

高齢者糖尿病とフレイルが合併する分子学的機序について

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学
藤本 拓

1. 諸言

急増する要介護要支援認定の原因となる高齢者糖尿病とフレイル・サルコペニアの予防・改善は生物学的寿命と健康寿命両方の延伸につながる。糖代謝の8割は骨格筋が担い、糖尿病によって骨格筋細胞の老化が促進され、骨格筋機能は量的質的に低下する。申請者は筋肉由来サイトカイン（マイオカイン）である Interleukin-15 (IL-15) が adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 経路を介した糖代謝改善作用を報告した¹⁾。一方低酸素誘導性因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α : HIF-1 α) は運動に伴う組織内低酸素によって賦活され、AMPK 経路を賦活する²⁾。同時に HIF-1 α は生殖系幹細胞のテロメラーゼを活性化することが知られており³⁾、運動によって分泌された IL-15 が AMPK 経路を介し骨格筋幹細胞機能を賦活している可能性がある。IL-15 による骨格筋幹細胞機能の影響を研究することによって骨格筋機能低下である糖尿病やフレイル・サルコペニアの予防につながる意義がある。

2. 方法

骨格筋に対し IL-15 が果たす機能を検討するため、野生型として C57B6J マウス、骨格筋特異的 IL-15 過剰発現マウス (IL-15TG) と IL-15 ノックアウトマウス (IL-15KO) を用いた検討を行った。IL-15KO は C57B6N CrI を遺伝的背景としたマウスであったため、C57B6J とのバッククロス交配をおこなった。また3種のマウスに対しトレッドミル運動器械を用いて、それぞれ音だけを聞かせたコントロール群とトレッドミル運動群 (Ex) にわけ解析を行った。

全身麻酔下に解剖を行い、ヒラメ筋 (soleus muscle : Sol)、腓腹筋 (Gastrocnemius muscle : Gas)、長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle : EDL)、前脛骨筋 (tibialis anterior muscle : TA) を回収した。回収した骨格筋は液体窒素にて速やかに凍結保存した。組織学的評価は回収した骨格筋に対しヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin Eosin : HE) 染色、コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase : SDH) 染色を行い、筋線維断面積、ミトコンドリア機能についての検討を行った。また、RT-PCR による遺伝子解析を行った。

3.結果

運動負荷をかけていないマウスについて、IL-15TGの骨格筋量は特に腓腹筋（Gas）で少なく、速筋優位に骨格筋量が少ないという先行研究と同様であった（表1）。またIL-15KOは体重、骨格筋ともに低値であった。骨格筋量/体重比（Muscle to body weight ratio）で見ると野生型と比較しIL-15TGは腓腹筋（Gas）で低値だったが、IL-15KOは明らかな野生型との違いを示さなかった。運動負荷なしの3種の骨格筋量の比較の結果は、バッククロス前の野生型比較データと同様の結果であった。（表示なし、未発表データ）運動負荷をかけたマウスでは、野生型の骨格筋量が明らかな増加を示さなかったのに対し、IL-15TGではヒラメ筋（Sol）で骨格筋量の増加を示し、IL-15KOでは腓腹筋（Gas）の骨格筋量が増加していた。

表1 骨格筋量

	野生型	野生型 運動群	IL-15KO	IL-15 運動群	IL-15TG	IL-15T 運動群
	N=7	N=5	N=1	N=3	N=2	N=2
体重	29	26	24	24	31	29
Sol（ヒラメ筋）						
骨格筋量（mg）	10.5	9.1	8.0	8.2	10.3	12.3
骨格筋量/体重比（mg/g）	0.36	0.35	0.33	0.34	0.33	0.42
Gas（腓腹筋）						
骨格筋量（mg）	142	134	113	123	85	91
骨格筋量/体重比（mg/g）	4.9	5.1	4.7	5.2	2.7	3.1

組織学的解析では、腓腹筋における筋横断面積を検討した。IL-15TGでは筋量と同様に野生型よりも筋横断面積は低値を示したが、運動負荷によって筋横断面積の低下は緩和されていた（図1）。一方IL-15KOは運動による骨格筋量の変化は明らかとはいえなかった。

