

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462238

研究課題名(和文)サルコペニア治療への挑戦 - 骨格筋虚血/再灌流障害の病態とオルガネラが果たす役割 -

研究課題名(英文)Challenges to new treatment for sarcopenia

研究代表者

辻井 雅也 (Tsujii, Masaya)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40444442

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)：サルコペニアは治療方法だけでなく病態機序も不明な点が多い。本研究は肥満型サルコペニアに注目し、まずob/obマウスを検討し、有意な体重増加に反して有意に低い筋湿重量を示した。骨格筋MDAは有意に高く、肥満では骨格筋が慢性的な酸化ストレス障害に曝されている可能性があった。また血流低下は骨格筋再生能が低く、閉塞性動脈硬化症などを合併するとさらに骨格筋減少が進行する可能性があった。さらにC2C12の酸化ストレス障害に対して、edaravoneによる抗酸化治療を検討し、有意な生存率改善、MDA低下、TNF- α 抑制を示し、抗酸化治療の骨格筋の酸化ストレス障害に対する有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have little knowledge about pathology and treatment for sarcopenia. The aims of this study were to evaluate the skeletal muscles in ob/ob mice, and to examine effect of antioxidant to skeletal muscles on C2C12. In ob/ob, muscle weight were significantly less heavy than that in control, whilst ob/ob significantly heavily weighed than control. Likewise, level of MDA were higher in the muscles of ob/ob than that of control. Additionally, skeletal muscles during regeneration were weakly immunolabeled for myoD in obese mice compared to control mice. Furthermore, protective effect of edaravone(100 μ M) were analyzed on C2C12 myoblast under oxidative stress using 250 μ M H₂O₂ with results in significant cell viability and inhibition of level of MDA and expression of TNF- α . This study showed that chronic oxidative stress involved in pathophysiology of sarcopenia in obesity and that administration of antioxidant effectively treated oxidative stress of skeletal muscles.

研究分野：整形外科

キーワード：骨格筋 肥満 サルコペニア 抗酸化治療

1. 研究開始当初の背景

本邦での高齢化人口比率は 2007 年には 20%、2013 年には 25%を突破し、世界でも類を見ない急激なスピードで進み続け、今後もさらに増加の見込みである。そのため今後の福祉を含めた医療費の増加は不可避であり、そのことは様々な情報 source にて注意喚起がなされ、国家の最重要関心事として国民に周知されることと思われる。医療費の抑制には疾患に対する予防策を講じることが有用な戦略である。

その中で 2011 年の国民基礎調査からも明らかであるが、要介護の原因として関節疾患と転倒・骨折が約 21%、また 14%の衰弱の一部にも運動器疾患が関与すると推測され、骨格筋を扱う整形外科医の責務は重く、新たな予防戦略を展開する必要がある。実際に日本整形外科学会は運動器不安定症の前段階としてロコモティブシンドローム（以下ロコモ）の概念を発信し、今後の認知度を高めるとともに介護サービス利用者の増加を抑制する指針を示している。そのために、一つでも多くの予防策を獲得しておくことが得策と考えられる。そのロコモのうち骨粗鬆症はビスホスホネート製剤や副甲状腺ホルモン製剤が開発され、骨量増加や骨折リスクの減少といった実際の臨床での効果を挙げている。一方、骨粗鬆症と並ぶ代表的なロコモであるサルコペニアは、現在も病態メカニズムは不明な点が多く、予防策や治療の確立には至っていない。

骨格筋は日常生活やスポーツなど移動能力を決定するだけでなく、姿勢保持や呼吸をも司る生命活動においても重要な器官であり、糖代謝の恒常性を維持することで全身性にも重要な役割を担っている。そのため近年では研究面において内科領域における注目度が高く、特に糖代謝疾患などの生活習慣病との関連性を述べたものが多く示されている。その中でサルコペニアとメタボリックシンドロームの代表格である肥満との間に強い関連性が見出され、サルコペニア肥満と表記されることも多い。実際に骨格筋減少に伴って HbA1c 値やインスリン抵抗性が増大することが示され、また肥満では脂肪細胞が増殖する際にアディポネクチンなどの炎症マーカーを発現したり、異所性に沈着した脂肪により慢性炎症に晒されることで骨格筋萎縮をきたすことが示されている。

