

分担研究報告書

サルコペニアに関する危険因子の解明と簡便な診断法の確立

研究分担者 下方 浩史

独立行政法人国立長寿医療研究センター予防開発部長

研究要旨 今年度は、加齢による筋量変化の実態を解明するとともに、サルコペニアの基準値作成および診断方法の開発を行った。無作為抽出された40歳以上の男女地域住民2,419名を対象としたDXAによる判定では、男性の25.0パーセントが、女性の24.2パーセントがサルコペニアに分類された。男性では加齢とともにサルコペニアの割合は増加していたが、女性では加齢による変化はなかった。サルコペニアの簡易基準の作成は、体力や身体計測値から中程度のPhysical performanceに支障が生じる可能性のある集団を捉えることを目指した。その結果、普通歩速度1m/s未満、もしくは握力が男性25kg未満、女性20kg未満である場合には脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、BMI 18.5kg/m²未満、もしくは下腿囲30cm未満である場合をサルコペニアとした。65歳以上の男女の5.3パーセントがサルコペニアとされた。

A. 研究目的

老化に伴う筋量減少（サルコペニア）は、高齢者のADLを低下させ、健康長寿を実現の大きな障害となる。しかし、老化に伴う筋量減少の実態は明らかでなく、またサルコペニア自体の簡便な基準がない。臨床の現場や住民調査などで使用できる簡便なサルコペニアの基準が必要である。さらにサルコペニアを予防するためには、その危険因子を明らかにしていく必要がある。これらの検討を10年以上にわたって継続されている一般住

民のコホートのデータを使用して解明する。

今年度は、加齢による筋量変化の実態を解明するとともに、サルコペニアの基準値作成および診断方法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 対象

「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」第5次調査参加者 40-88歳までの地域在住中高年者2,419名（男性1,200名、

表 1. 対象者の性年齢別分布

年齢	男性	女性	合計
40 - 49	279	295	574
50 - 59	289	277	566
60 - 69	274	281	555
70 - 79	283	278	561
80 -	75	88	163
合計	1,200	1,219	2,419

女性 1,219 名) を対象とした (表 1)。これらの参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の地域住民からの無作為抽出者である。

2. 測定項目

①身体計測値

- ・上腕囲：肩峰と肘頭下縁の間で肩峰から 60% の位置の高さにおける水平周径囲
- ・臍位腹囲：臍を通る部位での腹部周囲長
- ・大腿囲：鼠径皺壁と膝蓋骨上縁の midpoint (50%)、両足のかかとを 5~10cm 離して立ち、体重を両足にほぼ均等にかけた上体で測定する
- ・下腿囲：下腿の最大囲

②体力

- ・普通歩速度 (m/sec)
- ・速歩速度 (m/sec)
- ・上体起こし (回/min)
- ・膝伸展筋力 (kg)
- ・脚伸展パワー (watt)
- ・握力 (kg) 利き手

③Physical performance

SF36 の physical performance 項目を用いた。具体的な項目は以下の通りである。軽度：体を前に曲げる、百メートル以上歩く、中等度：適度の運動、階段を 1 階上まで登る、数百メートル以上歩く、高度：階段を数階上まで登る、激しい運動、少し重い物を運ぶ、1 キロ以上歩く。

④サルコペニア指標

Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (QDR 4500, Hologic) によって四肢除脂肪・除骨重量測定し、これを四肢筋量とした。Baumgartner ら (1998) の方法に準じ、四肢筋量 (kg) を身長 (m) の二乗で除した値を Skeletal Muscle Index (SMI) とし、サルコペニアの指標とした。その判定基準には同じ QDR 4500, Hologic で測定した Sanada ら (2010) による YAM (Young Adult Mean: 18~40 歳) の -2SD: 男性 6.87 kg/m²、女性 5.46kg/m² をサルコペニアの有無の判定基準とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立長寿医療研究センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、調査の対象者全員

からインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

①サルコペニアの性・年代別頻度

DXAによるSMIでの診断基準（YAMの-2SD）で求めたサルコペニアの有無を、性・年代別の分布をみた（図1）。男性では25.0パーセントが、女性では24.2パーセントがサルコペニアであり、全体の割合には、性差はなかった。年代別の検討では、男性では加齢とともにサルコペニアの頻度は高くなっていったが（ p trend <0.0001）、女性では加齢変化はなかった（ p trend NS）。

②性・年代別SMI

男性のSMIの平均値±SDは7.42±0.83 kg/m²、女性は5.96±0.73 kg/m²であり、男性の方が有意に高い値であった（ p <0.0001）。男性では加齢とともにSMIは低下していったが（ p trend <0.0001）、女性では加齢変化はなかった（ p trend NS）（図2）。

③筋力の加齢変化

男女ともに年齢が高いほど握力は低下していた（ p trend <0.0001）。男性の方が低下率は大きかったが、80代でも女性の40代の握力よりも大きかった（図3）。

膝伸展筋力についても握力と同様に、男女ともに加齢とともに低下していた。男性の方が低下率は大きかったが、男性の80代でも女性の40代とほぼ同じ値であった（図4）。

④SMIと身体測定値、アルブミンとの相関解析

SMIに影響を与える変数を求めると

ともに、SMIを推定するための簡便な式の作成を行うために、SMIと身体測定値、アルブミンとの相関解析を行った（図5）。SMIは上腕囲、下腿囲、大腿囲、腹囲BMIと強い相関があったが、アルブミンとは相関はなく、体脂肪率（%Fat）とは弱い相関が認められた。

SMIと最も相関が強かったのはBMIであり、相関係数は男性で0.77、女性で0.73と高かった。周囲長では女性で下腿囲が最も相関が強く、男性では上腕囲、下腿囲、大腿囲で相関係数はほぼ同じ値となった。

65歳以上の男女について、年齢、BMI、下腿からSMIを推定する重回帰式の作成を試みた。その結果、以下の回帰式を得ることができた。

$$\text{男性：SMI} = -0.1026 \times \text{年齢} + 0.1341 \times \text{BMI} + 0.6034 \times \text{下腿囲} + 2.5653$$
$$(\text{r}^2 = 0.651)$$

$$\text{女性：SMI} = -0.0413 \times \text{年齢} + 0.0513 \times \text{BMI} + 0.4438 \times \text{下腿囲} + 0.5509$$
$$(\text{r}^2 = 0.558)$$

D. 考察

European consensus（2010）のサルコペニアの簡易基準を参考に、日本人の一般地域住民でPhysical performanceに支障が生じる可能性のある集団を捉えることを目指して、独自の基準を作成した。判定に使用する項目は、簡便な器具で簡単に測定できるものとした。さらに、Muscle performanceとMuscle volumeを分けて考えることとし、

Muscle performanceは普通歩速度と握

力で評価し、Muscle volume は測定が困難な SMI の代わりに BMI と下腿囲で評価することとした。

図 6 に示すように、まず普通歩速度 1m/s 未満、もしくは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満である場合には脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、BMI 18.5kg/m² 未満、もしくは下腿囲 30cm 未満である場合をサルコペニアとした。

今回の検討での対象者について、この基準を当てはめてみると、65 歳以上の男女 944 名のうち、23.6 パーセント (223 名) が脆弱高齢者であり、さらに全体の 5.3 パーセント (50 名) が、サルコペニアと診断された。その内訳は男性 9 名 (男性全体の 1.9 パーセント)、女性 41 名 (女性全体の 8.7 パーセント) と女性で割合が高くなっていた。

ここに示したサルコペニアの簡易基準案は、身長、体重、握力計とメジャー、ストップウォッチがあれば実施することができる。スクリーニング検査として有用と思われるが、さらに縦断的なデータを用いて、妥当性の検討を行っていききたい。

E. 結論

40 歳以上の男女地域住民 2,419 名を対象とした DXA による判定では、男性の 25.0 パーセントが、女性の 24.2 パーセントがサルコペニアに分類された。男性では加齢とともにサルコペニアの割合は増加していたが、女性では加齢による変化はなかった。サルコペニアの簡易基準の作成は、

体力や身体計測値から中程度の Physical performance に支障が生じる可能性のある集団を捉えることを目指した。その結果、普通歩速度 1m/s 未満、もしくは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満である場合には脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、BMI 18.5kg/m² 未満、もしくは下腿囲 30cm 未満である場合をサルコペニアとした。65 歳以上の男女の 5.3 パーセントがサルコペニアとされた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

- 1) 下方浩史、安藤富士子：サルコペニアのスクリーニング指標、サルコペニアの基礎と臨床。鈴木隆雄 (監修)、島田裕之 (編集) 真興交易、東京 (印刷中)
- 2) 下方浩史、安藤富士子：サルコペニアの疫学。Modern Physician (印刷中)
- 3) 李成喆、金興烈、森あさか、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の下肢筋力と重心動揺の関連に関する横断的検討。日本未病システム学会誌 (印刷中)
- 4) 金興烈、李成喆、森あさか、安藤富士子、下方浩史：歩行速度 (無次元速度) の性差と年代差に関する考察。日本未病システム学会誌 (印刷中)
- 5) 安藤富士子、北村伊都子、金興烈、李成喆、下方浩史：潜在性慢性炎症と中高

年者のサルコペニアに関する縦断的検討.
日本未病システム学会誌 (印刷中)

6) 下方浩史、安藤富士子: 運動器疾患の長期縦断疫学研究. ロコモティブシンドローム - 運動器科学の新時代. 医学のあゆみ 235(5); 319-324, 2011.

7) 下方浩史、安藤富士子: 運動器疾患の長期縦断疫学研究. ロコモティブシンドロームと生活習慣病. *Progress in Medicine* 30(12); 3021-3024, 2010.

8) 下方浩史、安藤富士子: 疾病予防のための理想的生活. 生活習慣改善による疾病予防 - エビデンスを求めて. 成人病と生活習慣病 40(9); 1026-1031, 2010.

9) 下方浩史、安藤富士子: 虚弱の危険因子、高齢者の虚弱 - 評価と対策 -. *Geriatric Medicine* (印刷中)

10) Doyo W, Kozakai R, Kim H-Y, Ando F, Shimokata H: Spatio-temporal components of the three-dimensional gait analysis of community-dwelling middle-aged and elderly Japanese: age- and sex-related differences. *Geriatr Gerontol Int* 11(1); 39-49, 2011.

11) 原田敦、松井康素、下方浩史: 認知症高齢者と骨粗鬆症との関連は? 認知症高齢者の転倒予防. 日本医事新報社、東京 (印刷中)

12) 竹村真里枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史: 一般住民における動脈硬化と骨粗鬆症の関連. *Osteoporosis Japan* 18(2); 228-231,

2010.

2. 学会発表

1) 竹村真里枝、松井康素、原田敦 安藤富士子、下方浩史: 「歩けば骨は強くなる?」 - 地域住民における一日歩数と骨密度との関連 -、第 83 回日本整形外科学会学術総会、東京、2010 年 5 月 27 日.

2) 松井康素、竹村真里枝、原田敦 安藤富士子、下方浩史: 膝関節 Xp 変形程度と膝関節痛 - 地域在住中高年者対象大規模コホートでの性・年代別比較、第 83 回日本整形外科学会学術総会、東京、2010 年 5 月 29 日.

3) 下方浩史: 老化に関する長期縦断疫学研究 - 老化と老年病の予防を目指して、第 3 回東京アンチエイジングアカデミー、東京、2010 年 6 月 5 日.

4) 下方浩史: 国立長寿医療センター・老化に関する長期縦断疫学研究 (NILS-LSA) からみえてくるもの. 第 52 回日本老年社会学会市民公開講座、大府、2010 年 6 月 18 日.

5) 飛田哲朗、原田敦、松井康素、酒井義人、竹村真里枝、寺部靖人、下方浩史: Sarcopenia (筋肉減少症) の脊椎骨折患者における現状. 第 52 回日本老年医学会学術集会・総会、神戸、2010 年 6 月 26 日

6) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史: 変形性膝関節症変化と身体機能の関連. 第 52 回日本老年医学会学術集会・総会、神戸、2010 年 6 月 26 日

7) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：変形性膝関節症変化と身体機能の関連。第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、宜野湾市、2010年7月2日。

8) 安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の血清カロテノイドと骨密度に関する横断的検討。第32回日本臨床栄養学会、2010年8月28日、名古屋。

9) 小坂井留美、道用亘、金興烈、安藤富士子、下方浩史：高齢期までの運動習慣の継続と体力との関連。第65回日本体力医学会大会、2010年9月18日、市川。

10) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：骨量減少および骨粗鬆症の発症リスクに及ぼす下肢筋力の影響－地域在住中高年者を対象とした疫学縦断調査より。第11回日本骨粗鬆症学会、2010年10月21日、大阪。

11) 安藤富士子、北村伊都子、金興烈、李成喆、下方浩史：潜在性慢性炎症と中高年者のサルコペニアに関する縦断的検討。第17回日本未病システム学会学術総会、2010年11月13日、那覇

12) 李成喆、金興烈、森あさか、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の下肢筋力と重心動揺の関連に関する横断的検討。第17回日本未病システム学会学術総会。第17回日本未病システム学会学術総会、2010年11月13日、那覇

13) 金興烈、李成喆、森あさか、安藤富士子、下方浩史：歩行速度（無次元速度）

の性差と年代差に関する考察。第17回日本未病システム学会学術総会、2010年11月13日、那覇（研究奨励賞）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

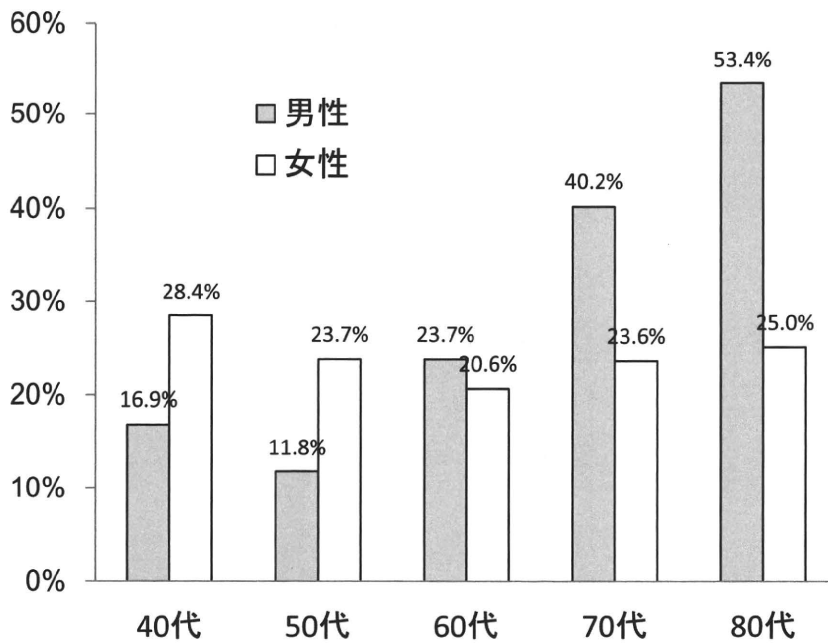


図1. サルコペニアの性・年代別頻度

DXAによるSMIでの診断基準による(YAMの-2SD)。男性では加齢とともにサルコペニアの頻度は高くなっていったが(p trend<0.0001)、女性では加齢変化はなかった。

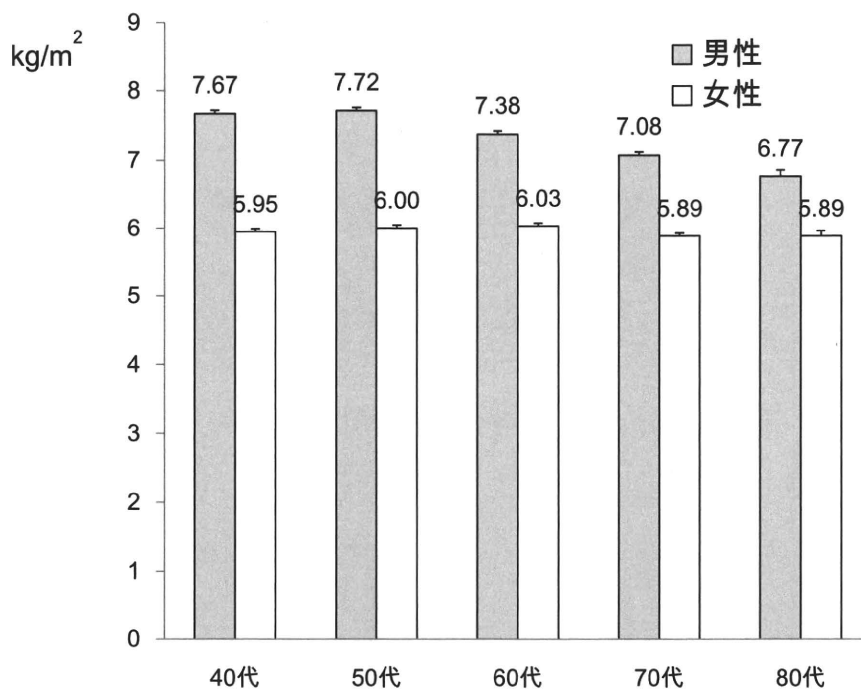


図2. 性・年代別 SMI

男性では加齢とともにSMIは低下していたが(p trend<0.0001)、女性では加齢変化はなかった。

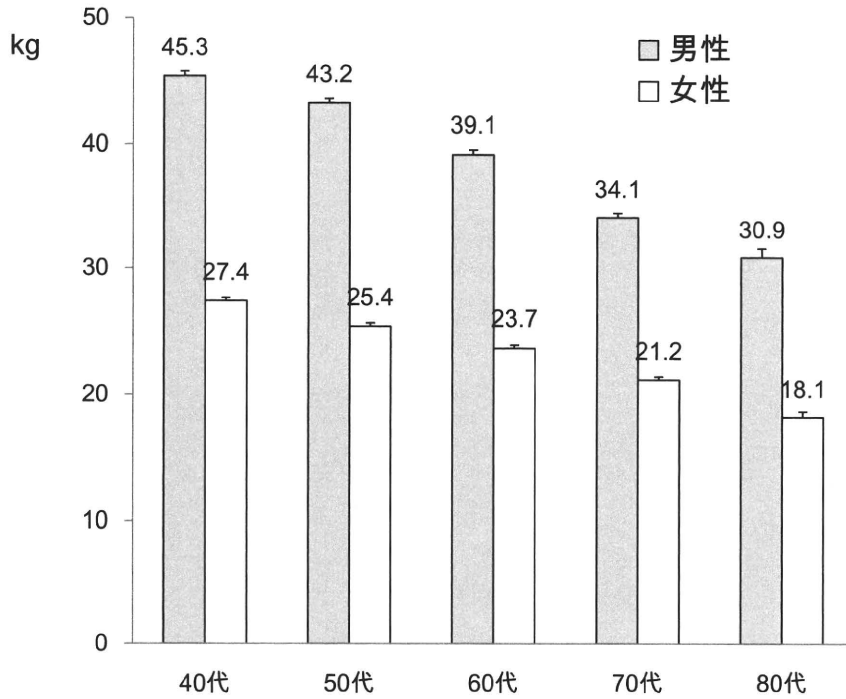


図 3. 性・年代別 握力

男女ともに年齢が高いほど握力は低下していた ($p \text{ trend} < 0.0001$)。男性の方が低下率は大きかったが、80代でも女性の40代の握力よりも大きかった。

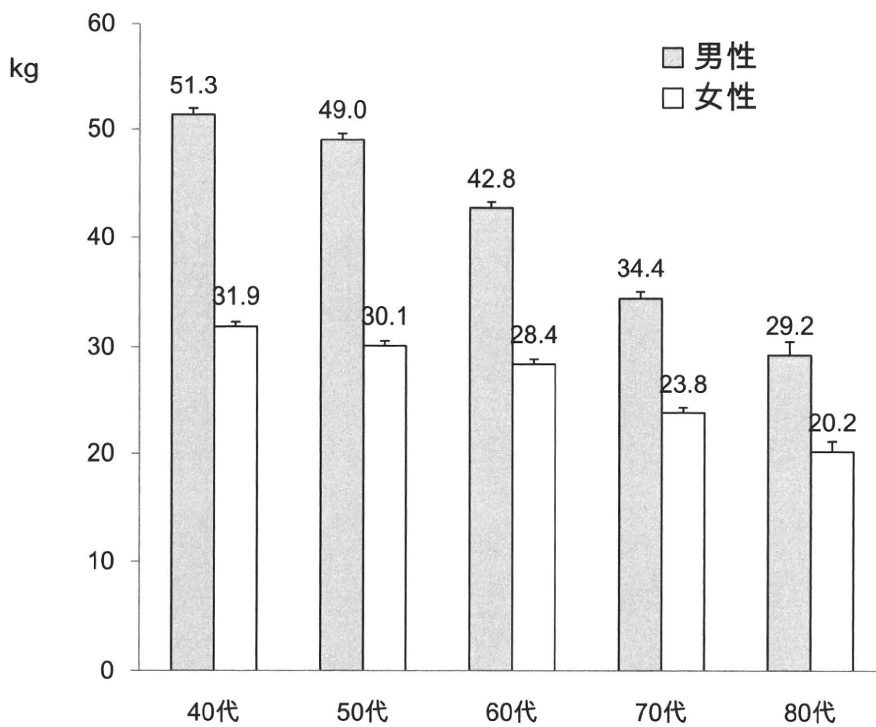


図 4. 性・年代別 膝伸展筋力

男女ともに年齢が高いほど膝伸展筋力は低下していた ($p \text{ trend} < 0.0001$)。男性の方が低下率は大きかったが、80代でも女性の40代とほぼ同じ値であった。

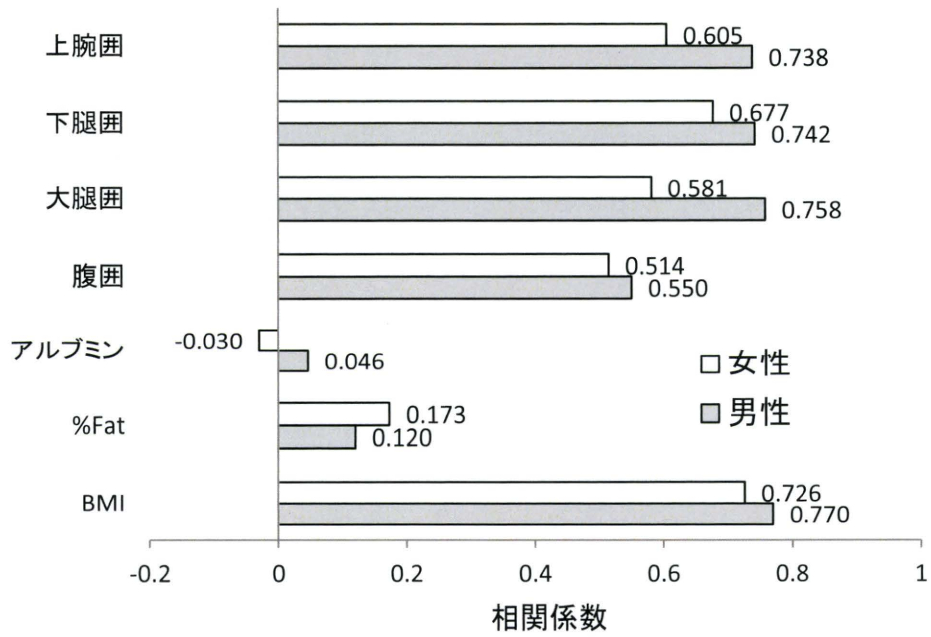


図 5. SMI と身体測定値、アルブミンとの相関係数(65 歳以上)

SMI は BMI との相関が強かった。また周囲長では女性で下腿囲の相関が最も高かった。

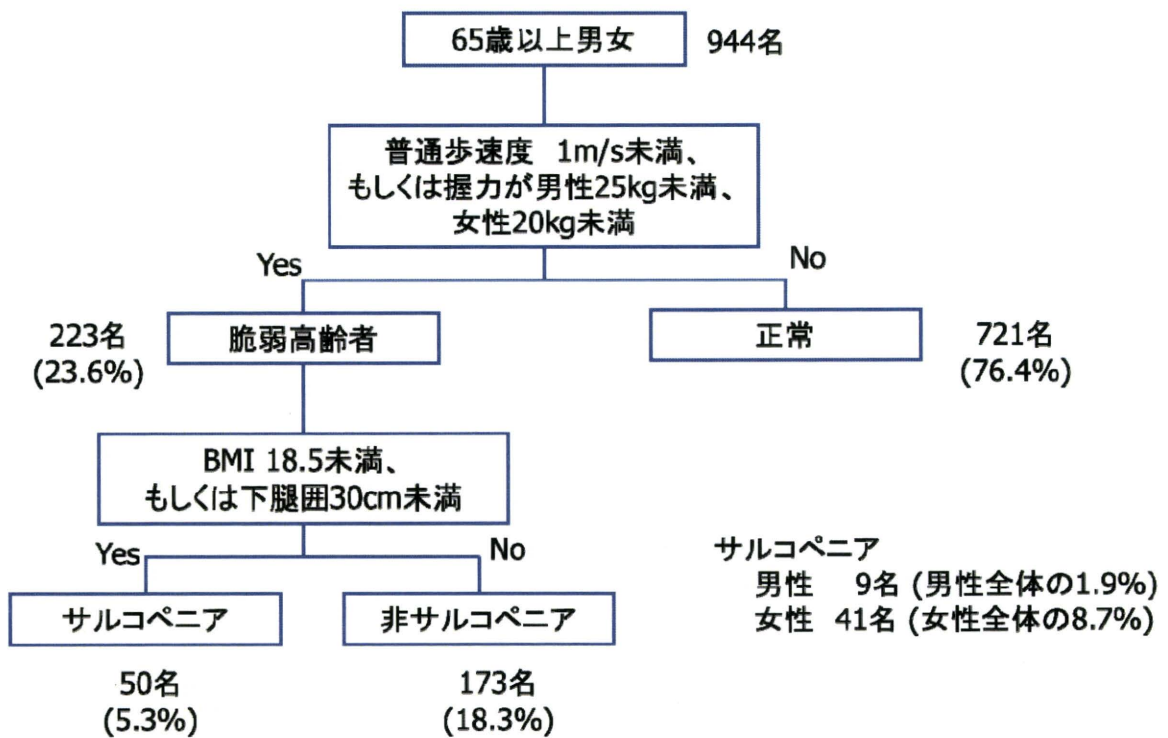


図 6. サルコペニアの簡易基準案と、一般住民での分布

分担研究報告書

骨格筋幹細胞の SP における役割の解明

研究分担者 橋本 有弘

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所 再生再建医学研究部長

研究要旨 加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を解明するために、高齢者由来筋幹細胞の不死化を試みた。橋本らによって開発されたヒト筋幹細胞の不死化技術、three factor method を適用することによって、75 歳男性および 86 歳女性の腹直筋から分離した筋幹細胞を不死化することに成功した。さらに、セルソーターによる細胞分画および細胞クローン化によって、複数の後期高齢者由来不死化筋細胞クローンを分離樹立することに成功した。

A. 研究目的

加齢にともなう筋再生能力の低下は、サルコペニアの発症と密接に関わっていると考えられる。筋再生には、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の働きが必須であるが、後期高齢者の筋幹細胞の性質については、解明が進んでいない。本分担研究では、後期高齢者骨格筋から分離した筋幹細胞の性質を、分子・細胞生物学的および病理学的に解析し、サルコペニアにおける筋幹細胞の役割を明らかにする。さらに、研究成果をもとに「骨格筋幹細胞を標的としたサルコペニアに対する新たな予防法ならびに重度化防止法」を提案する。

B. 研究方法

① ヒト筋幹細胞の分離と初代培養

国立長寿医療センターにおいて泌尿器科疾患のため開腹手術を受けられる方で、本人からの同意が可能な方を対象とした。なお、梅毒や肝炎などの感染症に罹患している方および主治医が不相当と認めた方は対

象から除外した。同意が得られた方について、全身麻酔下での開腹手術時に、切開部の腹直筋あるいは錐体筋を1 g程度摘出した。

筋組織は細切後、15分間のタンパク質分解酵素処理を2回行い、筋幹細胞を分離した。骨格筋30-40mgに由来する細胞を、I型コラーゲンを塗布したプラスチック培養皿に播き、37℃、10%CO₂の気相下で静置培養した。培養液は、Primary myocyte growth medium (pmGM) (Wada et al., 2002) を用いた。筋分化を誘導する場合は、1x10⁵細胞を35-mm培養皿に播き、2日後に培地をPrimary myocyte differentiation medium (pmDM) に交換し、6-7日間培養した。

② 不死化ヒト筋細胞の純化およびクローン化

不死化後の細胞集団に含まれる筋細胞の割合を、抗ヒト NCAM 抗体を用いたフローサイトメトリーによって検討した。NCAM 陰性非筋細胞の混在率が 50%を越える場合は、抗ヒト NCAM 抗体を用いたフローサイトメ

トリーによって NCAM 陽性細胞を分離し、さらに低密度培養による細胞クローニングを行った。NCAM 陰性非筋細胞の混在率が 50% 以下の場合、フローサイトメトリーを介さずに細胞クローニングを行った。

(倫理面への配慮)

ヒト骨格筋組織の採取に関しては、国立長寿医療センターの倫理委員会の承認および大分大学 IRB の承認を受けた。臨床研究に関する倫理指針に則り、患者に対しては、文書を用いて説明し、患者本人より文書にて同意を得た。

C. 結果

① 後期高齢者筋組織からの筋幹細胞の分離

75 歳男性および 86 歳女性の腹直筋から分離した初代培養細胞の筋分化能を検討したところ、筋管細胞が形成され、分化特異的な myosin heavy chain 遺伝子の発現が確認された。75 歳以上の後期高齢者筋組織にも、(1) 増殖・分化能を有する筋幹細胞が存在し、(2) 分離培養することが可能であることが明らかになった。

② 後期高齢者筋細胞の不死化

初代培養ヒト筋細胞は、継代に伴い速やかに増殖能、分化能を失ってしまうため、詳細かつ再現性の担保された解析を行うことは困難であった。我々は、初代培養ヒト筋細胞の増殖停止機構を解析し、ヒトテロメラーゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺伝子およびヒト cyclin D1 遺伝子を導入することによって、ヒト筋細胞を、分化能を保持したまま不死化できることを明らかにした (Shiomi, et al., 印刷中)。この不死化法を用いて、75 歳男性および 86 歳女性の腹直筋から分離した初代培養筋細胞を不死化することに成功した。得られた後期高齢者

由来不死化筋細胞は、高い分化能を示し、成熟筋線維の特徴である横紋構造の形成も認められた。

(倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

D. 考察

75 歳男性および 86 歳女性の腹直筋から筋幹細胞を分離し、初代培養することに成功した。さらにそれらの初代培養筋細胞を、筋分化能を保ったまま不死化し、複数の筋細胞クローンを樹立した。ヒト初代培養筋細胞の増殖には制限があるため、ヒト未分化筋細胞 (筋幹細胞、筋前駆細胞) の性質に関しては、解明が進んでいない。分担研究者の橋本は、世界にさきがけて、正常ヒト筋前駆細胞を 分化能を保持したまま不死化することに成功した。今回、後期高齢者筋組織から分離した筋細胞を不死化することにより、加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を検討するための、優れた解析系を確立することができた。分化能を保持した正常ヒト筋細胞株の樹立に関しては、これまでに我々 (橋本ら) と Wright らの報告があるのみである。我々は、すでに 20 歳代、40 歳代の筋組織に由来する不死化筋細胞を樹立しており、今後さらに整備を進めて、ヒト筋幹細胞の加齢にともなう変化を解析するための「正常筋細胞パネル」を構築する得予定である。

E. 結論

高い増殖・分化能を保持した不死化筋細胞クローンを、後期高齢者筋組織から分離・樹立することに成功した。後期高齢者の筋組織に含まれる筋幹細胞の増殖・分化

特性を解明するための、有力な解析系が確立できた。

F. 健康危険情報
総括報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表 (詳細は分担研究報告を参照)
Suzuki, Y., Nakayama, K., Hashimoto, N.
and Yazawa, I. (2010)

Proteolytic processing regulates
pathological accumulation in
dentatorubral-pallidolusian
atrophy
FEBS J. 27:4873-87.

Yanagisawa, M., Mukai, A., Shiomi, K.,
Song, Si-Y., and Naohiro Hashimoto
(2011)

Community effect triggers terminal
differentiation of myogenic cells
derived from muscle
satellite cells by quenching Smad
signaling
Exp. Cell Res. 317: 221-233.

Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K.,
Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S.,
Shimizu, S. and
Hashimoto, N (2011)

Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic
cells to recapture growth property
without
compromising differentiation potential
Gene Therapy (in press)

2. 学会発表

橋本有弘、柳澤美智子

第 43 回日本発生生物学会大会 2010 年 5
月京都

橋本有弘、岡村菊夫、塩見浩介
泌尿器科再建再生研究会 2010 年 6 月 19
日 札幌

塩見浩介、橋本有弘
第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月
神戸

他 3 題

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

「液性因子とサルコペニア」

研究分担者 秋下雅弘 東京大学大学院医学系研究科加齢医学 准教授

研究要旨

4 週間の中程度の運動により、マウスのヒラメ筋におけるアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現は有意に増加していた。また、マウス骨格筋細胞である C2C12 細胞においても電気刺激装置を用いた周期的な細胞収縮誘導によりアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現は有意に増加した。運動にともなうアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現上昇は、AMPK とユビキチン/プロテオソーム経路による負に、MEK/ERK 経路により正に制御されていた。高齢女性 26 例（平均 77 歳）において、四肢骨格筋量（DXA）と血清レプチン濃度の間に有意な負の相関を認めた。レプチンはサルコペニアのマーカーとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

サルコペニアに関与する液性因子の探索とその作用機序を明らかにすることが本研究の目的である。今年度は、筋肉増強効果を有することが知られているアンドロゲンの作用機構の解明に関する基礎研究と液性因子を探索する臨床研究を行った。

アンドロゲンは骨格筋肥大作用をもつが骨格筋におけるアンドロゲン受容体の発現調節機構は明らかではない。マウス骨格筋細胞 cell line である C2C12 細胞ならびにマウスヒラメ筋をもちいて、骨格筋におけるアンドロゲン受容体の発現調節機構について検討をおこなった。また、サルコペニアの診断、病態に有用なバイオマーカーは明らかになっていない。高齢女性を対象に、身体測定値、身体機能、骨格筋量、脂肪量、血中レプチン濃度について相互の関連を横断的に解析した。

B. 研究方法

研究 I：アンドロゲンの筋肉増強作用に関する基礎研究

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞をもちいた。電気刺激装置を用いて周期的な細胞の収縮を誘導し疑似運動刺激とした。個体レベルの検討として、C57/BL マウスをもちいた。トレッドミル装置を用いて運動負荷をおこなった。アンドロゲン受容体の発現はタンパクレベルを

ウエスタン解析にて、mRNAレベルを定量的リアルタイムRT-PCR法にておこなった。

(倫理面への配慮) 東京大学の動物実験に関する倫理指針にそって本実験はおこなわれた。

研究Ⅱ：サルコペニアの液性因子を探索する臨床研究

1. 対象；都内診療所において老人健診を受診したADLが保たれている65歳以上で、本研究への参加同意が得られた高齢女性26例（平均年齢76.7±6.3歳）。除外規定は以下のとおり：心不全、腎不全（血清Cr \geq 1.5mg/dL）、悪性腫瘍、腸管手術の既往、内分泌疾患、血清Alb \leq 3.0mg/dL、Hb \leq 10.0g/L、ホルモン薬(ステロイドを含む)、インスリン、インスリン抵抗性改善薬、 β 遮断薬、 β 刺激薬、 α 遮断薬服用者。

2. 身体計測、身体機能測定とDual-energy X-ray Absorption (2重エネルギーエックス線吸収測定法：DXA)、血清中レプチン濃度測定；身体測定として、身長、体重、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径、上腕周囲径、上腕三頭筋皮下脂肪厚、大腿周囲径、下腿周囲径を測定し、BMIを計算した。身体機能検査として、握力、開眼片足立ち、Up and go test、歩行速度(4m)、脚伸展筋力を測定した。DXA法にて、四肢骨格筋量指標（身長²で補正）ならびに体幹部脂肪量指標（身長²で補正）を測定した。血清中レプチン濃度は、空腹時採血にてELISA法にて測定した。

3. データ解析；データはすべて平均値 \pm SDで表した。各身体測定値、各身体機能測定値、四肢骨格筋量指標、体幹部脂肪量指標、血中レプチン濃度をもちいて、単相関分析をおこなった。さらに、血中レプチン濃度について、他の因子を説明変数とした重回帰分析をおこなった。

(倫理面への配慮) 実施施設（医療法人秀行会）の倫理委員会の承認のもと、本試験への参加について本人から書面の同意を得て行った。

C. 研究結果

研究Ⅰ：アンドロゲンの筋肉増強作用に関する基礎研究

8週齢のマウスに対し、週5回の中等度の運動負荷（トレッドミル 12-18m/分、40分間/回）を4週間加えることにより、コントロールマウスに比べてヒラメ筋におけるアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現は有意に増加していた。興味深いことに、アンドロゲン受容体のmRNAレベルには、運動負荷による変化はみとめられなかった。C2C12細胞において、周期的電気刺激によりアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現は、コントロールレベルに対して有意に増加した。同様にアンドロゲン受容体のmRNAレベルに変化は認められなかった。AMPK阻害薬（compound C）の前処置により電気刺激によるアンドロゲン受容体のタンパクレベル上昇はさらに増強し、AMPK活性化薬（AICAR）により電

電気刺激による増強反応は消失した。MEK/ERK経路阻害薬（PD98059）の前処置により電気刺激によるアンドロゲン受容体タンパクレベルの増強反応は消失した。プロテオソーム阻害薬（MG132）の存在下では、電気刺激によるアンドロゲン受容体タンパクレベルの増強反応は認められなかった。

研究Ⅱ：サルコペニアの液性因子を探索する臨床研究

平均BMI値は、 21.9 ± 2.1 (kg/m²)、平均四肢骨格筋量指標は、 5.65 ± 0.52 (kg/m²)であった。四肢骨格筋量指標と下腿周囲径の間に、有意な正の相関が認められた ($r=0.71$, $p<0.01$)。同様に四肢骨格筋量指標と握力の間にも、有意な正の相関が認められた ($r=0.55$, $p<0.05$)。四肢骨格筋量指標とBMIの間には有意な相関は認められなかった。既報と同様に、血清レプチン濃度と体幹脂肪量指標との間に、有意な正の相関が認められた ($r=0.83$, $p<0.01$)。大変興味深いことに、血清レプチン濃度と四肢骨格筋量指標の間に、有意な負の相関が認められた ($r=-0.56$, $p<0.05$)。血清レプチン濃度に対する重回帰分析によれば、体幹脂肪量指標が独立した正の ($\beta=0.72$, $p<0.01$)、四肢骨格筋量指標が独立した負の ($\beta=-0.4$, $p<0.05$) 説明変数であった。

D. 考察

研究Ⅰにおいて、運動刺激がアンドロゲン受容体のタンパクレベルの発現を増強させることを明らかにした。運動とアンドロゲン自身はともに骨格筋肥大、維持に重要な役割をはたしていることから、骨格筋における運動とアンドロゲンの作用は、お互いのクロストークが存在している可能性がある。

メカニズムについては、AMPK阻害薬にて発現が増強し活性化薬にて消失したことから、AMPKが負の調節因子として、またPD98059前処置により電気刺激によるアンドロゲン受容体の発現増強が消失したことから、ERKが正の調節因子として関与していることが明らかになった。また、大変興味深いことに、運動によるmRNAレベルの変化は認められなかったこと、プロテオソーム阻害薬の存在下では電気刺激によるアンドロゲン受容体タンパクの発現上昇は認められなかったことから、運動にともなうユビキチン/プロテオソーム経路の抑制を介したアンドロゲン受容体タンパクの分解抑制がおきている可能性がある。

今後の検討として、培養細胞レベルにてみとめられたメカニズムが、マウス個体レベルにおいても、運動による骨格筋におけるアンドロゲン受容体の発現上昇に関与するかどうかを検証することが重要であると考えられた。

研究Ⅱの横断臨床研究において、高齢女性における血清レプチン濃度が、DXA法から求めた体幹部脂肪量指標と正の相関を示すこと、四肢骨格筋量指標と負の相関を示すことが明らか

かになった。このことは、高齢女性において、レプチンはサルコペニア、特に肥満を合併する **sarcopenic obesity** のバイオマーカーとなる可能性を示唆するものと思われる。

レプチンは、もともと脂肪細胞特異的に産生される分泌タンパクとして同定されたものであり、中枢神経系に作用し食欲を負に制御するとともに、交感神経系を活性化させることにより全身のエネルギー消費を亢進させる作用があることが知られている。さらに、レプチンの受容体は、神経系以外にも、骨格筋を含む種々の組織、細胞に発現していることが明らかになっており、そのことからいわゆる”末梢”作用の存在が想定されているが、その詳細は明らかにはなっていない。今回の検討において、血中レプチン濃度と骨格筋量の間、有意な負の相関が認められたことから、レプチンが骨格筋の維持に対して負に作用する可能性がある。このことを明らかにするためには、細胞や実験動物をもちいた基礎研究が必要と思われる。

本研究の限界としては、サンプル数が少数であること、高齢の女性に限定した検討であること、デザインが横断研究であることなどがあげられる。今回得られた知見を確認するため、今後、一般成人や男性もふくめたより多数例を対象とした同様の検討が必要である。さらに、栄養や運動介入をおこなうことにより、骨格筋量、脂肪量、血中レプチン濃度がどのように変化するかを詳細に解析することにより、レプチンのサルコペニアマーカーとしての意義やサルコペニアの病態における役割がより明らかになるものと思われる。

E. 結論

運動刺激により、骨格筋におけるアンドロゲン受容体の発現が上昇する。そのメカニズムとして、AMPKとユビキチン/プロテオソーム経路が負の調節因子として、MEK/ERK経路が正の調節因子として重要である。

高齢女性において、レプチンはサルコペニア、特に肥満を合併する **sarcopenic obesity** のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukai S, Akishita M, Yamada S, Ogawa S, Yamaguchi K, Kozaki K, Toba K, Ouchi Y. Plasma sex hormone levels and mortality in disabled older men and women. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Dec 10. [Epub ahead of print].
- 2) Nagai K, Kozaki K, Sonohara K, Akishita M, Toba K. Relationship between interleukin-6 and cerebral deep white matter and periventricular hyperintensity in elderly women. *Geriatr Gerontol Int*. 2011 Jan 25. [Epub ahead of print].
- 3) Akishita M, Arai H, Arai H, Inamatsu T, Kuzuya M, Suzuki Y, Teramoto S, Mizukami K, Morimoto S, Toba K; Working Group on Guidelines for Medical Treatment and its Safety in the Elderly. Survey on geriatricians' experiences of adverse drug reactions caused by potentially inappropriate medications: Commission report of the Japan Geriatrics Society. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;11:3-7.
- 4) Akishita M. Strict vs. mild blood pressure control in the elderly. *Hypertens Res*. 2010;33:1102-3.
- 5) Nomura K, Eto M, Kojima T, Ogawa S, Iijima K, Nakamura T, Araki A, Akishita M, Ouchi Y. Visceral fat accumulation and metabolic risk factor clustering in older adults. *J Am Geriatr Soc*. 2010;58:1658-63.
- 6) Fukai S, Akishita M, Yamada S, Toba K, Ouchi Y. Effects of testosterone in older men with mild-to-moderate cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 2010;58:1419-21.
- 7) Yamada S, Akishita M, Fukai S, Ogawa S, Yamaguchi K, Matsuyama J, Kozaki K, Toba K, Ouchi Y. Effects of dehydroepiandrosterone supplementation on cognitive function and activities of daily living in older women with mild to moderate cognitive impairment. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10:280-7.
- 8) Urata Y, Goto S, Kawakatsu M, Yodoi J, Eto M, Akishita M, Kondo T. DHEA attenuates PDGF-induced phenotypic proliferation of vascular smooth muscle A7r5 cells through redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:489-94.
- 9) Akishita M, Fukai S, Hashimoto M, Kameyama Y, Nomura K, Nakamura T, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Association of low testosterone with metabolic syndrome and its components in middle-aged Japanese men. *Hypertens Res* 2010;33:587-91.

- 10) Yu J, Akishita M, Eto M, Ogawa S, Son BK, Kato S, Ouchi Y, Okabe T. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: Role of PI3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* 2010;151:1822-8.
- 11) Son BK, Akishita M, Iijima K, Ogawa S, Maemura K, Yu J, Takeyama K, Kato S, Eto M, Ouchi Y. Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification. *J Biol Chem* 2010;285:7537-44.
- 12) Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Low testosterone level as a predictor of cardiovascular events in Japanese men with coronary risk factors. *Atherosclerosis* 2010;210:232-236.

2. 学会発表

- 1) 秋下雅弘 (シンポジウム) : アンドロゲンの血管作用とその性差. 日本性差医学・医療学会, 下関, 2011. 2. 6
- 2) 秋下雅弘 (シンポジウム) : 性ホルモン ; Vasoprotective action of androgen and the role of androgen receptor. 日本血管生物医学会, 大阪, 2010. 12. 1
- 3) 秋下雅弘 (シンポジウム) : テストステロンと生活習慣病 ; テストステロンは寿命を規定する? 日本 Men' s Health 医学会, 東京, 2010. 11. 27
- 4) Akishita M (Symposium) : Frailty in older men - testosterone is the key for care. Men' s Health World Congress, Nice, France, 2010. 10. 30
- 5) 秋下雅弘 (五島雄一郎賞受賞講演) : Sex hormones and atherosclerosis. 日本動脈硬化学会総会・学術集会, 岐阜, 2010. 7. 16
- 6) 秋下雅弘 (シンポジウム) : 認知症予防へのアプローチ～生活習慣病の観点から～ 3. 高血圧管理と認知症予防. 日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010. 6. 25
- 7) 秋下雅弘 (シンポジウム) : 男性ホルモン研究最前線 今年の話. アンドロゲンによる e N O S 活性化機構. 日本抗加齢医学会総会, 京都, 2010. 6. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

東京大学大学院医学系研究科 江頭正人

同上 野村和至

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

(分担) 研究報告書

サルコペニアのバイオマーカーの開発と実用化

重本和宏

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 研究部長

研究要旨

サルコペニア (加齢性筋肉減少症) は高齢者の ADL (activity of daily living) と QOL (quality of life) を損なう主要な原因である。サルコペニアの特徴は加齢による筋肉量低下と筋力低下だが^{1,2)}、我が国において実際に臨床や介護現場で有効に役立つ定義と診断基準のいずれについても確立されていないのが現状である。2010 年ヨーロッパからサルコペニアの定義と診断基準についてコンセンサスが発表された³⁾。内容的には従来から発表されているサルコペニアの曖昧な概念を大きく変えて明確にするような新しいものではなく、また日本人の体格に対してそのまま適用もできないと考えられる。そして、サルコペニアの原因に基づく質的な観点からその診断を可能とするためには、筋力と筋量とは全く別の次元の計測可能なパラメーターの発見が必要であると考えられる。本研究では、そのような背景のもと異なる次元に基づくサルコペニアの新しい診断法の開発を試みる。健全で若い個体の筋は、運動神経切断や廃用性筋萎縮の環境下においても十分回復することが可能である。この筋と運動神経の可塑性には、筋と運動神経の相互維持作用が必要である。サルコペニアに至る過程においてこのメカニズムが破綻している可能性が考えられる。逆行性シグナルを使ったバイオマーカーの開発に向けて、我々はこの筋と運動神経の相互維持作用を MuSK 抗体で発症する重症筋無力症の動物モデルを使って明らかにしたので報告する。

A. 研究目的

1. 筋と運動神経の相互維持メカニズム解明

筋は神経筋シナプスにおいて、運動神経細胞からの神経伝達をアセチルコリン (ACh) の分泌と筋側の ACh 受容体 (AChR) を経て収縮する。筋が維持されるためには、この ACh による順行性のシグナルが必要である。一方、筋側から運動神経終末側への未知の逆行性のシグナルが必要であることが Cajal らによって予想されてい

る。もしこの逆行性シグナルを同定することができれば、筋と運動神経細胞の相互維持のメカニズムとサルコペニアの因果関係を解明することが可能となる。我々はまずこの相互維持のメカニズムについて動物モデルを使って明らかにすることを目的とした。さらに、筋からの逆行性シグナルをバイオマーカーとして利用するためにその探索を行った。

我々は神経筋シナプスの筋側 (後膜) に発現するリセプター型タイロシンカイネースであ