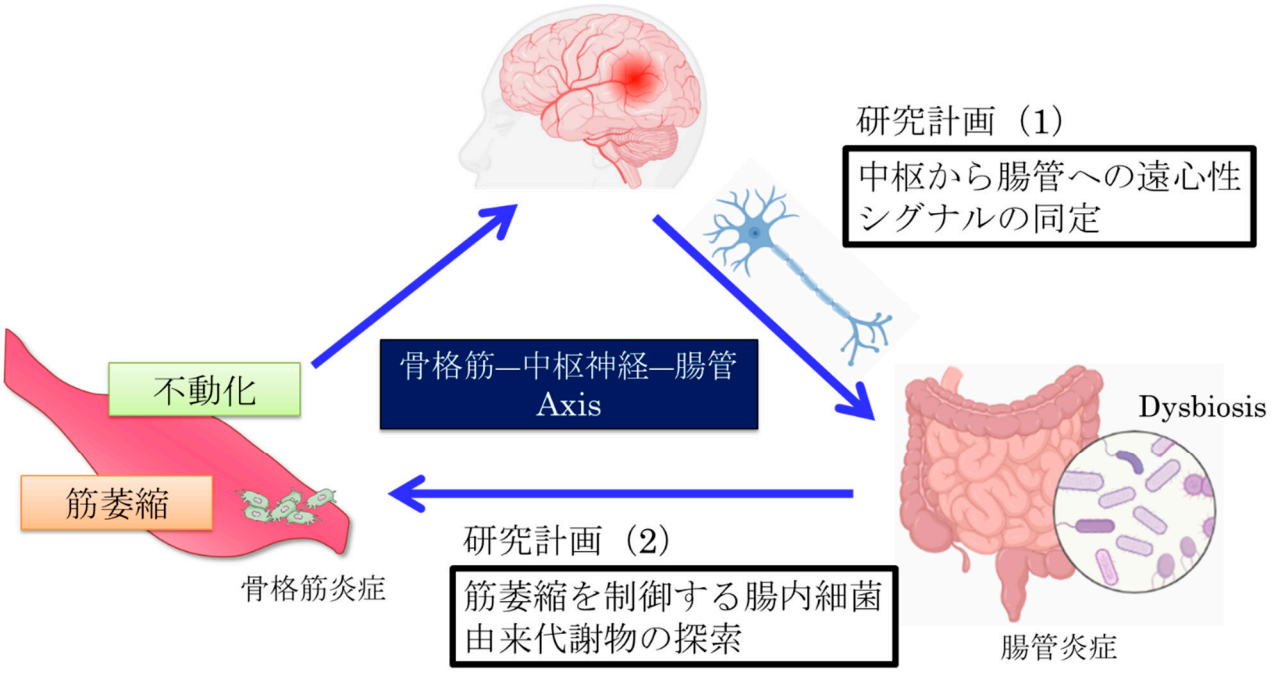
157　「筋-脳-腸連関」を基軸としたサルコペニアの病態解明	平田　悠

【目的】サルコペニアは加齢による骨格筋量の減少に特徴付けられる病態であり、超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命短縮の重要な要因である。加齢性の生理変化に加えて、糖尿病や慢性心不全、慢性腎臓病など様々な併存症がサルコペニアの促進要因であることが知られているが、身体活動低下や不動化もサルコペニアの重要な促進要因である。我々は、不動化性筋萎縮の経時的な病理変化について詳細に検討したところ、ギプス固定による不動化が 10 日程度となると、骨格筋で強い炎症が惹起されることを明らかとした。また、不動化によって腸管炎症が惹起され、腸内細菌叢に顕著な変化が生じることも見出した。これらの結果から、骨格筋の不動化によって何らかのメカニズムで腸内細菌叢の変化（dysbiosis）が生じ、これが腸管炎症ならびに骨格筋での炎症を引き起こして筋量の減少に繋がるという、過去に全く想定されていなかった臓器連関の存在を想定した。そこで本研究では、不動化性筋萎縮における「筋ー脳ー腸連関」の役割を明らかとするため、不動化による dysbiosis の発症機構と、dysbiosis が筋萎縮を惹起するメカニズムについての解析を行い、筋萎縮抑制薬の開発に資する新知見を得ることを目的とした。

