

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09560

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮の進展と回復過程に及ぼす経口グルタチオン投与の有効性に関する研究

研究課題名(英文) Protective effects of supplemental oral glutathione on the progress and recovery process of disuse muscle atrophy

研究代表者

内田 博之(Uchida, Hiroyuki)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：20245195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：組織中のグルタチオン(GSH)の欠乏は、酸化ストレスの増加と加齢に関連している。GSHの補給は、健康の維持と加齢関連疾患に必要とされる。廃用性筋萎縮は、活性酸素(ROS)介在酸化ストレス経路が主要な原因である。そこで、後肢固定ラットを使用して、GSHの経口投与および/またはリハビリテーション治療による廃用性筋萎縮の予防をROS産生の抑制の観点より検討した。特に、廃用性筋萎縮時に、リハビリテーション治療に加えてGSHを経口投与すると、筋中のROSを減弱し、筋組織の回復の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身体活動低下に起因する骨格筋の萎縮や機能低下を廃用性筋萎縮と呼び、この筋萎縮の予防あるいは回復過程において、十分な運動療法が困難な時にも実施可能である栄養成分の摂取、また、リハビリテーションの効果を助長する栄養成分の摂取も切望されている。廃用性筋萎縮の進展過程においては、筋組織中の枯渇したGSHを経口的に補足することにより、筋組織中の酸化ストレスを減弱し、筋萎縮関連遺伝子の発現を低下させた結果、抑制されることが明らかとなった。また、廃用性筋萎縮の回復過程においては、リハビリテーション処置に加えGSHを経口的に補足することにより、筋組織中のGSHの消費が向上し、回復されることが推測される。

研究成果の概要(英文)：Glutathione (GSH) deficiency in tissues is associated with increased oxidative stress and aging. The supplementation of GSH is required maintaining health and age-related biological insults. The disuse muscle atrophy is due in large part to Reactive Oxygen Species (ROS)-mediated oxidative stress pathway. Therefore, I demonstrated protection against disuse muscle atrophy by minimizing ROS induction in the muscle through supplemental oral administration of GSH and/or rehabilitation therapy in lower limb restriction rat. In particular, oral GSH administration in addition to the rehabilitation therapy during the disuse muscle atrophy suggested muscular tissue recovery potential by diminishing ROS.

研究分野：予防医学

キーワード：廃用性筋萎縮 グルタチオン 酸化ストレス 筋萎縮関連遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会の国々では、ロコモティブシンドロームの増加が社会問題化している。身体活動低下に起因する骨格筋の萎縮や機能低下を廃用性筋萎縮と呼び、これに対する有効な予防法は国内外ともにリハビリテーション(運動療法)以外に確立されていない。従って、廃用性筋萎縮の予防あるいは回復過程において、十分な運動療法が困難な時にも実施可能である栄養成分の摂取、また、リハビリテーションの効果を助長する栄養成分の摂取も切望されている。生体組織に存在するグルタチオン(GSH)の低下は、廃用性腸管粘膜萎縮、関節炎および神経疾患などの病態と関連しており、食事等にも含まれる GSH の経口投与は生体組織の GSH プールを増加させこれらの病態の進展を予防することが明らかとなっている。

廃用性筋萎縮は筋タンパク質の合成抑制や分解が亢進することで生じ、そのメカニズムは、IGF-1 介在ユビキチン-プロテアソーム経路による筋タンパク質分解の促進、PI3K/AKT/mTOR 経路によるタンパク質合成の抑制が国内外より報告されている。その上、ROS 介在酸化ストレス経路による筋タンパク質の分解促進が起こり、筋萎縮を助長している。筋タンパク質の分解には、AKT、FOXO や ROS を介した筋萎縮関連遺伝子(MuRF-1、MAFbx)の発現が報告されている。生体組織に常在する GSH の低下は、加齢関連疾患(関節炎、神経疾患、免疫疾患、糖尿病など)の発症や進展と関連し、GSH の経口投与はこれらの疾患の発症・進展を抑制することが明らかとなっている。

廃用性筋萎縮においても、筋組織中の GSH の低下が観察されること、そして、経口 GSH の投与は廃用性筋萎縮の発生・進展を軽減することが予測される。

2. 研究の目的

本研究は、後肢関節固定(膝・足関節テーピング)モデルラットに生じた廃用性筋萎縮の進展過程と回復過程に及ぼす経口 GSH 投与の有効性を明らかにすることである。GSH を外因的に補給することで、廃用性筋萎縮は筋組織中の酸化ストレスを軽減(RoS 介在酸化ストレス経路を抑制)し、筋タンパク質の分解を抑制することが予想される。この筋萎縮の予防の一助として、運動療法が困難な時期にも筋萎縮を予防することができる非力学的な予防法として GSH の補給が提案できるものと考えている。さらには、経口 GSH 投与とリハビリテーションを併用することにより、より効果的な筋萎縮の治療が期待できる可能性もある。

3. 研究の方法

(1) 実験動物・研究デザイン: 10 週齢雄性 Wister rat を使用した。実験 1 として、「後肢関節固定ラットの廃用性筋萎縮の進展過程に及ぼす経口 GSH 投与の有効性」を実施した。33 匹のラットをコントロール群、GSH 投与群、左後肢固定群、左後肢固定に加え GSH を投与した(左後肢固定+GSH 投与)群の 4 群に分けた。実験 2 として、「後肢関節固定ラットの廃用性筋萎縮の回復過程に及ぼす経口 GSH 投与、リハビリテーションの有効性」を実施した。7 日間の左後肢固定後、固定を解除し、28 匹のラットをコントロール群、GSH 投与群、リハビリテーション処置(リハビリ)群、リハビリテーション処置に加え GSH を投与した(リハビリ+GSH 投与)群の 4 群に分けた。実験 1 は 1 週間後、実験 2 は固定解除から 2 週間後に、イソフルラン吸入麻酔下で、体重測定と全採血を行い、左後肢の腓腹筋を摘出した。これらの筋は切り分け、アルミホイルで包み液体窒素で凍結後、 -80°C で凍結保存した。血液は、血しょうを分離後、 -80°C で凍結保存した。病理標本作成のために、筋組織の一部は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

(2) 経口 GSH 投与: 経口 GSH 投与群は、Glutathione (Reduced Form) を用いて GSH 水溶液を用時調製し、実験開始 3 日前からゾンデを用いて経口投与を開始した(500mg/kg 体重/日)。対照群には、逆浸透水を与えた。

(3) 後肢固定の方法: 左後肢の固定は、吸入麻酔下で膝関節伸展および足関節最大底屈位の状態になるように、膝関節および足関節をスポーツ用テーピング材でテーピングすることで行った。

(4) リハビリテーションの方法: 7 日間の左後肢固定後、左後肢の固定を解除し、7 日間リハビリテーションを行った。リハビリテーション 1 日目から 7 日目にかけて、膝関節の屈曲⇄伸展および足関節の背屈⇄低屈を 1 日目 5 回、2 日目 10 回、3 日目 10 回、4 日目 20 回、5 日目 30 回、6 日目 30 回および 7 日目 30 回とゆっくりした速度で行った。

(5) 筋線維横断面積の測定: ホルマリン固定の腓腹筋組織をパラフィン包埋後、横断切片を作製した。組織切片は Reticulin 染色後、Nuclear fast red-aluminum sulfate 溶液に浸漬し核染色した。腓腹筋の組織標本は、レチクリン線維が黒色に染色され、細胞核とコラーゲンおよび背景が赤色に染色された。これらの染色標本は、デジタルカメラシステム付属の顕微鏡で、筋線維組織標本の写真撮影($\times 200$)と筋線維横断面積(μm^2)の計測を行った。なお、筋線維横断面積は、顕微鏡下で細胞全体が写っているものを選び、1 匹あたり最低 100 個計測した。

(6) 血中 Xanthine oxidase(XO)活性の測定: 血中 XO 活性を、Xanthine oxidase Assay kit を

用いて測定し、酸化ストレス経路の ROS 産生評価に使用した。XO は、肝臓や空腸などの組織に多く存在し、組織中で活性化された XO は、血中に放出される。そのため、血中 XO 活性を測定することにより、間接的に組織中の XO 活性の評価を行うことができる。

(7) カルボニル化タンパク質の測定：凍結保存の腓腹筋組織より、WES-7420 EzRIPA Lysis kit を用いてタンパク質抽出後、OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit S7150 を用いて、2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH-hydrazine) の誘導体化から筋中カルボニル化タンパク質の測定を Western Blotting 法により行った。PVDF 膜は、DNP 特異的な一次抗体 Rabbit Anti-DNP Antibody、次に二次抗体 Goat Anti-Rabbit IgG (HRP-conjugated) と反応させた後、SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate により発光させ、LumiCube により発光強度とバンドの画像処理を行った。

(8) 筋萎縮関連遺伝子 mRNA 発現の測定：凍結保存の腓腹筋組織より、RNAiso を用いて RNA を抽出後、PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて cDNA を合成した。次に、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tlii RNaseH Plus) を使用して、購入備品の Mic QPCR, Bio Molecular Systems により Real Time-PCR を行った。MAFbx/atrogen-1、MuRF-1 の mRNA 発現量は、それぞれ Ywhaz mRNA 発現量との発現比によって算出し、評価した。

(9) 筋中 GSH 濃度の測定：凍結保存の腓腹筋組織より、GSSG/GSH Quantification Kit を用いて GSSG 量と GSH 量の測定を行った。総グルタチオン量(GSH+GSSG)から GSSG 量を差し引くことで GSH 量を求めた。

(10) 統計解析：測定結果は、平均値±標準誤差で示した。統計解析は、Kolmogorov test により正規分布を確認し、T-test により各群間における有意差を分析した。さらに、Two way ANOVA と Bonferroni 法により群間の統計学的有意差の分析を行った。有意差は、 $P < 0.05$ とした。また、すべての統計解析は、IBM SPSS Statistics V25 を使用した。

4. 研究成果

実験 1 の研究成果： 廃用性筋萎縮の進展過程において、腓腹筋の筋線維横断面面積は、コントロール群と比較して左後肢固定群と左後肢固定+GSH 投与群で有意に低下した (図 1(a))。左後肢固定群と比較して左後肢固定+GSH 投与群では、筋線維横断面面積の低下を有意に軽減した。経口 GSH 投与は、後肢固定による廃用性筋萎縮を軽減したことが示唆された (図 1(b))。筋組織中の GSH レベルは、コントロール群と比較して左後肢固定群で有意に減少した。左後肢固定群と比較して左後肢固定+GSH 投与群は減少を有意に軽減した。経口 GSH 投与は、廃用性筋萎縮による筋組織中の GSH レベルの低下を改善することが示唆された。血中キサンチンオキシダーゼ活性は、コントロール群と比較して左後肢固定群と左後肢固定+GSH 投与群で有意に増加した (図 2(a))。左後肢固定群と左後肢固定+GSH 投与群の両群間での有意な差は見られなかった。経口 GSH 投与は、キサンチンオキシダーゼ活性に影響を与えなかった。筋組織中のカルボニル化タンパク質は、コントロール群と比較して左後肢固定群で有意に増加した。左後肢固定群と比較して左後肢固

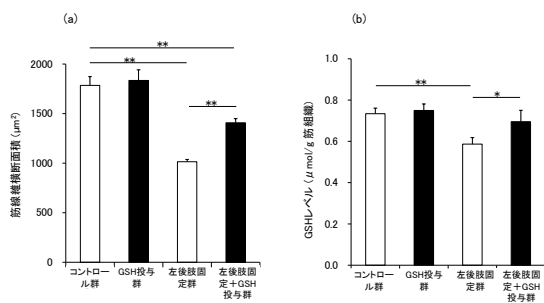


図 1. 廃用性筋萎縮の進展過程による腓腹筋の筋線維横断面面積 (a)、GSH レベル (b) の変化

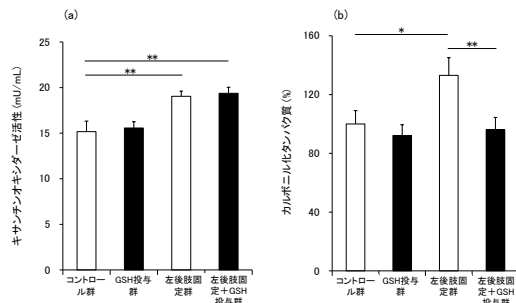


図 2. 廃用性筋萎縮の進展過程による血中キサンチンオキシダーゼ活性(a)、カルボニル化タンパク質(b)の変化

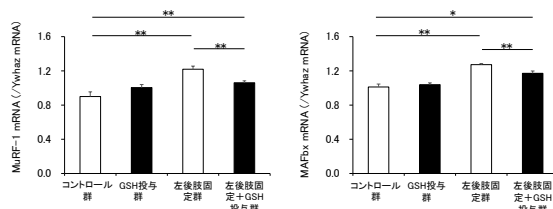


図 3. 廃用性筋萎縮の進展過程による筋組織中の筋萎縮関連遺伝子の mRNA 発現の変化

定+GSH 投与群は増加を有意に軽減した (図 2(b))。GSH の経口投与は、廃用性筋萎縮により増加した ROS を消去し、酸化ストレスを軽減したことが示唆された。筋組織中の筋萎縮関連遺伝子 (MAFbx/atrogen-1 と MuRF-1) の mRNA 発現は、コントロール群と比較して左後肢固定群と左後

肢固定+GSH投与群で増加した(図3)。左後肢固定群と比較して左後肢固定+GSH投与群はmRNA発現の増加を有意に軽減した。GSHの経口投与は、廃用性筋萎縮により増加したROSを減弱することにより、筋萎縮関連遺伝子の発現を軽減したことが示唆された。

後肢固定により生じた腓腹筋の廃用性筋萎縮は、筋組織中の枯渇したGSHを経口的に補足することにより、筋組織中の酸化ストレスを減弱し、筋萎縮関連遺伝子の発現を低下させた結果、抑制されることが明らかとなった。

実験2の研究結果： 廃用性筋萎縮の回復過程において、腓腹筋の筋線維横断面積はコントロール群に比べてリハビリ群およびリハビリ+GSH投与群で有意に増加していた(図4)。また、筋線維筋横断面積はGSH群に比べてリハビリ+GSH投与群で有意に増加していた。廃用性筋萎縮の回復には、リハビリテーション処置に加えGSHの経口投与をする方が効果的であった。筋組織中のGSHレベルは、コントロール群に比べてリハビリ+GSH投与群で有意に低下した(図5)。また、リハビリ群に比べてリハビリ+GSH投与群で有意に低下した。廃用性筋萎縮の回復には、リハビリテーション処置に加えGSHの経口投与をする方が、筋組織中のGSHの消費が高いことが示唆された。血中のキサンチンオキシダーゼ活性は、リハビリ群に比べてリハビリ+GSH投与群で有意に低下した(図6)。廃用性筋萎縮の回復を抑制するキサンチンオキシダーゼの活性は、リハビリテーション処置に加えGSHの経口投与を行うと減弱した。

後肢固定により生じた腓腹筋の廃用性筋萎縮は、リハビリテーション処置に加えGSHを経口的に補足することにより、筋組織中のGSHの消費が向上し、酸化ストレスの減弱、引き続き生じる筋萎縮関連遺伝子の発現の低下を招き、回復されることが推測される。また、キサンチンオキシターゼ活性も低下することにより廃用性筋萎縮の回復を促進するものと考えられる。

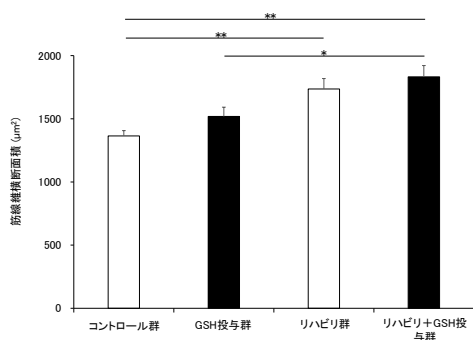


図4. 廃用性筋萎縮の回復過程における腓腹筋の筋線維横断面積の変化

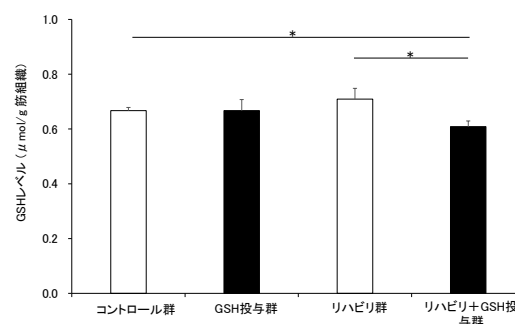


図5. 廃用性筋萎縮の回復過程における腓腹筋のGSHレベルの変化

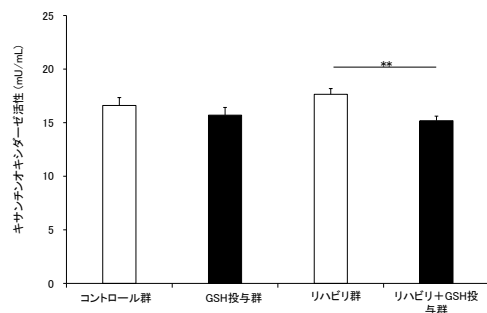


図6. 廃用性筋萎縮の回復過程における血中キサンチンオキシダーゼ活性の変化

【まとめ】

廃用性筋萎縮の進展過程においては、筋組織中の枯渇したGSHを経口的に補足することにより、筋組織中の酸化ストレスを減弱し、筋萎縮関連遺伝子の発現を低下させた結果、抑制されることが明らかとなった。また、廃用性筋萎縮の回復過程においては、リハビリテーション処置に加えGSHを経口的に補足することにより、筋組織中のGSHの消費が向上すること、キサンチンオキシターゼ活性が低下することにより、回復されることが推測される。今後、酸化ストレスの減弱および引き続き生じる筋萎縮関連遺伝子の発現の低下のメカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------