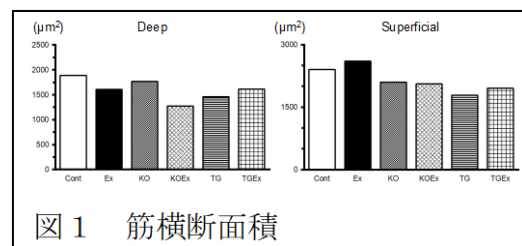


図1 筋横断面積

次に骨格筋のミトコンドリア機能について評価を行った。SDH染色による筋繊維の濃淡は、ミトコンドリア機能を反映する。運動負荷のない状態では野生型と比較しIL-15TG、IL15KOとも明らかな差を認めなかった（図2）。対照的に野生型マウスが習慣的運動により濃染されているのに対し、IL-15TGとIL-15KOで

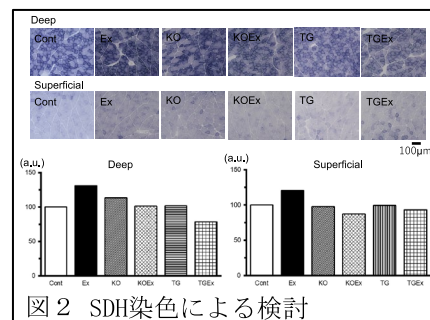


図2 SDH染色による検討

は運動によってより薄染されている傾向であった。遺伝子的にもミトコンドリア機能に関する遺伝子である PGC1 α 、T-fam の mRNA 発現は IL-15TG で発現が減弱している傾向にあった (図 3、有意差なし)。

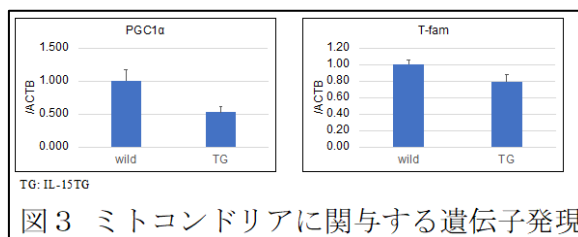


図 3 ミトコンドリアに関与する遺伝子発現

次に、IL-15 による骨格筋幹細胞発現への影響を検討した。遅筋であるヒラメ筋 (Sol) と速筋である長趾伸筋 (EDL) について Pax7 の遺伝子解析を行なった (図 4、n=4-7)。

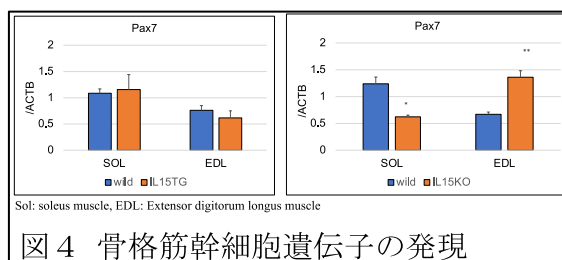


図 4 骨格筋幹細胞遺伝子の発現

Pax7 は骨格筋幹細胞特異的に発現する遺伝子である。IL-15TG では SOL と EDL ともに野生型と有意な差を認めなかったのに対し、IL-15KO では SOL における発現減弱がみられ、反対に EDL において発現亢進がみられた。

4.考察

糖尿病やフレイル・サルコペニアの予防のために、骨格筋機能の研究が必要と考えられる。われわれはマイオカイン IL-15 に着目し、IL15 が骨格筋幹細胞や骨格筋機能に及ぼす影響を検討した。

運動負荷をかけていないマウスでは IL-15TG、IL-KO ともに骨格筋量が低値であったが、IL-15TG が体重に対して骨格筋量が低値であったのに対し、IL-15KO は体格自体が小さく体重に対する骨格筋量の低下は明らかではなかった (表 1)。運動負荷に対する骨格筋量の変化は、興味深いことに IL-15TG では遅筋であるヒラメ筋 (Sol) が筋量増加を示し、IL-15KO では速筋優位である腓腹筋 (Gas) の筋量が増加していた。この違いによって、IL-15 が運動後の骨格筋量調整機能や、筋繊維タイプの速筋成分から遅筋成分へのスイッチングに関与していることが示唆される。

IL-15TG は筋量だけでなく、組織学的にも野生型よりも低値の筋横断面積を示した (図 1)。一方 IL-15KO は組織学的に見ると野生型と同等の筋横断面積であると考えられた。運動による骨格筋量の変化は IL-15TG と IL-15KO で逆の結果であり、IL-15TG が筋肥大傾向を示したのに対し、IL-15KO はその効果がみられなかった。これらの結果からも、運動後の骨格筋量や組成について IL-15 が関与している可能性が示唆された。骨格筋の肥大にはタンパク合成系が関与するが、その上流シグナルにインスリンシグナルがあり、AMPK 経路はこれに拮抗する。AMPK は運動急性期には賦活されるが、習慣的な運動により血管新生が抑制されると、HIF-1 α とその下流の AMPK は抑制されタンパク合成系の抑制は緩和される⁴⁾。IL-15 は AMPK 経路を賦活するが、IL-15TG においてはタンパク合成系の抑制による筋萎縮と、習慣的な運動による AMPK 経路の抑制・タンパク合成系抑制の緩和が

より強調されて起こったと考えられる。今後 HIF-1 α の検討や、IL -15KO に IL-15 を投与することでこの考察をさらに検討する必要がある。

次に骨格筋の機能的評価を行うため、ミトコンドリア機能について組織学的観点と遺伝子学的観点から検討した（図 2、3）。SDH 染色による検討では IL -15TG、IL -15KO ともにミトコンドリア機能の賦活を示すことはできなかったが習慣的運動による効果が野生型と異なる傾向で見られることからミトコンドリアに対して作用を持つことが示唆される。RT-PCR による検討では、PGC1 α 、T-fam ともに IL-15TG で発現が減弱している傾向にあった。既報では IL-15 はむしろミトコンドリア機能を賦活すると報告されており⁵⁾、ウエスタンブロット法によるタンパクレベルでの発現を今後検討予定である。

骨格筋幹細胞において発現する Pax7 が IL -15KO において遅筋での発現減弱と側近での発現亢進を認めたことから（図 4）、IL-15 が骨格筋幹細胞機能に作用する仮説が支持された。機序として HIF-1 α を介した遺伝子調節をおこなっている可能性があり、今後さらに HIF-1 α の発現の検討、骨格筋幹細胞を抽出しテロメア機能を検討予定である。

5.結語

本研究は骨格筋代謝機能と骨格筋幹細胞機能・細胞老化との関連をマイオカインの観点から明らかにすることを目標としている。残念ながら新型コロナウイルスの影響で計画に遅れが生じているが、本報告では組織学的、遺伝子学的なアプローチで骨格筋の性状および幹細胞機能の評価を行った。その結果、IL-15 が骨格筋量と機能、骨格筋幹細胞遺伝子発現に関与していることが明らかとなった。現在テロメア機能についても解析中である。今後はヒト白血球から抽出した DNA のテロメア長・テロメラーゼ活性で評価し、マイオカイン IL-15 が骨格筋幹細胞、細胞老化および心血管病発症に与える影響の検討も行う予定である。

6.文献

- 1) T. Fujimoto, K. Sugimoto, T. Takahashi, Y. Yasunobe, K. Xie, M. Tanaka, et al., Overexpression of Interleukin-15 exhibits improved glucose tolerance and promotes GLUT4 translocation via AMP-Activated protein kinase pathway in skeletal muscle, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2019; 509, 994-1000.
- 2) M. Lee, J.T. Hwang, H.J. Lee, S.N. Jung, I. Kang, S.G. Chi, et al., AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells, *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 39653-39661.
- 3) H. Nishi, T. Nakada, S. Kyo, M. Inoue, J.W. Shay, K. Isaka, Hypoxia-Inducible Factor 1 Mediates Upregulation of Telomerase (hTERT), *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24, 6076-6083.
- 4) M. Tanaka, K. Sugimoto, T. Fujimoto, K. Xie, T. Takahashi, H. Akasaka, et al., Differential effects

of pre-exercise on cancer cachexia-induced muscle atrophy in fast- and slow-twitch muscles, The FASEB Journal 2020; 34, 14389-14406.

5) L.S. Quinn, B.G. Anderson, J.D. Conner, T. Wolden-Hanson, IL-15 Overexpression Promotes Endurance, Oxidative Energy Metabolism, and Muscle PPAR δ , SIRT1, PGC-1 α , and PGC-1 β Expression in Male Mice, Endocrinology 2013; 154, 232-245.

7.成果発表

雑誌論文

- M. Tanaka, K. Sugimoto, T. Fujimoto, K. Xie, T. Takahashi, H. Akasaka, et al., Differential effects of pre-exercise on cancer cachexia-induced muscle atrophy in fast- and slow-twitch muscles, The FASEB Journal 2020; 34, 14389-14406.
- M. Isaka, K. Sugimoto, T. Fujimoto, Y. Yasunobe, K. Xie, Y. Onishi, et al., The utility of the ultrasonographic assessment of the lower leg muscles to evaluate sarcopenia and muscle quality in older adults, JCSM Clinical Reports 2021; 6, 53-61.