【方法】不動化における中枢から腸管への遠心性シグナルとして交感神経を想定し、対照またはギプス固定処理を行ったマウスの腸管を回収し、ノルエピネフリン量を測定した。また、カテコラミン合成阻害薬であるα-MT（alpha-methyl-p-tyrosine）を用いたノルエピネフリン turnover 法により、不動化では腸管におけるノルエピネフリンの供給量が増加しているか否かを解析した。さらに、腸管炎症および筋萎縮を制御する腸内細菌由来代謝物について、マウス糞便および盲腸内容物を用いて網羅的に解析した。

【結果】α-MT 投与前後のノルエピネフリン濃度比を各消化管で評価したところ、不動化によって胃や十二指腸では変化がない一方で、小腸や結腸においてノルエピネフリン濃度比が有意に低下した。すなわち、不動化では下部消化管特異的に交感神経が活性化することが明らかとなった。また、特に腸内細菌由来の脂質代謝物を中心に解析したところ、不動化で特徴的な変化が認められる代謝物として“Substance X”を同定した。混餌食による補充実験を行い、不動化における腸管組織および骨格筋への効果について検討したところ、Substance X は不動化による腸管組織および骨格筋での炎症を抑制し、筋萎縮を改善することを見出した。

本研究計画の全体図



157. 「筋-脳-腸連関」を基軸としたサルコペニアの病態解明

平田　悠

神戸大学 大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学部門

Key words：サルコペニア，腸内細菌，交感神経，臓器連関

緒　言

サルコペニアは加齢による骨格筋量の減少に特徴付けられる病態であり、超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命短縮の重要な要因である。加齢性の生理変化に加えて、糖尿病や慢性心不全、慢性腎臓病など様々な併存症がサルコペニアの促進要因であることが知られているが、身体活動低下や不動化もサルコペニアの重要な促進要因である。近年の COVID-19 パンデミックにより、特に高齢者の身体活動時間が大幅に減少し、新規フレイル発症率が増加していることを踏まえても、身体活動低下や不動化がどのようなメカニズムで筋量減少を促進するかを解明することは、サルコペニアやフレイルの発症予防法や治療戦略を考える上で重要である。

我々はこれまでに、糖尿病による筋量減少の分子機構について解析し、糖尿病ではユビキチンリガーゼ WWP1 の発現低下によって転写因子 KLF15 のタンパク発現が増加し、アミノ酸異化や筋萎縮関連遺伝子の発現増加を介して骨格筋の萎縮が促進されるというメカニズムを明らかとした［1］。従来、糖尿病ではインスリンの持つ細胞増殖作用やタンパク同化作用が減弱することにより筋量減少が生じると考えられていたが、我々が見出した「高血糖自体が筋肉の異化を促す」という事実は、過去に全く想定されていなかった、極めて新規性の高い知見である。さらに最近は、身体活動低下や不動化による筋量減少の分子機構についても解析を行っているが、運動は筋量増加の最も重要な生理的刺激であることから、不動化による筋量減少は、これまで半ば盲目的に、「運動による筋量増加シグナルの欠如」という観点で捉えられてきた。しかし、運動による筋量増加は数週から数ヶ月かけて認められるのに対し、不動化による筋量減少は数日から数週で生じるという時間軸を考慮しても、運動による筋量増加機構とは独立した「不動化に固有の積極的に筋量減少を促す機構」が存在する可能性は高い。我々はギプス固定や運動神経切除などのモデル動物を用いて、筋の不動化では細胞膜 Ca^{2+}チャネルである Piezo1 の発現が低下するために細胞内 Ca^{2+}流入が減少して Ca^{2+}シグナルが低下し、KLF15 およびサイトカイン IL-6 の発現増加を介して筋タンパクの異化が積極的に促進されるという、不動化固有の筋量減少機構の一端を明らかとした［2］。一般に Ca^{2+}シグナルが関わる現象では、Ca^{2+}レベルの顕著な上昇によって種々の反応が引き起こされるが、本研究では「Ca^{2+}レベルが基底状態以下に低下することによって発動する生命現象」を初めて記述した。

さらに我々は、不動化性筋萎縮の経時的な病理変化について詳細に検討したところ、ギプス固定による不動化が 10 日程度となると、骨格筋で強い炎症が惹起されることを明らかとした。また、10 日間のギプス固定による不動化によって、小腸や結腸の腸管長の短縮と盲腸重量の低下とともに、腸管組織での炎症マーカーの発現亢進など、腸管炎症が惹起されることを見出した。加えて、腸内細菌叢に *Lactobacillus* の減少や Lachnospiraceae group の増加といった顕著な変化が生じており、抗生剤投与による疑似無菌化マウスでは不動化による骨格筋の炎症や筋量減少が抑制されることも見出した。これらの結果は、骨格筋の不動化によって何らかのメカニズムで腸内細菌叢の変化（dysbiosis）が生じ、これが腸管炎症ならびに骨格筋での炎症を引き起こして筋量の減少に繋がるという、過去に全く想定されていなかった臓器連関の存在を示唆している。

そこで本研究では、不動化性筋萎縮における「筋－脳－腸連関」の役割を明らかとするため、不動化による dysbiosis の発症機構と、dysbiosis が筋萎縮を惹起するメカニズムについての解析を行った。具体的には、骨格筋の不動化と dysbiosis を繋ぐメカニズムとして想定した「中枢神経から腸管への遠心性シグナル」を同定し、

腸管炎症および筋萎縮を制御する腸内細菌由来代謝物の探索を通じて、筋萎縮抑制薬の開発に資する新知見を得ることを目的とした。

方法および結果

1. 不動化における中枢から腸管への遠心性シグナルの同定

不動化における中枢から腸管への遠心性の神経回路として交感神経を想定し、定常状態における小腸や結腸のノルエピネフリン量を HPLC 法で測定した結果、腸管では他臓器と比較して重量当たりのノルエピネフリン量が多いことを明らかとした。

次に、不動化では腸管における交感神経が過剰に活性化しているか検討するため、対照またはギプス固定処理（両後肢ギプス固定 10 日間）を行ったマウスの腸管を回収し、ノルエピネフリン量を測定した。カテコラミン合成阻害薬であるα-MT（alpha-methyl-p-tyrosine）を用いたノルエピネフリン turnover 法では、ノルエピネフリン濃度比の低下が交感神経の活性化を示すため、不動化では腸管におけるノルエピネフリンの供給量が増加しているか否かを解析した。α-MT 投与前後のノルエピネフリン濃度比を各消化管で評価したところ、不動化によって胃や十二指腸では変化がない一方で、小腸や結腸においてノルエピネフリン濃度比が有意に低下した（図 1）。すなわち、不動化では下部消化管特異的に交感神経が活性化することが明らかとなった。

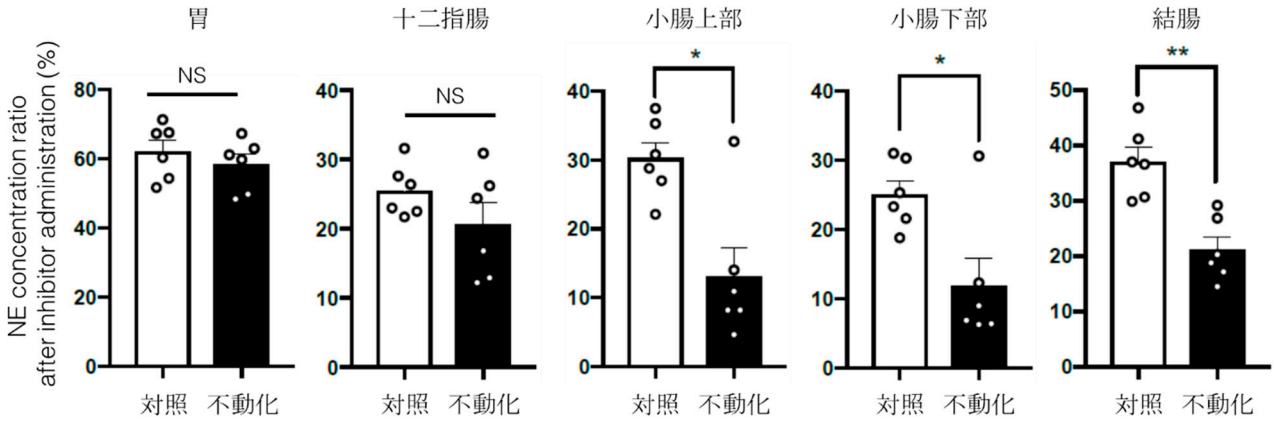


図 1. 各消化管における交感神経の活動測定
対照マウスおよび不動化マウス（両後肢ギプス固定 10 日間）におけるカテコラミン合成阻害薬α-MT 投与前後のノルエピネフリン濃度比。N＝6、平均±SEM、
*P＜0.05、**P＜0.01、NS：not significant（unpaired t 検定）。

2. 腸管炎症および筋萎縮を制御する腸内細菌由来代謝物の探索

不動化による dysbiosis に伴って腸内細菌由来の短鎖脂肪酸や胆汁酸、脂質代謝物などが変化するか、マウス糞便および盲腸内容物を用いて網羅的に解析した。近年、腸内細菌由来のリノール酸代謝物については、宿主の代謝改善や抗炎症作用を有することが示されており、その多機能性が注目されている［3，4］。そこで、特に、腸内細菌由来の脂質代謝物を中心に解析したところ、不動化で特徴的な変化が認められる代謝物として“Substance X”を同定した。

次に、Substance X の混餌食による補充実験を行い、不動化による腸管組織での炎症に対する効果について検討した。その結果、不動化による陰窩径の短縮や結腸組織へのマクロファージ浸潤は Substance X の投与により抑制され（図 2a）、血中 LPS の増加についても抑制されることが明らかとなった（図 2b）。すなわち、Substance X は不動化による腸管炎症を抑制し、バリア機能を改善すると考えられた。

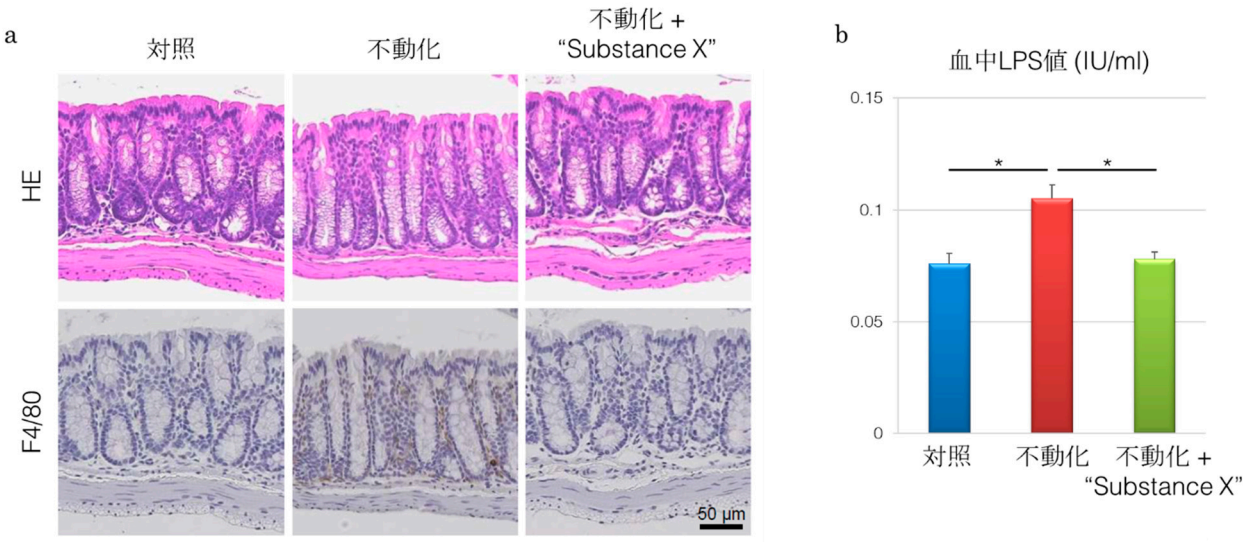


図 2. 不動化における腸管組織に対する Substance X の効果

a） マウス結腸組織の HE 染色および F4/80 染色。スケールバー：50 μm。

b） マウス血中の LPS 値。N＝6、平均±SEM、*P＜0.05（ANOVA 検定）。

さらに、不動化による骨格筋での炎症や筋萎縮に対する Substance X の効果について検討した。その結果、不動化による筋横断面積の減少や筋組織へのマクロファージ浸潤は Substance X の投与により抑制され（図 3a）。ヒラメ筋重量の低下についても抑制されることが明らかとなった（図 3b）。すなわち、Substance X は不動化による骨格筋での炎症抑制を介して、筋萎縮を改善すると考えられた。

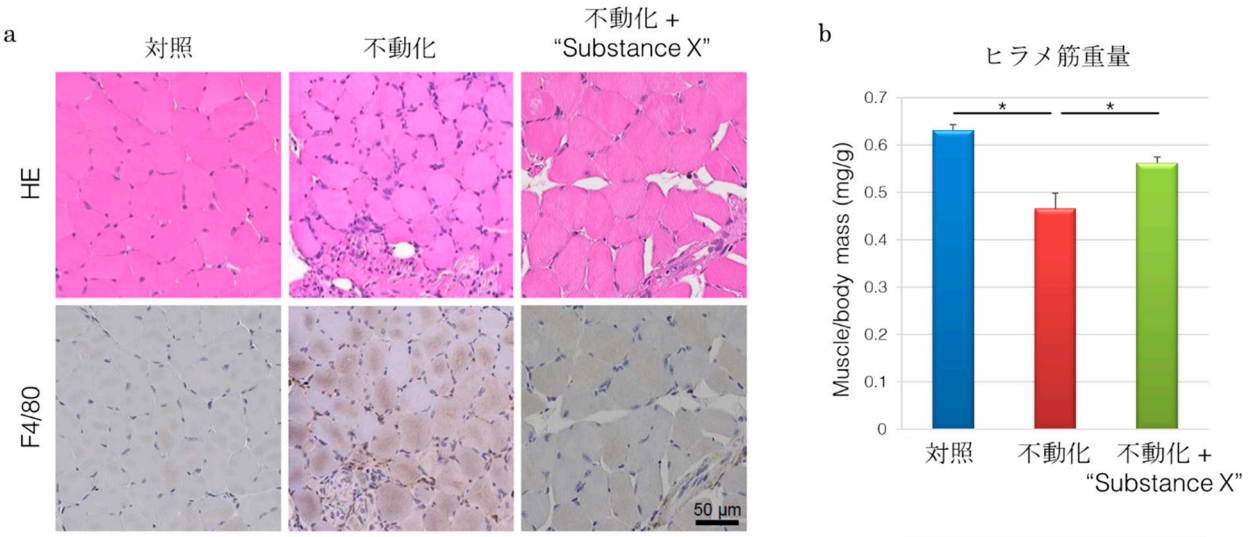


図 3. 不動化における骨格筋に対する Substance X の効果

a） マウスヒラメ筋の HE 染色および F4/80 染色。スケールバー：50 μm。

b） マウスヒラメ筋の体重当たりの重量。N＝6、平均±SEM、*P＜0.05（ANOVA 検定）。

考　察

本研究では、不動化における中枢から腸管への遠心性の神経回路として交感神経を同定し、不動化では下部消化管特異的に交感神経が活性化することを明らかとした。今後、その詳細な分子機構が解明されれば、肥満や代謝疾患を始めとした不動化が関わる様々な病理現象の発症機構の理解にも繋がる可能性があり、高い科学的波及効果が得られると考えられる。

近年、様々な疾患の発症病理に腸内細菌叢の変化が関わる可能性に注目が集まっているが、骨格筋を 10 日間不動化するだけで腸内細菌叢が劇的に変化することは想定外の新知見である。また、腸内細菌が、自身が産生する様々な代謝物の変化などを介して宿主の生理や病理に影響することは良く知られているが、宿主側の要因による腸内細菌叢変化については、宿主が摂取する食事や薬剤の影響以外ほとんど知られていないのが実情である。すなわち、本研究で見出した現象の詳細なメカニズムが明らかとなれば、単に不動化性筋萎縮の発症機構の詳細が明らかとなるだけでなく、「宿主がいかなる内因性機構によって腸内細菌を変える」のかという、宿主ー腸内細菌の共棲関係についての新知見の発見にも繋がる可能性がある。また、宿主の内因性要因が腸内細菌叢腸を変化させる機構が解明できれば、食事や薬剤など、宿主の摂取物に依存しない、新しい観点からの腸内細菌への介入法の開発に繋がる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究における交感神経の活動評価に関する解析は、京都府立大学大学院生命環境科学研究科の岩崎有作先生との共同研究で行った。

文　献

1） Yu Hirata, Kazuhiro Nomura, Yoko Senga, Yuko Okada, Kenta Kobayashi, Shiki Okamoto, Yasuhiko Minokoshi, Michihiro Imamura, Shin'ichi Takeda, Tetsuya Hosooka, Wataru Ogawa. Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1/KLF15 axis. JCI Insight. 2019 Feb 21;4(4):e124952. PMID: 30830866 DOI: 10.1172/jci.insight.124952

2） Yu Hirata, Kazuhiro Nomura, Daisuke Kato, Yoshihisa Tachibana, Takahiro Niikura, Kana Uchiyama, Tetsuya Hosooka, Tomoaki Fukui, Keisuke Oe, Ryosuke Kuroda, Yuji Hara, Takahiro Adachi, Koji Shibasaki, Hiroaki Wake, Wataru Ogawa. A Piezo1/KLF15/IL-6 axis mediates immobilization-induced muscle atrophy. J Clin Invest. 2022 May 16;132(10):e154611. PMID: 35290243 DOI: 10.1172/JCI154611

3） Shigenobu Kishino, Michiki Takeuchi, Si-Bum Park, Akiko Hirata, Nahoko Kitamura, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Ryo Iwamoto, Yosuke Isobe, Makoto Arita, Hiroyuki Arai, Kazumitsu Ueda, Jun Shima, Satomi Takahashi, Kenzo Yokozeki, Sakayu Shimizu, Jun Ogawa. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 29;110(44):17808-13. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24127592 DOI: 10.1073/pnas.1312937110

4） Junki Miyamoto, Miki Igarashi, Keita Watanabe, Shin-Ichiro Karaki, Hiromi Mukouyama, Shigenobu Kishino, Xuan Li, Atsuhiko Ichimura, Junichiro Irie, Yukihiko Sugimoto, Tetsuya Mizutani, Tatsuya Sugawara, Takashi Miki, Jun Ogawa, Daniel J Drucker, Makoto Arita, Hiroshi Itoh, Ikuo Kimura. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. Nat Commun. 2019 Sep 5;10(1):4007. PMID: 31488836 DOI: 10.1038/s41467-019-11978-0