

## 筋肉減少症の予防・改善作用を有する漢方方剤の探索と有効性の解析

(申請代表者)	井上 誠	愛知学院大学薬学部	教授
(所外共同研究者)	田邊宏樹	愛知学院大学薬学部	講師
(所外共同研究者)	中島健一	愛知学院大学薬学部	助教
(所内共同研究者)	渡辺志朗	病態制御研究部門栄養代謝学分野	准教授

### 【要 旨】

筋肉量及び筋力の低下(筋肉減少症)は、加齢だけでなく各種疾患や薬剤の副作用としても起こり、その過度な進行は寝たきりのリスクを高めるだけでなく、基礎代謝量低下に起因する生活習慣病を引き起こす可能性が指摘されている。しかしながら、筋肉減少症の予防及び改善に使用できる薬剤は開発されていない。そこで本研究では、筋萎縮のモデル動物を用いて漢方方剤の有効性の評価及びにその作用機序の解析を実施している。これまでに我々は、デキサメタゾン(DEX)誘発筋萎縮モデルに対して、肢体が萎えて運動障害が生じた状態で使用される加味四物湯を投与した結果、DEX投与による膝下筋肉重量及び体重量の減少を用量依存的に抑制しており、筋肉組織においては蛋白質合成のシグナル伝達系で重要な働きを示すAktの活性化と、筋特異的蛋白質分解酵素であるmuscle atrophy F-box/atrogin-1及びmuscle ring finger-1 (MuRF-1) 遺伝子のmRNAN発現レベルを抑制している傾向を報告している。

今回、我々はより加味四物湯の効果を確認するため、DEXによる筋萎縮誘導の1週間前から方剤投与を開始した。解析の結果、同時投与の検討と同様かそれ以上にatrogin-1及びMuRF-1遺伝子の発現抑制傾向と、Aktの活性化が確認できた。さらにAktの活性化に着目し、筋肉組織においてAktの活性化を伴うシグナルを誘導する因子について検討した。その結果、血中における成長ホルモンやテストステロン、Insulin-like growth factor (IGF)-1濃度に有意な増加は認められなかったが、筋肉組織においてIGF-1遺伝子及びタンパク質の増加傾向が確認された。つまり筋肉組織において、加味四物湯がIGF-1の発現を増加させると、DEXによるAktシグナル抑制を回復させ、筋肉萎縮を改善している可能性が考えられた。さらに、Dex誘発筋萎縮モデルでは、糖質コルチコイド受容体アンタゴニストによって、その病態形成が阻害される可能性を考え、絶食によって誘導される筋萎縮モデルを用いた検討を実施した。加味四物湯を1週間投与した後、2日間絶食を行い、その後膝下筋肉組織における遺伝子発現及びタンパク質発現を検討した。その結果、Dexモデルと同様にatrogin-1及びMuRF-1遺伝子の発現を加味四物湯が有意に抑制していた。しかしながら、Aktの活性化は認められなかった。ただ単に加味四物湯を投与したマウスの筋肉組織においても、Aktの活性化は認められていなかったことから、加味四物湯はAktの活性化以外の経路により、筋特異的蛋白質分解酵素の誘導を阻害している可能性が示唆された。今後、これら因子の誘導経路における加味四物湯の効果を検討していきたいと考えている。

## 「背景・目的」

高齢者における筋量及び筋力の低下は、高齢期における身体的虚弱の主要な原因となるばかりでなく、生体内において一日のエネルギー消費の大半が筋肉で行われている点を考えてみると筋量及び筋力の低下は、基礎代謝量を低下させることで生活習慣病を引き起こす可能性が考えられる。現在、筋萎縮の発症機序が精力的に研究されているが、筋萎縮の予防・改善に使用できる薬剤は開発されていない。筋萎縮の病態の性質を考えた場合、新薬に比べ長期服用可能な複合製剤である漢方方剤は予防・改善薬候補として有望であると考えられる。

本研究では、筋萎縮のモデル動物を用いて漢方方剤の有効性の評価及びにその作用機序の解析を実施している。これまでに我々は、C57BL/6 マウス(雌性 10 週齢)を用いたデキサメタゾン(DEX)誘発筋萎縮モデルに対して加味四物湯を投与した結果、DEX 投与による膝下筋肉重量及び体重量の減少を用量依存的に抑制しており、筋肉組織においては蛋白質合成のシグナル伝達系で重要な働きを示す Akt の活性化と、筋特異的蛋白質分解酵素である muscle atrophy F-box/atrogen-1 及び muscle ring finger-1 (MuRF-1) 遺伝子の mRNA 発現レベルを抑制している傾向を報告している(図 1)。今回、我々はより加味四物湯の効果を確認するため、DEX による筋萎縮誘導の 1 週間前から方剤投与を開始したモデルマウスを用いて、その効果および機序を検討した。さらに、別の筋萎縮モデルとして、48 時間の絶食負荷によって誘導される筋萎縮モデルマウスを用いて、加味四物湯の効果を検討したので報告する。

## 「結果・考察」

骨格筋において、筋肉を増加させる働きを有する因子として、成長ホルモンやインスリン・インスリン様成長因子 IGF-1 などがあり、さらにこの IGF-1 はテストステロンによって誘導されることが報告されている。今回、加味四物湯がこれらの因子(成長ホルモン、IGF-1、テストステロン)に対して、その血中濃度を増加させることで作用している可能性を考え、解剖時における血漿を用いて、その血中濃度を検討した(図 2)。その結果、加味四物湯は、3 つの因子に対して、何ら作用を示していないことが分かった。

次に、我々はより加味四物湯の効果を検討するため、DEX 投与による筋萎縮誘導開始 1 週間前から加味四物湯の投与(500 mg/kg)を開始したモデルマウスを用いて、同時投与の検討と同様の検討を実施した。その結果、同時投与の検討と同様に、加味四物湯は、muscle atrophy F-box/atrogen-1 及び muscle ring finger-1 (MuRF-1) 遺伝子の mRNA 発現レベルの低下作用と、Akt のリン酸化亢進作用が確認できた(図 3)。同時投与の検討において、筋増強シグナルである Akt のリン酸化亢進作用は、その上流にある IGF-1 タンパク質の増加であると仮定し、血中濃度を検討したが、有意な変動は認められなかった。そこで今回、この IGF-1 の増加が、筋肉組織局所的に生じている可能性を考え、筋組織における IGF-1 遺伝子発現及びタンパク質発現について検討した(図 4)。その結果、遺伝子レベル及びタンパク質レベルにおいて、増加傾向を示めしたが有意なものではなかった。

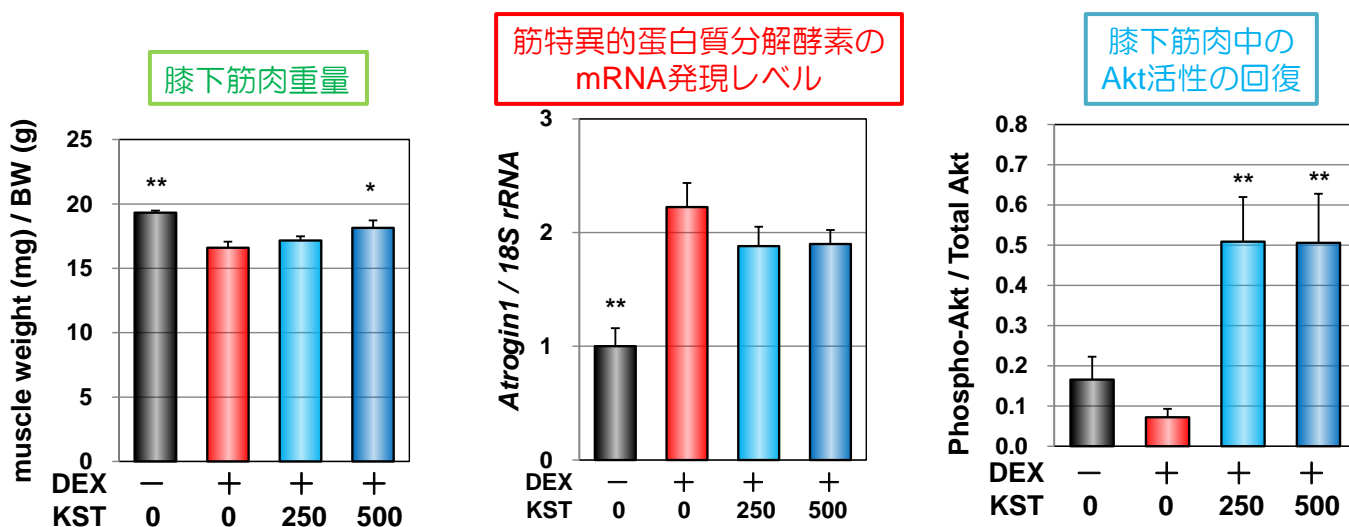
さらに、我々は別の筋萎縮モデルを用いて、加味四物湯の効果を検討した。本モデルは、マウスに対して 48 時間の絶食負荷をかけることで、血糖値の低下による、インスリンシグナルの減少による筋特異的分解タンパク質の誘導及び筋増強シグナルの喪失と、細胞内の AMP/ATP 比の増加による AMPK 活性化を介した筋増強シグナルの喪失によるものであると考えられている(図 5)。そこで、我々は ICR マウス(雄性 10 週齢)に加味四物湯を 1 週間 500 mg/kg の投与量で胃内強制投与した後、絶食負荷 48 時間後に解剖を行い、膝下筋肉を回収した。DEX モデルと同様に膝下筋肉重量に関して顕著な差は認められなかったが、DEX モデルの場合と同様に、種々の因子について検討を行った。まず、筋特異的蛋白質分解酵素及び筋増強に関与する因子の遺伝子発現量についてだが(図 6)、DEX モデルの場合と同様に、筋特異的蛋白質分解酵素である Atrogen1 及び MuRF1 遺伝子の発現増加を加味四物湯が有意に抑制していた。一方、筋増強に関与する因子を誘導してくる PGC-1 $\alpha$  は、絶食負荷により増加していたが、この反応は、絶食によって低下したエネルギー源を確保するため脂肪酸消費を高めるための反応と考えられた。一方、加味四物湯はその増加に対して影響を与えていなかった。また、ミトコンドリアタンパク質の転写因子として働く NFR1 については、絶食負荷によって何ら影響はなかったが、加味四物湯によって有意に抑制されていた。

次に、筋肉萎縮に関連するタンパク質発現量についての検討を行った(図7)。その結果、Aktのリン酸化比については、絶食により減少していたが、DEXモデルの場合とは異なり加味四物湯投与による回復・亢進作用は認められなかった。また、遺伝子レベルで発現増加抑制がみられた Atrogin1 タンパク質については、絶食負荷で増加傾向を示し、それを加味四物湯が有意に抑制した。また、Atrogin1の転写因子のひとつである FoxO1 タンパク質についても、同様な傾向が認められた。

「結論」

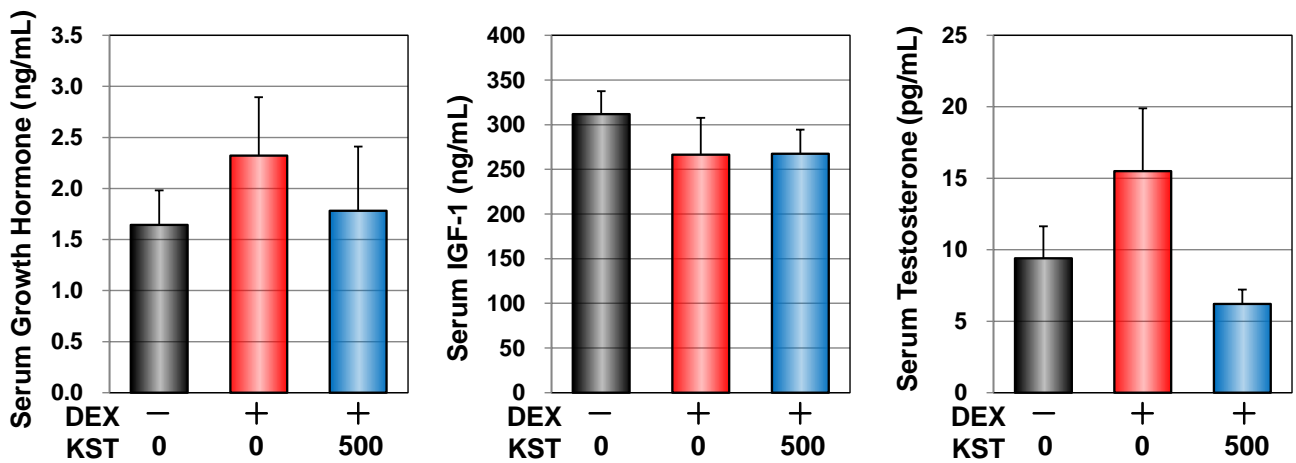
今回、ふたつの筋肉萎縮モデルマウスを用いて、加味四物湯の筋萎縮改善作用の機序解析を実施した。両モデルに対して、加味四物湯は、筋特異的蛋白質分解酵素である Atrogin1 及び MuRF1 遺伝子の発現低下作用を示した。これら遺伝子の転写因子 FoxO1 を不活性化するリン酸化酵素 Akt の活性についても、両モデルにおいても Control 群においてリン酸化(活性)体の減少がみられたが、加味四物湯は DEX モデルにおいてのみ回復・亢進作用を示し、絶食モデルでは何ら作用を示さなかった。両モデルにおける、筋特異的分解酵素の誘導シグナルが異なるため、Akt に対する反応が異なることが考えられた。しかしながら、筋特異的蛋白質分解酵素の誘導抑制作用は、他の筋萎縮モデル(担癌状態モデルや除神経モデル、後肢懸垂モデルや糖尿病モデル、老化促進モデル)に対しても有効であり、これらの筋萎縮を改善する可能性が大いに期待できる。

また、筋萎縮モデル動物を用いて筋萎縮予防・改善作用を有する加味四物湯以外の漢方方剤を探索することで、有効性を示す漢方方剤を見出すことができれば、筋萎縮という疾患の長期性に対応できる漢方方剤の新しい方面への応用を支持する科学基盤形成に寄与できるものと期待している。



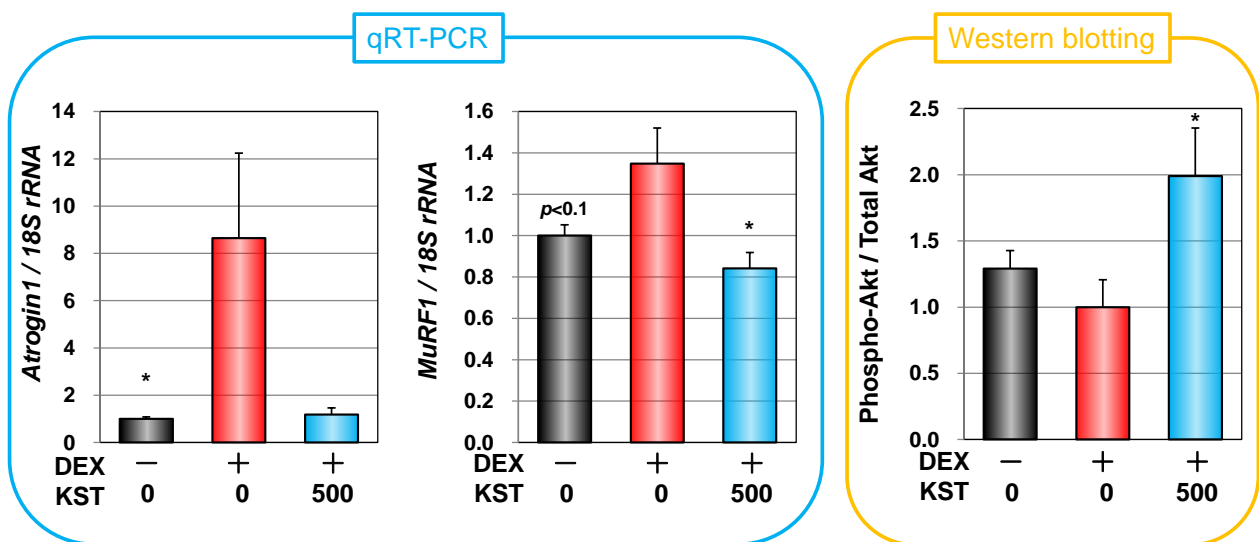
Error bars represent mean + SE (n=6), \* p<0.05, \*\*p<0.01 vs Control.

図1. デキサメタゾン誘導筋萎縮モデルマウスに対する加味四物湯(同時投与)の効果(昨年度報告)



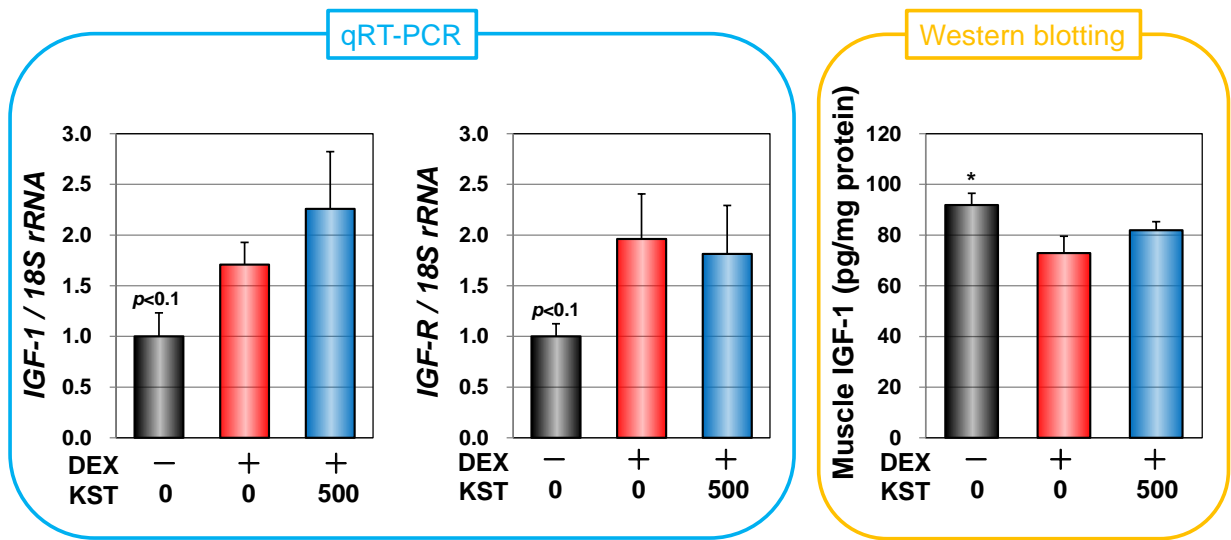
Error bars represent mean + SE (n=6).

図2. デキサメタゾン誘導筋萎縮モデルマウスの血中ホルモン濃度に対する加味四物湯(同時投与)の効果



Error bars represent mean + SE (n=5-8), \*  $p < 0.05$  vs Control.

図3. デキサメタゾン誘導筋萎縮モデルマウスの筋特異的蛋白質分解酵素の遺伝子発現と筋増強シグナル Akt のリン酸化に対する加味四物湯(前投与)の効果



Error bars represent mean + SE (n=5-8), \*  $p < 0.05$  vs Control.

図4. デキサメタゾン誘導筋萎縮モデルマウスの筋肉組織におけるIGF-1遺伝子及びタンパク質発現量に対する加味四物湯(前投与)の効果

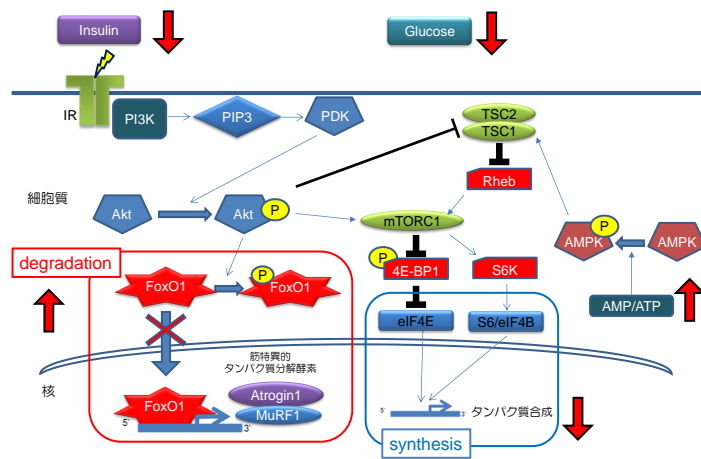
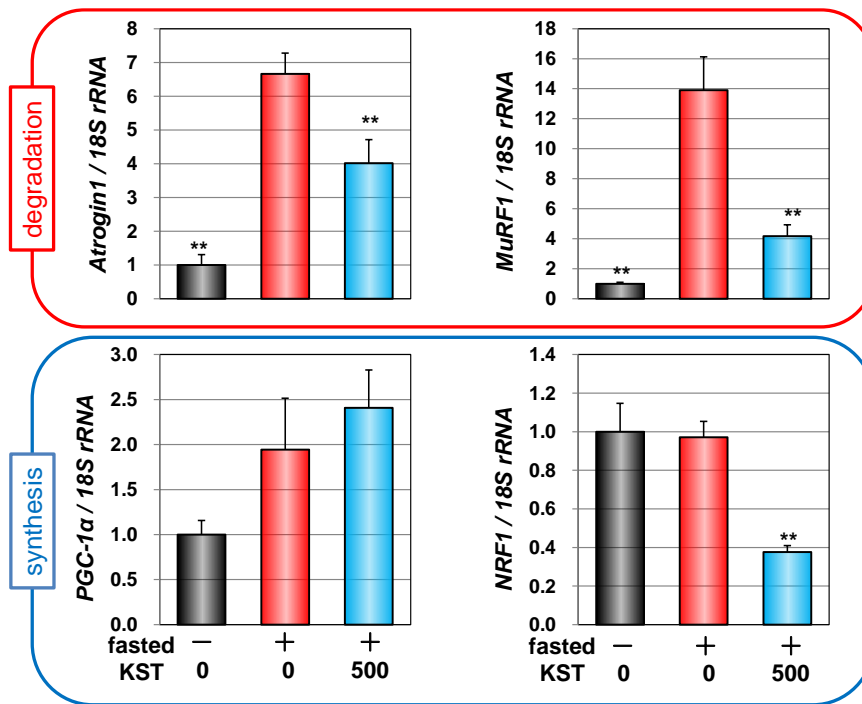
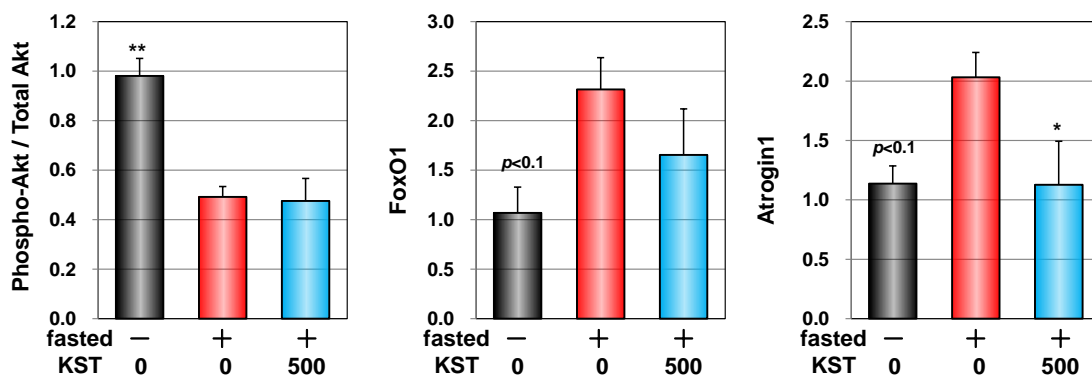


図5. 絶食による筋萎縮誘導の機序



Error bars represent mean + SE (n=6-7), \*\*p<0.01 vs Control.

図6. 絶食誘導筋萎縮モデルの筋肉合成・萎縮に関連する遺伝子発現に及ぼす加味四物湯の効果



Error bars represent mean + SE (n=6-7), \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs Control.

図7. 絶食誘導筋萎縮モデルの筋肉合萎縮に関連するタンパク質発現量に及ぼす加味四物湯の効果