

研究結果報告書

2022年 4月 18日

<研究課題> 骨格筋に対する漢方補剤の効果とその性差の検討

代表研究者 東京大学医学部附属病院老年病科 助教 矢可部 満隆

【まとめ】

マウスの骨格筋由来の筋芽細胞から筋管を作成し、血清除去下で培養して廃用性筋萎縮のモデルとした。テストステロンと補中益気湯(TJ-41)を投与すると、筋萎縮関連因子の発現上昇が抑制された。TJ-41は筋管径の減少を軽減した。筋管を電気刺激するとARの発現上昇とIL-6の発現低下を認め、運動に類似する効果を得られた。TJ-41や運動による筋萎縮の予防効果とそのメカニズムの一端を明らかにした。

1. 研究の目的

サルコペニア(加齢性筋減少症)は超高齢社会において喫緊の課題であるが、その詳細なメカニズムは解明されておらず、治療は確立していない。サルコペニアやフレイルの高齢者に対して漢方薬が投与されることがある。補中益気湯(TJ-41)は「消化機能が衰え、四肢倦怠感著しい虚弱体質者」に用いられるが、作用機序を検討した基礎研究は少ない。性ホルモンの低下がサルコペニアの一因であることが示唆されているが、筋肉に対するアンドロゲンやエストロゲンの作用機序は未解明な点が多い。漢方補剤には抗炎症効果、性ホルモン様作用が報告されている。例えばGinsenoside Rb1は、selective androgen receptor modulatorとして血管平滑筋石灰化を抑制する(Nanao-Hamai M et al. Eur J Pharmacol 2019)。しかし、通常 *in vitro* で用いられるC2C12などの筋芽細胞は遺伝子改変がされており、androgen receptor 導入などの処置を行わなければ性ホルモンの効果を検討することは困難である。

また、運動もサルコペニアやフレイルの予防、改善に有効性が示唆されているが、そのメカニズムの解明は不十分である。

そこで本研究は、オスのマウスから初代筋芽細胞を採取、培養、分化させて筋管を作成し、性ホルモンおよび補剤の効果と作用機序を検証した。さらに電気刺激による擬似的な運動の効果を検証した。

2. 研究方法と経過

2-1 TJ-41の調整

TJ-41(ツムラ)1gをdimethyl sulfoxide(DMSO)10mLに溶解し、Branson sonifier 250を用いて超音波で粉碎して成分を抽出し、遠心した上清を回収した。これをC2C12筋管またはマウスの筋芽細胞から分化させた筋管に投与した。VehicleにもDMSOを用い、濃度は最大でも培地の1/1000とした。

2-2 C2C12細胞の分化

マウス由来の筋芽細胞であるC2C12細胞を増殖培地(DMEM/10% fetal bovine serum/PS, 以下"PM"と記載)により、インキュベーター(37°C, 5%CO₂)で増殖させた。ここではコーティングされていないプレートを用いた。C2C12が80-90%コンフルエントになったところで、培地を分化培地(DMEM/2% horse serum/PS; 以下"DM"と記載)に交換して分化を誘導した。DMは2日ごとに交換した。4-5日後に十分に分化して筋管が形成されてから、実験に用いた。

2-3 骨格筋からの初代培養(primary cell culture)と分化

C57BL/6Jオスマウス8週齢を二酸化炭素により安楽死させ、70%エタノールにより表皮の殺菌を行った。マウスを仰臥位にし、胸骨下と腹部と横隔膜を切開して心臓を剖出し、右心室より採血を行った。下腿静脈を切り、左心室より10ccのPBSを入れて還流した。腹臥位にして背中皮膚を切開して下肢までの皮膚を除去した。下肢の筋を剖出し、腓腹筋とヒラメ筋を摘出し、PBSで洗浄した。

筋肉に付着している脂肪・腱・血管を取り除き、collagenase IIをPMに解いた溶液に浸した。ハサミで筋肉を細かくミンスし、37°C, 5%CO₂で1時間インキュベーションした。18G針を装着した10mlシリンジで骨格筋を懸濁し、さらに15分インキュベーションした。

懸濁液をPMに加えてセルストレーナーで濾過して遠心し、上清を除去した。筋芽細胞用の増殖培地(Ham's F-10/20%FBS/bFGF/PS/2.5μg/mL amphotericin B; 以下"mGM"と表記)で沈殿した細胞を懸濁し、マトリゲルでコーティングされたプレートに蒔いて培養した。

筋芽細胞の純度を高めるため、preplating を行った。すなわち、プレートの筋芽細胞を TryPLE で剥がし、mGM を加えてコーティングされていないプレートに入れて 37°C、5%CO₂ で 45 分間インキュベートした。その後遠心して上清を除去し、新しい mGM を加えてマトリゲルでコーティングされたプレートに蒔いて培養した。この preplating を 2 回繰り返してから実験用に培養した。

マトリゲルでコーティングされた 6-well プレートに蒔き、C2C12 と同じ DM を用いて筋管への分化を誘導した。DM は 2 日ごとに交換し、4 日後に細胞が十分に分化したのを確認してから実験を行った。以下、この primary cell culture により得られた筋管を "PC 筋管" と表記する。

2-4 筋萎縮と運動のモデル

筋管に分化後、培地を血清を含まない DMEM に交換して 24 時間培養した。このように血清中の成分を除去することで筋萎縮を誘導した。

C-PACE EP (IonOptix) を用いて筋管に電気刺激を行うことで、運動のモデルとした。6-well プレートとそれ専用の電極を用い、1Hz、40V、持続時間 2ms の設定で 24 時間の電気刺激を行った。

2-5 PCR

筋管からの Total RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) により行った。RNA に対して DNase I (Fisher Scientific) による処理を行った。逆転写反応を Omniscript RT Kit (Qiagen) と Oligo dT プライマー (Invitrogen) により行い、cDNA を合成した。PCR は得られた cDNA と SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) と特異的プライマーを用いて行い、StepOnePlus (Applied Biosystems) により解析した。

2-6 Western blotting

筋管を PBS によって洗浄し、RIPA buffer に cComplete Mini (Roche Applied Science) と PhosSTOP (Roche Applied Science) を加えた lysis buffer により溶解し、遠心した上清を実験に用いた。タンパク質に NuPAGE (Invitrogen) のサンプルバッファーを加え、95°C で 5 分間加熱し、氷で冷却後に 10% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。ゲルをセミドライ法にて PVDF 膜に転写し、Blocking one (ナカライ) にて室温で 20 分

間ブロッキングし、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後 PVDF 膜を 0.1% Tween/TBS (TBST) で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄し、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) で発光させた。バンドの検出は LuminoGraph 1 (ATTO) により行った。

2-7 F-actin 染色

筋管を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、Actin Green 488 ReadyProbes reagent (Thermo Fisher Scientific) で染色した。蛍光顕微鏡で観察して撮影し、ImageJ により筋管径を計測した。

2-8 倫理審査

本研究は東京大学の動物実験倫理委員会での承認を受けた。実験ではマウスの苦痛が最小限になるように配慮した。

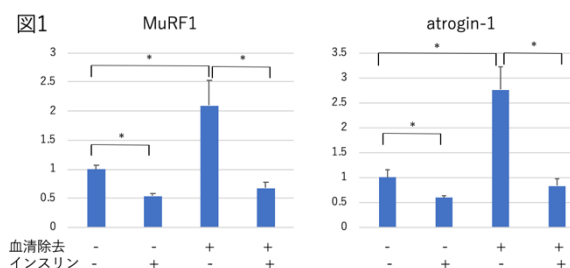
3. 研究の成果

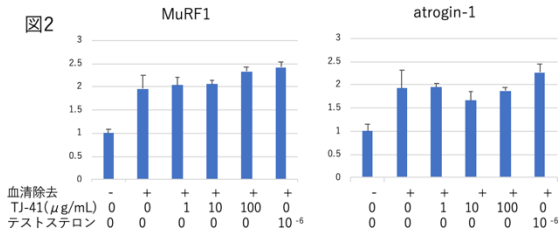
3-1 C2C12 筋管に対する漢方薬の効果

筋管の筋萎縮誘導に関連し、筋萎縮関連因子に着目した。これらは E3 型ユビキチンリガーゼであり、MuRF と atrogen-1 が知られている。後肢懸垂、神経切断、不動などの筋萎縮において発現が上昇し、いずれかをノックアウトしたマウスでは廃用性筋萎縮が抑制されることから、廃用性筋萎縮の促進因子と考えられる。