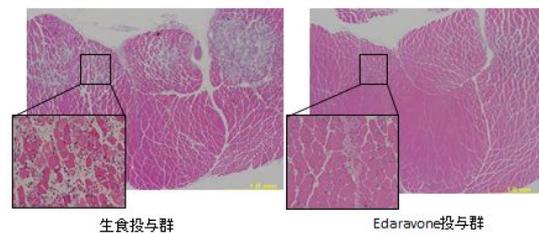
さらに肥満での循環器系への合併症はよく知られているが、特に動脈硬化は多く、実際の整形外科診療でも腰椎、下肢の単純 X 線において動脈の石灰化を頻繁に認める。これらのことから肥満では日常的に血流低下に晒されている可能性が高いと考えられ、このような慢性的な血流障害も肥満での骨格筋萎縮の一因となりうる可能性を考えた。

整形外科研究において骨格筋を対象としたものは多くないが、我々は以前より骨格筋の虚血・再灌流障害に関して研究を重ねてきた。

これは実際の臨床において四肢切断後再接着やコンパートメント症候群、さらには遊離筋肉移植術による機能再建術において、局所のみならず全身状態悪化例を経験し、骨格筋の血流障害を減じる新たな方法を得るためである。それらの研究において核酸治療により炎症カスケードを制御したり、抗フリーラジカル治療が血流障害に曝された骨格筋を有効に保護することを明らかとした。

そこでこれまでに行ってきた骨格筋の虚血再灌流障害に対する知見から、特に 2002 年より本邦で臨床応用されている抗フリーラジカル除去剤である edaravone の保護効果に注目した。本薬剤はマウス後肢の駆血による虚血再灌流モデルにおいて有意な骨格筋の保護効果を示し、酸化ストレスマーカーも有意に抑制した。同様に肥満における骨格筋が

3時間の虚血/3日間の再灌流



酸化ストレスや炎症に晒されていること、肥満型サルコペニアにおける抗フリーラジカル治療の効果を検討することで骨格筋萎縮の病態機序の解明や新たな治療を導入し、国民の健康寿命の延長と医療・福祉費増大という国家的問題へ対峙する手段としたいと考えた。

2. 研究の目的

ロコモの二大疾患であるサルコペニアは治療方法のみならず、病態機序に関しても不明な点が多い。そこでサルコペニアの中でも近年注目度の高い肥満型サルコペニアに注目して研究を行い、生活習慣病としての骨格筋萎縮の病態機序を解明し、また抗フリーラジカル治療の可能性を検討することが本研究の目的である。まず肥満における骨格筋の特徴をコントロールマウスと比較検討し、四肢血流の低下から骨格筋が慢性的な酸化ストレス障害に晒されている可能性を検討した。次に *in vitro* にて筋芽細胞 C2C12 を用いて酸化ストレス障害モデルを作成し、edaravone を用いた抗フリーラジカル治療の効果を検討した。

3. 研究の方法

In vivo 研究

実験 1: 肥満モデル (ob/ob マウス) における骨格筋の特徴

(対象) 10 週齢の C57/BL6-ob/ob と +/+ マウス (日本 SLC 株式会社、各 n=16) であるが、ob/ob マウスはレプチン遺伝子欠損から過食をきたして肥満に至る。

(評価項目) 体重、前脛骨筋・腓腹筋の筋湿重量を測定し、ドップラー血流計を用いて筋

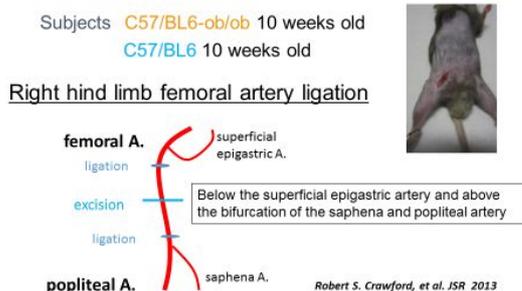
血流量を評価してから、以下を検討した。
 (組織学的検討) 摘出した骨格筋を 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定した後にパラフィン包埋後に 4 μ m で薄切し、これを HE 染色にて評価した。筋線維の形態を各標本にて任意の 10 視野における全筋線維数と形態変化を認める筋線維の割合を評価した。

