋線維を Type b + Type d/x として示した。

Total RNA を抽出として、Real-time PCR 法を用いて MAFbx/atrogen-1 と MuRF1 の遺伝子発現量について検討した。

得られたデータは、全て平均値 ± 標準偏差で表した。不活動に伴う筋重量、筋線維横断面積、筋線維タイプ組成比、筋萎縮関連遺伝子の発現量に関しては一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った後、Tukey's post hoc test を用いて検定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

4 . 研究成果

IM 群および IM+AR 群の体重は CON 群と比較

して 26.9% と有意に低下した ($P < 0.05$) 。

筋重量の評価は全て体重で補正し行った。足関節底屈位のギプス固定によって短縮位にあったヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の筋重量は IM 群においてそれぞれ 25.7%、29.5%、29.8% 低下した。しかし黄耆を摂取させた IM+AR 群のヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の筋重量はそれぞれ 16.6%、27.1%、27.3% の有意な低下であり ($P < 0.05$) ヒラメ筋においては 35.5% の有意な筋萎縮の抑制が確認された ($P < 0.05$) 。

足底筋、腓腹筋における筋萎縮抑制率はそれぞれ 8.1%、8.6% であったが、有意な差は認められなかった。

IM 群のヒラメ筋において筋線維横断面積は 37.2% 低下し、この低下は IM+AR 群において 12.3% 抑制されたが有意差は認められなかった。また筋線維タイプ別に検討したところヒラメ筋の Type 線維および Type a 線維は IM 群において、それぞれ 36.3% および 33.7% 低下した ($P < 0.05$)。この低下は IM+AR 群において、それぞれ 12.3% および 11.8% 抑制されたがいずれも有意な差はなかった。足底筋においては、IM 群において 51.2% の低下を示した ($P < 0.05$) が IM+AR 群において 54.4% 抑制された。しかしこの抑制に有意差は認められなかった。また、筋線維タイプ別の検討では、IM 群の Type 、 Type a、 Type b + Type d/x において、それぞれ 52.8%、46.3%、52.9% 低下し、IM+AR 群においてそれぞれ 18.5%、34.2%、11.5% 抑制されたが、いずれも有意な差は認められなかった。

ヒラメ筋の CON 群において、Type 線維が占める割合は 90.3% であったのに対し IM 群において 81.3% に低下し ($P < 0.05$)、遅筋線維から速筋線維への移行が認められたが、IM+AR 群において抑制は認められなかった。足底筋における Type 線維は、CON 群において 7.3%、IM 群において 8.6%、IM+AR 群において 6.4%、また Type 線維は CON 群において 30.3%、IM 群において 33.9%、IM+AR 群において 31.2%、Type b + Type d/x 線維は CON 群において 62.4%、IM 群において 57.5%、IM+AR 群において 62.4% といずれも有意な変化は認められなかった。

ヒラメ筋において IM 群の MAFbx/atrogen-1 遺伝子発現量は CON 群の約 2.9 倍に上昇した ($P < 0.05$)。IM+AR 群においては CON 群の約 2.3 倍と抑制の傾向を示したが有意差は認められなかった。また MuRF1 遺伝子発現量は CON 群の約 1.8 倍に上昇したのに対し ($P < 0.05$)、IM+AR 群においては約 1.3 倍の上昇であり IM 群との間に有意な差が認められた ($P < 0.05$)。一方足底筋の IM 群における MAFbx/atrogen-1 遺伝子発現量は CON 群の約 6.1 倍に上昇したが ($P < 0.05$)、IM+AR 群においてこれは抑制されなかった。また MuRF1 遺伝子発現量におい

で約 3.0 倍上昇したが ($P < 0.05$)、IM+AR 群においても約 2.8 倍に上昇を示し、抑制は認められなかった。

本研究の結果より、生薬の黄耆はギブス固定によって生じる遅筋の萎縮は抑制するが、速筋の萎縮は抑制しないことが示唆された。

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 6 件)

Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*. 66: 337-343, 2016 (査読有)

Itaka T, Agemizu K, Aruga S, Machida S. The G allele of the IGF2 Apal polymorphism is associated with judo status. *J Strength Cond Res*. 30: 2043-2048, 2016. (査読有)

Itaka T, Agemizu K, Aruga S, Machida S. Judo status is not associated with the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism in Japanese judo athletes. *Archives of Budo*. 12: 61-67, 2016. (査読有)

町田 修一, 船越 智子. 骨格筋再生と老化制御 筋サテライト細胞の役割. サテライト細胞とサルコペニア. *基礎老化研究* 40: 13-17, 2016.

Ozaki H, Abe T, Mikesky AE, Sakamoto A, Machida S, Naito H. Physiological stimuli necessary for muscle hypertrophy. *J Phys Fitness Sports Med*, 4: 43-51, 2015. (査読有)

町田修一, 川西範明. サルコペニアの分子メカニズム. *神経内科*, 83: 355-360, 2015. (査読無)

[学会発表](計 5 件)

【招待講演】

町田修一, サルコペニアのメカニズム解明とその対策 - 骨格筋幹細胞からのアプローチ -, 第 38 回日本基礎老化学会大会シンポジウム, 横浜, 2015 年 6 月.

町田修一, 培養細胞から見えてきた骨格筋の性差, 第 1 回日本筋学会大会シンポジウム, 東京, 2015 年 8 月.

町田修一, 培養細胞から見えてきた骨格筋の性差, 第 70 回日本体力医学会大会シンポジウム, 和歌山, 2015 年 9 月.

【国際学会】

Nozaki R, Takagi K, Nakano D, Fujii T, Machida S. Differential protective effects of radix astragalii, herbal medicine, on immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. 2016 Advances in Skeletal Muscle Biology in Health and Disease Conference, Florida, Jan. 2016.

【国内学会】

野崎理沙, 高木香奈, 内藤久士, 町田修一. 生薬の黄耆が廃用性筋萎縮に及ぼす影響, 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山, 2015 年 9 月.

[図書](計 2 件)

町田修一(分担執筆). 運動, 老化の生物学(石井直明編集). p273-286, 化学同人, 東京, 2014 年 8 月.

内藤久士, 町田修一, 吉原利典(分担執筆). Section 5 運動と筋 - 4 骨格筋の肥大と萎縮, ニュー運動生理学(1)(宮村実晴編). p224-33, 真興交易株式会社医書出版部, 東京, 2014 年 9 月.

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 筋脂肪化抑制剤

発明者: 町田修一, 他 2 名

種類: 特許

番号: 特願 2015-090580

出願年月日: 2015 年 4 月 27 日

国内外の別: 国際特許分類 A61K

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

町田 修一 (MACHIDA, Shuichi)

順天堂大学大学院・スポーツ健康科学研究科・前任准教授

研究者番号: 40421226

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし