

サルコペニアモデルラットにおけるオキシトシンの役割の検討

代表研究者 千葉大学大学院医学研究院薬理学 准教授 橋本 弘史

【抄録】

骨格筋の再生能力は年齢とともに衰えるが、筋肉量が多いほど長寿であることが明らかになっている。マウスにおいて、オキシトシン (OT) は年齢とともに減少し、OT を高齢マウスへ投与すると筋肉が再生されると報告されたが、筋萎縮時における OT のメカニズムは不明である。本研究では、OT 赤色蛍光遺伝子改変ラットを用いて、尾懸垂による筋萎縮モデルを作成し、中枢 OT の動態変化を調べた。若齢において、2 週間の尾懸垂により、抗重力筋であるヒラメ筋は約 40% 萎縮した。下垂体および視床下部視索上核における赤色蛍光輝度は有意な増加がみられた。室傍核における赤色蛍光輝度の増加傾向が見られた。現在、実験に必要な 2 歳齢の遺伝子改変ラットが揃っておらず、高齢実験の準備中である。引き続き、筋萎縮時の OT の効果が明らかにし、サルコペニア、廃用症候群などに対する予防やリハビリテーションの効果を高める新たな治療の一つになる可能性に期待したい。

1. 研究の目的

1-1 はじめに

超高齢化社会の本邦において、要支援・要介護になった原因として、「骨折転倒や関節疾患などによる運動器障害」や「脳血管障害」、「高齢による衰弱」が 50%以上を占める（厚生労働省 2019 年国民生活基礎調査）。骨格筋の再生能力は年齢とともに衰えるが、筋肉量が多いほど長寿であり、フレイルやサルコペニアの予防をはじめ、薬物や手術療法およびリハビリテーションにより、いかに健康寿命を伸ばすかが近年注目されている。

1-2 加齢におけるオキシトシン研究

下垂体後葉ホルモンのオキシトシン (OT) は、子宮収縮および射乳反射を引き起こすホルモンとして古くから知られている。視床下部視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) に局在する大細胞群の OT の細胞体は軸索を下垂体後葉に延ばし、終末から OT を血中へ放出する。OT 受容体は生体内に広く分布し、OT が分娩時や射乳反射のみならず、摂食行動、不安行動、社会行動、母子関係に関与することや、ストレス緩和作用のあることがこれまでに示され、OT の末梢および中枢作用の研究は、分娩や出産、社会行動、摂食抑制およびストレス反応などを中心に行われてきた。PVN の OT ニューロンから延髄および脊髄へ投射されていることから、OT の疼痛への作用について、申請者は、これまでに報告してきた (Matsuura et al., J Neuroendocrinol, 2015; Neurosci Lett., 2016; J Neuroendocrinol. 2016; Motojima et al.,

Neuroscience, 2017)。

OT の骨格筋への作用については、高齢マウスにおいては、血中 OT 濃度は低下しており、OT を高齢マウスに投与すると筋肉の再生が誘導されることが報告されている (Elabd et al., Nat Commun., 2014.)。我々は、高齢ラットにおいて脳内の OT の発現が増加していることをこれまでに報告した (Ohno and Hashimoto et al. Neurosci Res., 2018)。この 2 つの研究において、高齢動物において、脳内の OT の発現は増加しているものの、血中の OT は低下していることが考えられる。そこで、本研究では、OT 赤色蛍光遺伝子改変ラット (OT-mRFP1 Tg rat) を用いて、尾懸垂による下肢免荷を行うことによる筋萎縮モデルを作成し、筋萎縮時における OT の役割および効果とその詳細なメカニズムを明らかにし、OT がサルコペニアや廃用症候群などによる筋萎縮に対する予防やリハビリテーションの効果を高める新たな治療法の 1 つとなる可能性を探りたいと考えた。

2. 研究方法と経過

2-1 実験動物

成熟雄性ウイスターラット (200g)、若齢雄性 OT-mRFP1 Tg rat (3 ヶ月齢) および高齢雄性 OT-mRFP1 Tg rat (2 歳齢) を使用した。

2-2 尾懸垂装置の装着手術

麻酔下にて、ラットの尾基部の尾骨中心にキ

ルシュナー鋼線 (Φ1.0mm) を通し、キルシュナー鋼線に尾懸垂装置を装着した。

2-2 急性の尾懸垂刺激による OT ニューロンへの影響

成熟雄性ウイスターラットに対し、尾懸垂装置装着手術を行った。尾懸垂をしないコントロール群と尾懸垂群の2群に分け、術後2日後に尾懸垂を90分間行い、その後、麻酔下にて開胸し、左心室より灌流および固定液を注入し、灌流固定を行った。灌流固定後、脳、下垂体および両下肢を取り出し、ホルマリン液にて後固定を行った。スクロース化後、マイクロトームにて 35 μm の脳薄切片を作成し、抗 Fos 抗体を用いて、免疫組織化学的染色法により、SON および PVN における Fos 蛋白の発現を調べ、また、二重蛍光組織化学的染色法により、オキシトシン産生細胞における Fos 蛋白の発現を調べた。

2-3 慢性の尾懸垂刺激による OT ニューロンへの影響

OT-mRFP1 Tg rat に対し、尾懸垂装置装着の手術を行った。プレリミナリーな実験として、尾懸垂1日、3日、7日、14日における、下垂体後葉、SON および PVN における赤色蛍光輝度、並びに飲水量と摂食量の測定を行った。尾懸垂7日目までは、尾懸垂刺激による急性反応と思われる赤色蛍光輝度の増加傾向が認められたが、14日目にはコントロール群と同じ程度まで戻っていたこと、また、飲水量および摂食量も尾懸垂開始後7~8日以降はコントロール群と有意差が無かったことから、慢性の尾懸垂刺激として2週間の尾懸垂を行うこととした。

尾懸垂装置を装着し、両脚を着地させたコントロール群と、2週間の尾懸垂群の2群に分け、2週間後に、麻酔下にて灌流固定を行い、脳、下垂体および両下肢を取り出した。下垂体後葉は灌流固定直後に、蛍光顕微鏡にて撮像し、赤色蛍光輝度の測定を行った。脳はスクロース化後、35 μm の脳薄切片を作成し、蛍光顕微鏡にて撮像し、SON および PVN の赤色蛍光輝度の測定を行った。両下肢は、7テスラの核磁気共鳴装置 (NMR) にて撮像を行った。

3. 研究の成果

3-1 急性の尾懸垂刺激によるオキシトシン産生ニューロンへの影響

SON および PVN において、尾懸垂群 (n=8) での Fos 蛋白の発現がコントロール群 (n=7)

と比較し、有意に増加していた (図1)。また、SON および PVN の OT 産生ニューロンにおいても、Fos 蛋白の発現は有意に増加していた (図2) ことより、尾懸垂刺激により、OT ニューロンが活性化されることが示唆された。

図1

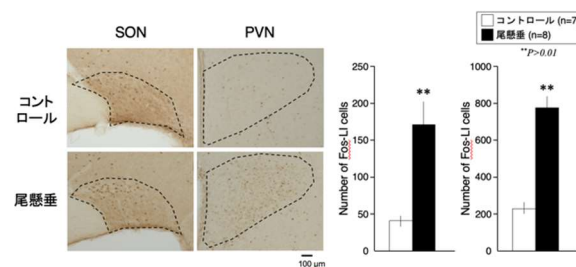
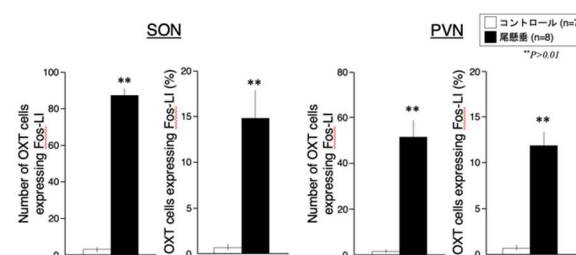


図2



3-2 2週間の尾懸垂による筋萎縮

尾懸垂による筋萎縮が起きているのかを確認するために、NMR を用いて両下腿筋群の撮像を行い、ヒラメ筋および下腿筋群の断面積をコントロール群 (n=6) と尾懸垂群 (n=6) で比較した。その結果、ヒラメ筋および下腿筋群ともに、両下腿において、尾懸垂群はコントロール群と比較し、約 40% の筋萎縮が見られた (図3、4)。

図3

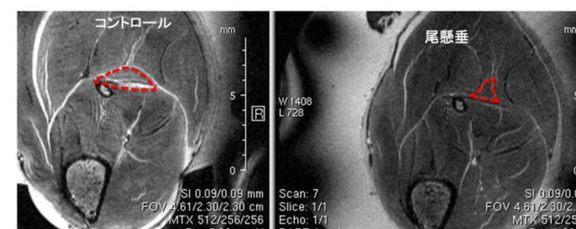
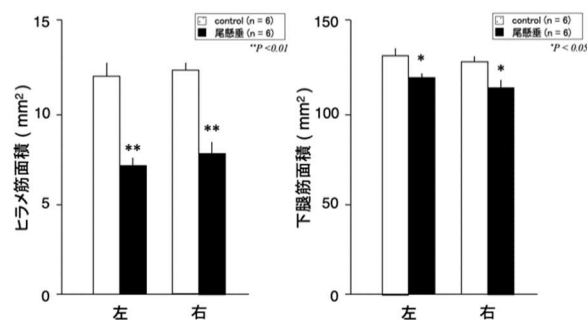


図4



3-3 若齢ラットにおける2週間の尾懸垂刺激による中枢オキシトシンへの影響

下垂体後葉およびSONにおいて、尾懸垂群 (n=5) はコントロール群 (n=5) と比較し、赤色蛍光輝度は有意に増加していた(図5、6)。PVNの赤色蛍光輝度は有意ではなかったが、増加傾向が見られた(図5、6)。2週間の尾懸垂刺激により中枢OTが活性化していることが示唆された。

図5

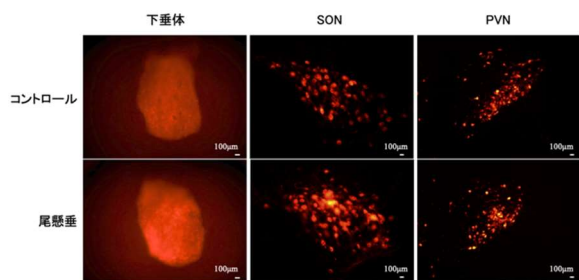
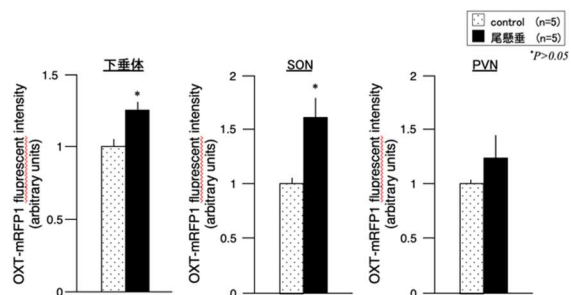


図6



3-4 高齢ラットにおける2週間の尾懸垂刺激による中枢オキシトシンへの影響

高齢ラットにおいては、コントロール群 (n=4) と尾懸垂群 (n=3) でこれまでに実験を行ったが、このうち5匹に下垂体腫瘍があり、一部は下垂体腫瘍による視床下部の圧排のため、下垂体後葉および視床下部の観察が不可能であった。今後、高齢ラットの数が揃い次第、実験を行う予定である。

4. 今後の課題

高齢ラットの実験の1番の課題は、2歳齢になるまでの生存率と飼育費用であると思われる。加えて、本実験では、使用するラットが遺伝子改変ラットであることから、下垂体腫瘍の発症率が高いかもしれない可能性は想定していたが、現段階で、70%以上の下垂体腫瘍の発症率は想定外であった。今後も、高齢ラットの数揃い次第、実験を行う予定であるが、それに加えて、若齢ラットを用いて、OT受容体拮

抗薬の持続投与をしながらの2週間の尾懸垂実験を行い、下垂体後葉、SONおよびPVNの赤色蛍光輝度の変化を観察する予定である。

高齢動物実験では、開始まで2年間の時間がかかるとともに、2歳齢までの生存率の影響が大きい。本実験で用いたOT-mRFP1 Tg ratは、70%程度の2年生存率であるため、継続的に高齢研究を行うためには、かなりの飼育スペースが必要である。また、昨今の餌代や円安により、昨年度に比べて飼育費用が2倍以上に高騰したことは想定外であった。

以上のように、高齢動物研究では、様々な課題はあるが、本研究において、筋萎縮時におけるOTの役割および効果が明らかになれば、OTがサルコペニアや廃用症候群などによる筋萎縮に対する予防やリハビリテーションの効果を高める新たな治療法の1つとなる可能性がある。これまでに、OT分泌刺激方法としては、マッサージやタッチセラピー、鍼治療、歌を唄うなど、多岐にわたる。内因性のOT分泌を刺激する方法をリハビリテーションと組み合わせる、もしくは、普段からマッサージや歌うなど、身体的にも、経済的にも負担なく、かつ、科学的な裏付けを持って、健康寿命を延ばすことを可能にする大変興味深いテーマであり、その意義は大きいと思われ、今後も引き続き研究を継続していきたい。

5. 研究成果の公表方法

第100回日本生理学会記念大会(京都)において「Stimulation of tail suspension activates hypothalamus oxytocin neurons in rats」の表題で、第24回氷川フォーラム(川越)において「ラットの加齢による筋萎縮における視床下部オキシトシンの役割は何なのか?」の表題にて発表をした。また、2024年3月には、第101回日本生理学会大会(北九州)において「Effects of tail suspension on hypothalamus oxytocin neurons in oxytocin-mRFP1 transgenic rats」の表題にて、2024年6月には、第61回日本リハビリテーション医学会学術集会において「オキシトシン遺伝子改変ラットの尾懸垂による筋萎縮モデルにおける中枢性オキシトシンの動態変化」の表題にて発表予定である。

以上

Effects of oxytocin in sarcopenia in rats

Primary Researcher: Hirofumi Hashimoto
Associate Professor, Department of Pharmacology, Chiba
University Graduate School of Medicine

Generally, the regenerative ability of skeletal muscle declines with age. The greater the muscle mass is also the longer the lifespan. Previous study showed that oxytocin (OT), the posterior pituitary hormone, decreased with age, and administration of OT regenerated muscle in aging mice. However, the mechanism of OT with muscle atrophy is unknown. In present study, we showed a muscle atrophy model with tail suspension, using OT monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rat (OT-mRFP1 Tg rat) and investigated changes of central OT in OT-mRFP1 Tg rat. Two weeks after tail suspension, the soleus muscle, an anti-gravity muscle, has atrophied by approximately 40% in young (3 months old) OT-mRFP1 Tg rat. We could observe that the intensity of red fluorescence significantly increased in the posterior pituitary and supraoptic nucleus in young OT-mRFP1 Tg rats. The intensity of red fluorescence increased, not significantly, in the paraventricular nucleus in young OT-mRFP1 Tg rats. I am preparing for the experiments with aging (24 months old) OT-mRFP1 Tg rat. I would like to clarify the effects of OT on muscle atrophy and show a new approach for therapy in rehabilitation for the sarcopenia, disuse syndrome, and locomotive syndrome in near future.