C2C12 筋管を血清除去下で 24 時間培養することで、MuRF1、atrogen-1 の発現が上昇したが、インスリンを同時に投与するとこれらの発現が有意に低下した(図 1)。(*p<0.05, 以下同じ)

C2C12 筋管に血清除去を行い、テストステロン 10⁻⁶M または TJ-41 を投与したところ、MuRF1、atrogen-1 の抑制は認めなかった(図 2)。



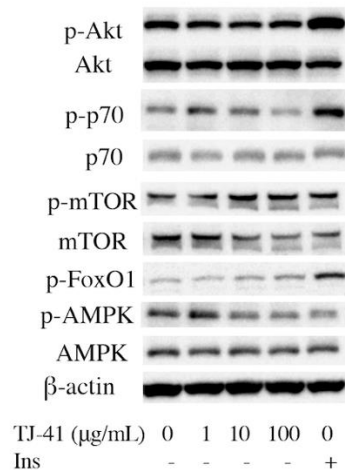
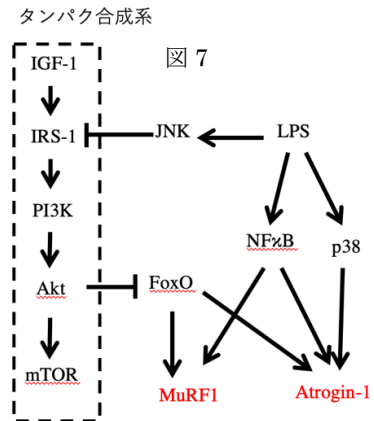
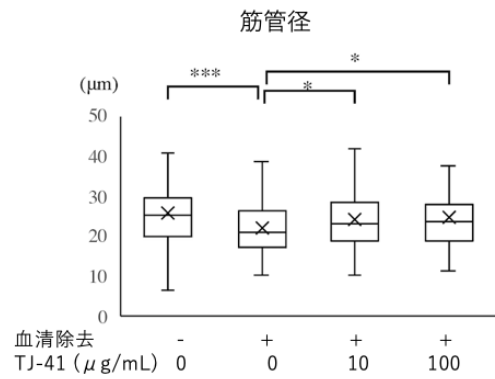
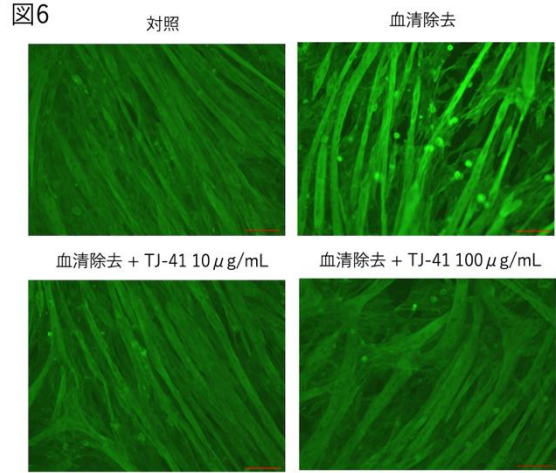
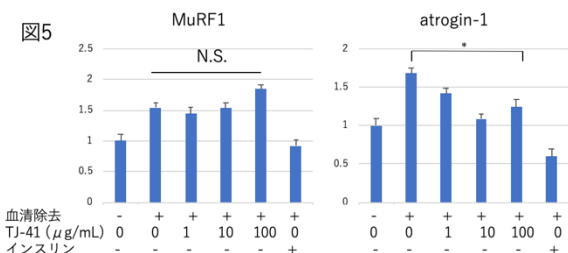
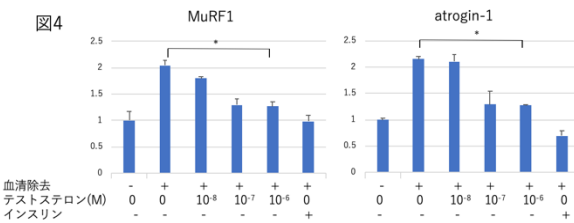
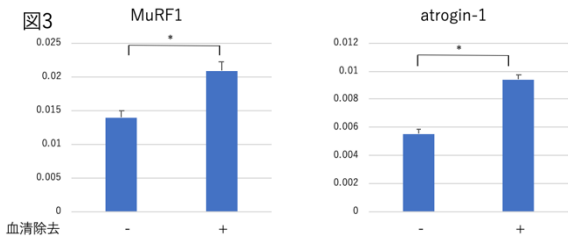


3-2 PC 筋管に対する漢方薬の効果

PC 筋管を血清除去下で 24 時間培養すると、C2C12 筋管と同様に MuRF1, atrogen-1 の発現が有意に上昇した (図 3)。テストステロンを投与すると、C2C12 筋管の場合とは異なり、MuRF1 と atrogen-1 の発現は濃度依存性に抑制された (図 4)。

血清除去下で培養した PC 筋管に TJ-41 を投与すると、MuRF1 の発現は抑制されなかったが、atrogen-1 は有意に抑制された (図 5)。また血清除去下で培養すると PC 筋管径が低下するが、TJ-41 投与によりそれが有意に抑制された (図 6)。

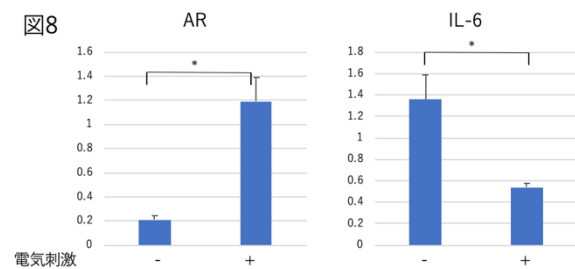
MuRF1, atrogen-1 は蛋白合成系、FoxO1 により制御されることが知られている (図 7)。そこで、TJ-41 がこの系および、ミトコンドリア機能に関わる AMPK に与える効果について Western blotting で検証した。TJ-41 は Akt, mTOR, その下流の p70、さらには FoxO1 および AMPK の活性にも影響を与えなかった。



3-3 PC 筋管に対する運動の効果

PC 筋管に電気刺激を行ったところ、**androgen receptor (AR)** の発現が上昇し、**IL-6** の発現が低下した(図 8)。

先行研究で、**C2C12** 筋管に電気刺激を行うと **AR** 発現の増加によりミオスタチンを抑制され下流の **IL-6** が低下するが (Son BK et al. *Gerontology* 2019)、**PC** 筋管においても同様の機序が働く可能性が示唆された。



3-4 成果のまとめ

血清除去下で培養した **PC** 筋管では筋萎縮関連因子の発現増加と筋管径低下が生じるが、**TJ-41** は **atrogin-1** の発現を抑制し、筋管径を改善させた。テストステロンは **C2C12** 筋管では筋萎縮関連因子を抑制する効果を示さなかったが、オスマウス由来の **PC** 筋管では効果を示した。筋管また **PC** 筋管においても電気刺激による運動効果が観察できる可能性が示唆された。

4. 今後の課題

本研究で、漢方薬がマウスの骨格筋に与える作用の一端を明らかにすることができた。一方で、漢方薬は摂取された後腸内細菌により修飾を受け、様々な化合物が体内に吸収されて複合的に作用する可能性がある。そのため本研究のような *ex vivo* の研究では漢方薬の生体内での作用を再現できない可能性があり、それを明らかにするためには *in vivo* の実験が不可欠である。今後は、廃用性筋萎縮を生じさせたマウスに漢方薬を含む餌を投与し、骨格筋量や筋力の回復促進効果やその作用機序を検証する。さらに有酸素運動または抵抗運動を併用することによる相加的効果を検討することが望ましい。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた成果は、第 64 回日本老年医学会学術集会で発表する予定である。さらに論文化して英文誌に投稿予定である。

以上