(酸化ストレスマーカー測定) 摘出した骨格筋を TBARS 法にて MDA を測定した。

実験 2: 血流低下時の筋再生の検討

(対象) 前述と同じ ob/ob マウスを用いた。
 (血流低下モデルの作成) Crawford らの報告したモデルを用いた。麻酔はペントバルビタールナトリウム (0.05 mg/g body weight) を腹腔内投与にて、十分な鎮静を確認後に手術を行った。右後脚を対象とし、まず鼠径部に皮切を加えて十分に皮下を剥離して、大腿動静脈、神経を確認後に丁寧な剥離操作にて大腿動脈を露出した。その後近位では浅下腹壁動脈、遠位では伏在動脈との分岐を確認して、大動脈の本幹を遠位、近位で結紮のうえ、これらの間に切離した (下図)。

Animal models of poor circulation



(骨格筋の摘出) 骨格筋は摘出前に筋血流を測定し、type1, type2 筋線維をほぼ均等に含む腓腹筋と、type2 筋線維が有意の前脛骨筋を大腿動脈結紮後 1, 2, 3 週で摘出した。

(血流測定) 骨格筋を切除する前にドブラー血流計を用いて腓腹筋と前脛骨筋の表面血流を測定した。

(組織学手検討) 実験 1 と同様に摘出した骨格筋を 4%PFA で固定後にパラフィン切片を作成して HE 染色して評価した。

(免疫組織化学的検討) 組織学的検討で作成したパラフィン切片で抗 MyoD 抗体 (Santa Cruz) を一次抗体として用いて評価した。

(Western blotting) 摘出した骨格筋を液体窒素にて凍結保存し、これを凍結破砕した後に RIPA buffer を用いて蛋白を抽出した。それを SDS-PAGE 用 15% グラジエントゲルを用いて電気泳動し、免染と同じく抗 MyoD 抗体を用いて検出した。

In vitro 研究

実験 3: マウス筋芽細胞 C2C12 の酸化ストレス障害に対する edaravone の効果

(対象と酸化ストレス障害) マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて行い、酸化ストレス障害は過酸化水素 250 μ M にて加え、ストレス障害 3 時間後に評価し、過酸化水素水を加えなかった

ものと比較検討した。

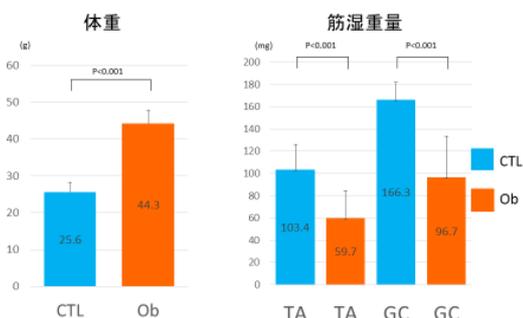
(細胞生存率の検討) 96 穴プレートに C2C12 を各 1.5 $\times 10^4$ 培養し、MTS assay にて細胞生存率を評価した。

(RT-PCR) C2C12 を 10cm シャーレに 80%コンフルエントまで培養し、250 μ M 過酸化水素にて酸化ストレスを加え、3 時間後に total RNA を mirVANA Isolation kit (Ambion) を用いて抽出し、RNA は DNase にて処理して 1st Strand cDNA Syntesis Kit を用いて cDNA を作成して保存した。保存した cDNA は real time PCR にて TNF- と GAPDH 遺伝子を班定量的に解析した。

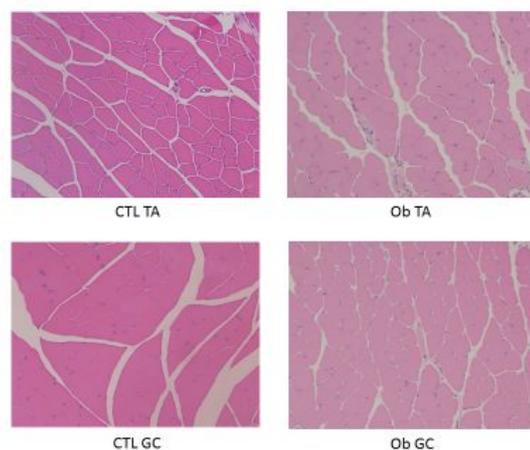
(Edaravone 投与の効果) Edaravone は 0, 50, 100 μ M の濃度にて、過酸化水素による酸化ストレス障害の 1 時間前に前投与した。また評価は上記と同じく MTS assay による細胞生存率と RT-PCR 法にて TNF- 発現を検討した。

4. 研究成果

(1) Ob/ob マウスは体重増加に反して筋湿重量はコントロールマウスより有意に低かった。肥満では骨格筋委縮を認める可能性が示された。



(2) Ob/ob マウスの骨格筋では組織学的に筋線維間が拡大しており、また形態的に丸い筋線維が全体の 48.6%に認め、コントロールの 19.2%と比して有意に多かった。肥満では異所性脂肪沈着を生じるが、骨格筋委も脂肪沈着を生じる組織であり、筋線維間の脂肪沈着から生じる慢性炎症が骨格筋減少の一因である可能性が示された。

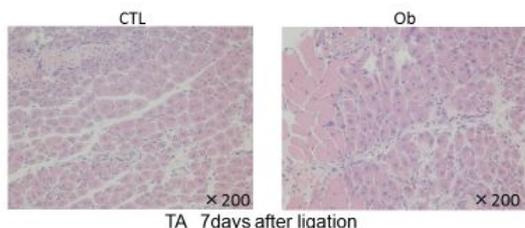


(3) Ob/ob マウスの骨格筋では MDA が 992 pmol/ mg (総蛋白で補正) とコントロール

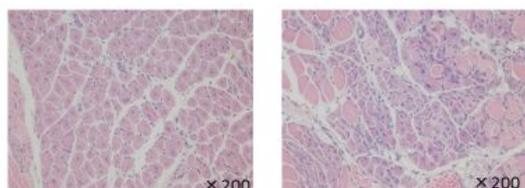
マウスの 532 pmol/mg に比して有意に高く、ob/ob マウスの骨格筋は慢性的に虚血再灌流障害に曝露されている可能性が示された。

(4)骨格筋血流は ob/ob マウス(10.5 ml/min)で、コントロールマウス(10.8 ml/min)との差は認めず、大腿動脈を切離後は両群で有意に血流が低下し (ob/ob 5.7 ml/min、コントロール 5.7 ml/min)、大腿動脈切離2週後に軽度回復するもその後は血流低下状態が継続した。また血流低下とその後の回復の程度は、両群間に差を認めなかった。

(5)骨格筋の組織学的検討では大腿動脈の結紮切離により血流低下状態に陥った骨格筋は ob/ob マウス、コントロールマウスともに結紮後1週では、核が中心にある筋芽細胞の増殖を認め、またその細胞間には炎症細胞浸潤を認める。この所見は急性血流低下による筋細胞死とその後に生じた筋再生過程と考えられた。また結紮後2、3週では筋芽細胞

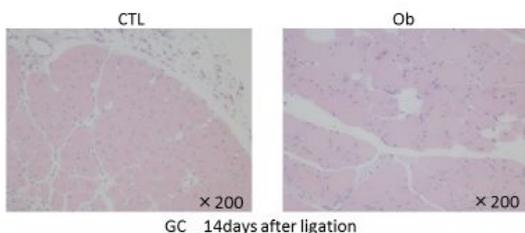


TA 7days after ligation

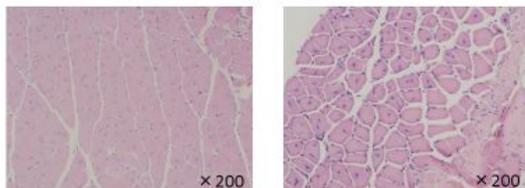


GC 7days after ligation

の融合から筋再生が進んでいると考えられた。しかし結紮切離後2週で脂肪変性を認める部位や、3週でも依然として核が中心に位置する筋芽細胞が目立ち、大腿動脈の結紮切離による血流低下が筋再生を遅延しているものと考えられる所見であった。しかし両群間での差は認められなかった。



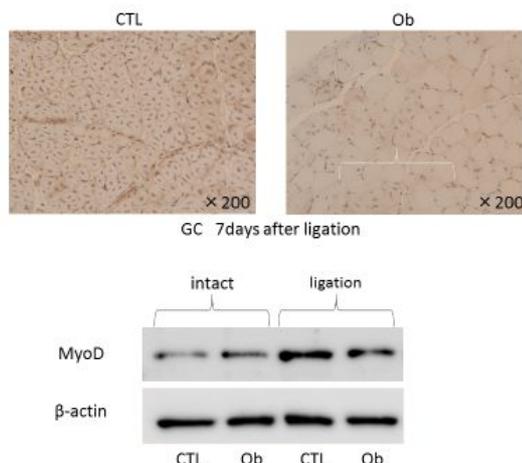
GC 14days after ligation



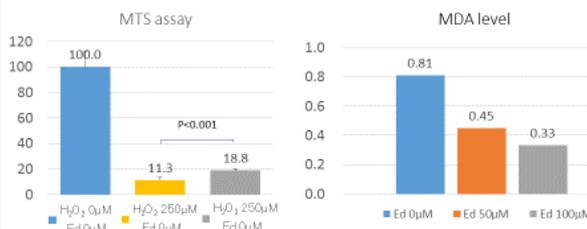
GC 21days after ligation

(6)大腿動脈の結紮切離により筋細胞死から筋再生までの過程は組織学的には ob/ob マウスとコントロールマウスの間に差は認められなかったが、筋再生過程における筋衛星細

胞から筋芽細胞への分化、その増殖から融合までに発現する MyoD 発現をタンパクレベルで検討したところ、大腿動脈の結紮切離を行っていない骨格筋では MyoD 発現は低値であるのに対して、動脈結紮後1週の筋再生が旺盛な時期に ob/ob マウスの骨格筋では MyoD 発現の著明な低下を認め、肥満では血流低下状態での筋再生能が低下している可能性が示された。



(7)マウス筋芽細胞 C2C12 は過酸化水素 250 μ M による酸化ストレスの負荷により、生存率が有意に低下するも、edaravone の前投与によりその生存率の抑制は有意に抑制された。また MDA も edaravone 投与により有意に抑制され、過酸化水素の投与による骨格筋の酸化ストレス障害を保護しうることを示した。



(8)マウス筋芽細胞 C2C12 への過酸化水素 250 μ M での酸化ストレス障害により、C2C12 の TNF- α 発現が有意に増大し、edaravone 100 μ M の前投与で発現が低下する傾向であった。Edaravone に直接の抗炎症効果はないが、抗フリーラジカル除去により間接的に抗炎症効果を示したものと考えた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 19 件)

- ORS 2017 Annual Meeting 2017 年 3 月 19 日~3 月 22 日 San Diego Convention Center (San Diego, USA)
Tsukamoto T, Tsujii M, Iino T, Matsumine A, Sudo A
Inhibitory Effect of Febuxostat for

- Waste of Skeletal Muscles in Tumor-Bearing Mice with Lm8 Osteosarcoma
2. ORS 2017 Annual Meeting 2017年3月19日~3月22日 San Diego Convention Center (San Diego, USA)
Asano T, Tsujii M, Nakanishi T, Iino T, Sudo A
Analysis of Skeletal Muscle and Regeneration Under Circulation Decline in Ob/ob Mice
 3. ORS 2017 Annual Meeting 2017年3月19日~3月22日 San Diego Convention Center (San Diego, USA)
Iino T, Tsujii M, Tsukamoto T, Asano T, Hasegawa M, Sudo A
The Secretion of ADAMTSs to Articular Cavity and the Morphological Change of Surface Layer on Synovium in Rotator Cuff Injury
 4. ORS 2016 Annual Meeting 2016年3月5日~2016年3月8日 Disney's Coronado Springs Resort (Orlando, USA)
Nakanishi T, Tsujii M, Iino T, Sudo A
Analysis of Skeletal Muscles during Regeneration Due to Reduced Circulation in Ob/ob Mice and Effect of Edaravone for Oxidative Stress on C2c12 Myoblast
 5. ORS 2016 Annual Meeting 2016年3月5日~2016年3月8日 Disney's Coronado Springs Resort (Orlando, USA)
Iino T, Tsujii M, Tsukamoto T, Nakanishi T, Hasegawa M, Sudo A
Thrombin and Osteopontin Involve the Differentiation into Myofibroblast in Fibrous Cord of Dupuytren's Disease
 6. ORS 2016 Annual Meeting 2016年3月5日~2016年3月8日 Disney's Coronado Springs Resort (Orlando, USA)
Iida R, Tsujii M, Yoshikawa T, Sudo A
Bone Mineral Density and Marker of Bone Metabolism in Postmenopausal Women with Distal Radius Fracture
 7. 第89回日本整形外科学会学術総会 2016年5月12日~2016年5月15日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)
辻井雅也、飯田 竜、國分直樹、中西巧也、塚本 正、植村和司、須藤啓広
母指 CM 関節症に対する鏡視下靭帯形成術の治療成績と適応に関する検討
 8. 第89回日本整形外科学会学術総会 2016年5月12日~2016年5月15日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)
西村明展、伊東直也、松峯昭彦、長谷川正裕、若林弘樹、明田浩司、淺沼邦洋、辻井雅也、宮崎晋一、中村知樹、須藤啓広
 9. 第89回日本整形外科学会学術総会 2016年5月12日~2016年5月15日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)
中西巧也、辻井雅也、飯野隆大、塚本 正、須藤啓広
肥満モデル(ob/ob マウス)の筋再生の検討と筋芽細胞の酸化ストレス障害に対するedaravoneの抑制効果
 10. 第89回日本整形外科学会学術総会 2016年5月12日~2016年5月15日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)
伊東直也、西村明展、松峯昭彦、長谷川正裕、若林弘樹、明田浩司、淺沼邦洋、辻井雅也、宮崎晋一、中村知樹、須藤啓広
ロコモティブシンドロームと患者立脚型アウトカムに関連について 旧宮川村コホート研究より
 11. 第89回日本整形外科学会学術総会 2016年5月12日~2016年5月15日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)
飯田 竜、辻井雅也、吉川智朗、植村和司、須藤啓広
閉経後女性の橈骨遠位端骨折における骨密度、骨代謝および脊椎椎体骨折の評価
 12. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日~10月14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
辻井雅也、飯野隆大、飯田 竜、中西巧也、塚本 正、牧野祥典、須藤啓広
MRIを用いたDupuytren拘縮腱膜の病理学的・解剖学的特徴の検討
 13. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日~10月14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
飯田 竜、辻井雅也、吉川智朗、植村和司、中西巧也、須藤啓広
閉経後助成の橈骨遠位端骨折の骨代謝研究および年齢群別にみた骨折連鎖の位置づけ 骨代謝マーカー、骨密度および形態脊椎椎体骨折の解析結果
 14. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日~10月14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
中西巧也、辻井雅也、飯野隆大、塚本 正、須藤啓広
肥満モデル(ob/ob マウス)の筋再生の検討と筋芽細胞の酸化ストレス障害に対するedaravoneの効果
 15. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日~10月14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
伊東直也、西村明展、松峯昭彦、長谷川

正裕、若林弘樹、明田浩司、淺沼邦洋、辻井雅也、宮崎晋一、松原孝夫、中村知樹、山口敏郎、須藤啓広

シート式下肢荷重計を用いた外反母趾患者の歩行解析 第7回三重県旧宮川村住民検診結果より

16. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会
2016年10月13日～10月14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市) 塚本正、辻井雅也、中西巧也、飯野隆大、松峯昭彦、須藤啓広

骨肉腫高肺転移株(LM8)における骨格筋悪液質の特徴 酸化ストレス傷害の関与とフェブキソスタットの効果

17. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会
2015年10月22日～2015年10月23日 富山国際会議場(富山県・富山市) 國分直樹、辻井雅也、横山弘和、中西巧也、飯野隆大、須藤啓広

Bone morphogenetic protein-7, teriparatide (PTH(1-34))の末梢神経再生における Schwann 細胞に対する作用の検討

18. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会
2015年10月22日～2015年10月23日 富山国際会議場(富山県・富山市) 中西巧也、辻井雅也、飯野隆大、國分直樹、横山弘和、須藤啓広

マウス筋芽細胞の酸化ストレス障害に対する edaravone 投与の効果

19. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会
2015年10月22日～2015年10月23日 富山国際会議場(富山県・富山市) 飯田 竜、辻井雅也、吉田智朗、國分直樹、植村和司、須藤啓広

閉経後女性の橈骨遠位端骨折後の骨代謝の検討 血清低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC), 尿中NTXの解析結果

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻井 雅也 (TSUJII, Masaya)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40444442

(2)研究分担者

須藤 啓広 (SUDO, Akihiro)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60196904

長谷川正裕 (HASEGAWA, Masahiro)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40308664

(3)連携研究者

()

研究者番号: