

原著論文

骨格筋萎縮時の鍼刺激によるマウス体重／摂食量動態について

遠田明子¹⁾ 櫻井敬晋²⁾
 溝口秀雪³⁾ 福林徹⁴⁾

Changes in Body Weight and Food Consumption Caused by the Effect of Acupuncture on Skeletal Muscle Atrophy in Mice

Akiko Onda¹⁾, Takakuni Sakurai²⁾, Hideyuki Mizoguchi³⁾ and Toru Fukubayashi⁴⁾

¹⁾ Graduate School of Sport Sciences, Waseda University, Japan

²⁾ Department of Judo Therapy, Faculty of Health Sciences, Tokyo Ariake University of Medical and Health Sciences, Japan

³⁾ Hanada College, The Japan school of Acupuncture, Moxibustion and Physiotherapy, Japan

⁴⁾ Faculty of Sport Sciences, Waseda University, Japan

Abstract : Disuse skeletal muscle atrophy produces severe effects among the elderly, not only affecting the quality of life but also imposing social burdens such as medical costs and the need of caregivers. In a previous study, we demonstrated that acupuncture treatment could significantly improve the soleus skeletal muscle atrophy induced by hindlimb suspension (HS). In the present study, we investigated the changes in body weight and food consumption of mice (C57 BL/6) during the course of skeletal muscle atrophy using the same HS model. Twenty-eight male mice were randomly divided into 4 groups: control (C), HS, manual acupuncture (MA), and electroacupuncture (EA). Acupuncture treatments were conducted on the gastrocnemius of the MA and EA (acupuncture intervention) groups for 12 days. Compared to the body weight on the first day, the body weight on the final day was 98% in the C group, 90% in the HS group, 90% in the MA group, and 87% in the EA group. The body weights of the HS, MA, and EA groups were significantly lesser than that of the C group ($p < 0.05$ for all) ; however, there were no significant differences among them. The food consumption of each group did not show any significant differences after the sixth day. These results and previous results indicate that a 12-day acupuncture therapy regimen alleviates soleus muscle atrophy induced by HS, albeit without changing the body weight. Although the body weights were changed in the HS, MA, and EA groups compared to the C group, the food consumptions were not changed in all groups after the sixth day. These results suggest that hitherto unknown factors are responsible for the differences between body weight and food consumption among these groups.

key words : hindlimb suspension, skeletal muscle atrophy, mice, PI3K, Akt

要旨 : 骨格筋廃用性萎縮は高齢者の日常生活のQOLに影響を与えるだけでなく、医療費や介護の必要性など社会的にも大きな問題となっている。我々は先行研究において、後肢懸垂型筋萎縮モデルにより引き起されたヒラメ筋の萎縮は、鍼刺激によって有意に改善される可能性を示した。本研究ではマウス (C57 BL/6) 骨格筋萎縮過程における鍼刺激介入時の体重と摂食量動態を検証した。28匹のマウスの群分けは4群 (対照群, 後肢懸垂群, 置鍼群, 鍼通電群) とし、無作為に群分けを行なった (各群 $n = 7$)。鍼治療は置鍼群と鍼通電群の腓腹筋に12日間連続して行なった。後肢懸垂モデルによる体重変動量は、実験開始日と比較して12日後に対照群98%, 後肢

1) 早稲田大学大学院スポーツ科学研究科

2) 東京有明医療大学保健医療学部柔道整復学科

3) 花田学園 日本鍼灸理療専門学校

4) 早稲田大学スポーツ科学学術院

E-mail address : sango5800@gmail.com

懸垂群90%, 置鍼群90%, 鍼通電群87%であった。対照群と後肢懸垂介入群間（後肢懸垂群, 置鍼群, 鍼通電群）では有意差がみられたが（各 $p < 0.05$ ）, 後肢懸垂介入群間では有意差は全くみられなかった。また, 摂食量においては, すべての群間で6日目以降では有意差はみられなかった。先行研究と本実験結果において, 12日間の鍼治療は後肢懸垂によって引き起されたヒラメ筋の筋湿重量を増加させるが, 体重の減少を緩和しない可能性が高いことが示された。また, 体重動態において対照群と後肢懸垂介入群間では有意差が見られるにも関わらず, 摂食量は全群間で6日目以降では有意差が消失していることから, 体重減少と摂食量の相関には現在では解明されていない因子が関わっている可能性が高いことが示唆された。

キーワード：後肢懸垂, 骨格筋萎縮, マウス, ホスファチジルイノシトール3キナーゼ, プロテインキナーゼB

I. 緒 言

高齢者の廃用症候群は日常生活のQOLに深刻な影響を与えるが, 最適な治療法は未だに解明されていない。様々な症状が顕在化する廃用症候群の中でも, 骨格筋萎縮は長期臥床や転倒/骨折に伴うギプス固定, 不活動などによって引き起こされる。高齢化による筋量の低下は, 加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と呼ばれており¹⁾, その症状は糖尿病/高血圧などの疾患を併発するケースもあり, 治療方法が制限されることも多い。

骨格筋萎縮を引き起こす分子生物学的メカニズムは, ノックアウトマウスによる阻害実験により, 筋萎縮を引き起こす原因遺伝子として筋特異的萎縮関連遺伝子（E3ユビキチン・リガーゼ）であるatrogin-1, MuRF1が2001年に同定された^{2,3)}。ほとんど全ての骨格筋萎縮においてこれら2遺伝子の発現が亢進することから, atrogin-1, MuRF1は筋萎縮の原因遺伝子と考えられている⁴⁾。骨格筋の筋量は骨格筋を構成する構造タンパク質の合成と分解のバランスの上に成立しているが, そのバランスが分解の方に傾いた場合, 骨格筋萎縮は引き起こされる。

鍼治療の治効メカニズムは未だに不明の部分が多いが, 骨格筋の治療にも用いられている⁵⁾。高齢者の日常生活のQOLの確保のためにも, 骨格筋萎縮抑制に適切な対処法が必要である。我々の先行研究において, 12日間の鍼刺激により分解経路では鍼通電療法によりatrogin-1, MuRF1などの筋萎縮関連遺伝子, また合成経路では置鍼法によりAkt1, TRPV4などの発現量が有意に改善されるという結果が導きだされた。しかし, 骨格筋を構成する構造タンパク質の合成/分解経路の遺伝子のそれぞれの発現量バランスは不明であり, 体重ならびに摂食量変化と筋湿重量変化はどのように関わっているのかは不明である。よって本研究では, 後肢懸垂実験介入時の体重と摂食量の変化過程の報告を行うこととする。

II. 方 法

1. 対象

実験には8週齢の近交系雄マウス（C57 BL/6）を用

いた。各群とも室温22℃の恒温室内にて飼育した。なお, 本研究は早稲田大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた（早稲田大学 先端生命医科学センター 動物実験倫理委員会 承認番号10-A58）。

2. 骨格筋萎縮モデル

廃用性萎縮モデル作成は, Morey変法⁶⁾に則り, 臀部より1 cm の位置の尾部にテープを貼り, 金具を取り付けて飼育ケージの天井より12日間の後肢懸垂を行った。

3. 実験デザイン

群分けは4群とし, 対照群（control ; C群）, 後肢懸垂群（hindlimb suspension ; HS群）, 後肢懸垂+置鍼群（manual acupuncture ; MA群）, 後肢懸垂+鍼通電1 Hz群（electroacupuncture; EA群）とした（各群 n= 7）。

4. 刺鍼および鍼通電条件

刺鍼は, ベントバルビタール（共立製薬, 東京）による深麻酔下にて, ディスポーザブル鍼（30ミリ・12号・ステンレス鍼, セイリン, 静岡）を用いて行なった。麻酔投与は腹腔内投与とし, C群にも同様に投与した。鍼刺激は, MA群, EA群ともに後肢懸垂開始の翌日から毎日30分間, 深麻酔下のマウスに12日間連続して行った。鍼の角度は地面と水平に尾部から頭部に向かって5 mmの深さで両肢腓腹筋遠位部2ヵ所に刺鍼した。低周波鍼通電はオームパルサー（LFP4000, 全医療器, 福岡）を用いて, 電流出力はパルスカレント6.5 mAで1 Hzの頻度とした。

5. 体重/摂食量測定

体重および摂食量の測定は毎日ほぼ同時刻に行なった。食餌と水は自由摂取とした。餌は1日10gを目安として床に散布し, 体重測定時に床清掃を行ない, 残餌を計量した。床に残った粉末状の残餌は摂食量から除外した。

6. 統計処理

体重および摂食の変化量は平均値±標準誤差で表した。平均の差の検定には二元配置分散分析を用い, 有意差のあるものはBonferroni post-testsを用いた。実

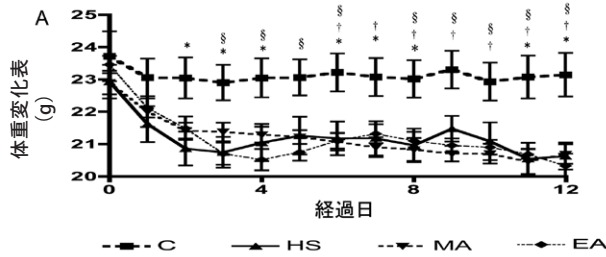


図1 A 体重変化表

12日間の後肢懸垂群ならびに置鍼群、鍼通電群の体重変化を示した、対照群との比較において、* : $P < 0.05$ は後肢懸垂群、† : $P < 0.05$ は置鍼群、‡ : $P < 0.05$ は鍼通電群との比較を示す、対照群と介入群（後肢懸垂、置鍼、鍼通電）では有意差が見られたが、介入群間では有意差は見られなかった、 $n = 7$ 、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$ 。

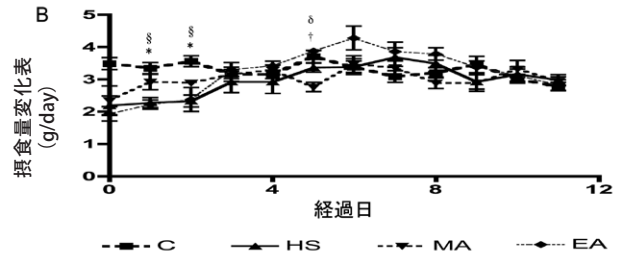


図1 B 摂食量変化表

12日間の後肢懸垂群ならびに置鍼群、鍼通電群の摂食量変化を示した、対照群との比較において、* : $P < 0.05$ は後肢懸垂群、† : $P < 0.05$ は置鍼群、‡ : $P < 0.05$ は鍼通電群との比較を示す。δ : $P < 0.05$ は置鍼群と鍼通電群の比較を示す。6日目以降は全ての群間で有意差は見られなかった、 $n = 7$ 、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$ 。

験終了時の体重差は平均の差の検定には一元配置分散分析を用い、有意差のあるものはTukey's Multiple Comparison Testを用いた。

Ⅲ. 結 果

1. 体重変化

後肢懸垂により、C群と比較してHS、MA、EA群で、体重に有意差がみられた。C群と比較して後肢懸垂群では、2、3、4、6、7、8、11、12日目で有意に減少した。また、C群とMA群間では、6、7、8、9、10、11、12日目、C群とEA群間では、3、4、5、6、8、9、10、11、12日目で有意に減少した（各 $p < 0.05$ ）。C群の12日間の平均体重は23.1g、HS群は21.2g、MA群は21.2g、EA群は21.2gであった。C群の最小値は、実験開始日と比較して、1、2、3、4、5、7、8、10、11日目で97%、HS群では3、11、12日目で90%、MA群では、11日目で89%、EA群では、4、12日目で87%であった。本実験の体重変化は、HS群では3日目、EA群では4日目に最小値を示していることから、初期の段階で骨格筋萎縮がピークに達し、その後回復過程を示し、最終日12日目ころに再度萎縮が亢進している可能性が示唆された。

2. 摂食量変化

後肢懸垂により、実験開始日にC群間と比較してHS、MA、EA群で、摂食量に有意差がみられた。C群と比較して後肢懸垂群では、0、1、2日目で有意に減少した。また、C群とMA群間では、0、1日目、C群とEA群間では、0、1、2日目で有意に減少した。MA群とEA群間では、5日目に有意差がみられた（各 $p < 0.05$ ）。C群の平均摂食量は3.3g、HS群3.0g、MA群3.0g、EA群3.2gであった。C群の最大値は、6日目で3.7g、HS群では8日目で3.7g、MA群では、7日目で3.5g、EA群では、7日目で4.3gであった。摂食量のピークは、全群で6日から8日の間であった。

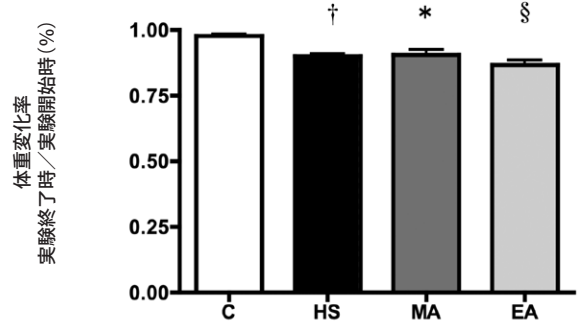


図2 体重変化率 (%)

12日間の後肢懸垂ならびに鍼刺激介入実験後の体重変化を、実験終了時の体重を実験開始時で除して示した、対照群と介入群間（後肢懸垂、置鍼、鍼通電）では有意差が見られたが、介入群間では有意差は見られなかった。* : $P < 0.05$ 、† : $P < 0.01$ 、§ : $P < 0.001$ 、 $n = 7$ 、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$ 。

3. 終了時体重差

実験終了時の体重差はC群とHS群、MA群、EA群間で有意差が見られた。HS群、MA群、EA群間では、有意差は見られなかった。実験終了時の体重は、C群23.1g、HS群20.6g、MA群20.7g、EA群20.3gであった。減少率は実験開始日と比較してC群98%、HS群90%、MA群90%、EA群87%であった（各 $p < 0.05$ ）。

Ⅳ. 考 察

我々は先行研究において、骨格筋の萎縮を引き起こす原因とされる標的遺伝子atrogin-1、MuRF1のmRNAの発現量を定量化することにより、骨格筋の分解経路に鍼通電療法が与える影響の解析を行なった。また、ヒラメ筋湿重量も置鍼ならびに鍼通電療法によって有意に減少して行く状態が抑制されたことから（各 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ）、置鍼および鍼通電療法の筋萎縮に対する有用性を示唆する結果となった⁷⁾。しかし、同研究のモデル

作成において、後肢懸垂によりatrogin-1, MuRF1などの骨格筋分解の経路のみではなく合成経路であるPI3KのmRNAも有意に上昇していた。つまり、我々の先行研究では後肢懸垂というモデル作成によって、分解と合成の両経路でヒラメ筋のmRNAの活性化という一見矛盾した結果が得られた。

骨格筋の筋量は骨格筋を構成する構造タンパク質の合成と分解のバランスの上に成立しているが、そのバランスが分解の方に傾いた場合、骨格筋萎縮は引き起される。骨格筋にグルコースを取り込む経路は、インスリンと筋収縮（運動）の2つの経路が解明されている⁸⁾。インスリン-PI3K(Phosphatidylinositol 3 kinase)-Akt (protein kinase B)の経路は摂食による構造タンパク質の合成の経路に深く関わっていることが解明されている⁹⁾。インスリンやInsulin-like growth factor (IGF-1)がインスリン受容体に結合すると、受容体の自己リン酸化に伴いInsulin receptor substrate-1 (IRS-1)もリン酸化される。このIRS-1にPI3Kが結合することによって、グルコーストランスポーター4型 (GLUT4)が細胞質内から形質膜へ移行し、筋中にグルコースが取り込まれる¹⁰⁾。PI3Kは摂食によるインスリンの経路と深く関わっており¹¹⁾、Aktはタンパク質リン酸化酵素であり、PI3Kの下流にあることが知られている⁹⁾。我々の先行研究によって合成の経路であるPI3Kが後肢懸垂によってヒラメ筋で有意に増加する事が解ったが、下流のAktでは有意な上昇はみられていないので、mRNAの発現においては食物の異化ならびに同化過程のタイムラグが生じている可能性も存在する。PI3Kに深く関わる摂食量は6日以降では全群に差はみられないが体重は介入群で減少していることから、現時点ではまだ解明されていないインスリンによる合成経路以外の因子によって体重の減少が引き起されている可能性が示唆される結果となった。また、我々の先行研究ではヒラメ筋のmRNAの発現動態では、MA群でAkt1, TRPV4で有意差を得たが、EA群では有意差は見られなかった。電気刺激を用いないMA群と電気刺激をおこなうEA群では鍼の治効メカニズムが異なる可能性も指摘されており、置鍼による刺激でカルニチンが増加するという報告がある¹²⁾。我々の先行研究において鍼刺激をおこなったMA群、EA群では、HS群と比較してヒラメ筋湿重量の有意な増加がみられたが⁷⁾、本研究により鍼刺激は後肢懸垂によって引き起された体重減少に影響しない可能性が示された。

現時点では、体重を減少させる因子のみでなく、鍼刺激によって変化するmRNAの発現組織の特定や組織による発現量の違いなどの不明の部分が多い。今後は実験開始後にタイムコースを設定して萎縮過程での様々な因子の発現量動態を定量化する必要がある。また骨格筋萎縮ならびに鍼刺激が萎縮抑制効果のシグナル伝達の経路にどのように関わっているのかという問いに対して、新

たな遺伝子の網羅的探索も試みたい。それらの解明により、骨格筋萎縮を強いられる状況に対して臨床応用の可能な、鍼治療の分子生物学的なエビデンスを確立したいと考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり、東京慈恵会医科大学細胞生理学講座南沢享教授、草刈洋一郎講師、焦其彬助手、また鍼のご指導を頂きました諸先生に心から感謝いたします。

なお、この研究は、文部科学省「挑戦的萌芽研究」、早稲田大学人間総合研究センター・井深基金「東洋医学に関する学際的研究プロジェクト」、早稲田大学スポーツ科学研究科グローバルCOEプログラム「アクティブ・ライフを創出するスポーツ科学」、並びに全日本鍼灸学会「研究助成」の研究事業の一環として助成されました。

参考文献

- 1) 町田修一. 加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)発症の分子機構とその治療. *Japanese Journal Rehabilitation Medicine* 2007; 44: 144-149.
- 2) Bodine SC, Latres E, Baumhueter S et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294: 1704-1708.
- 3) Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U S A* 2001; 98: 14440-14445.
- 4) Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005; 37: 1974-1984.
- 5) Bullock ML, Pheley AM, Lenz SK et al. Short-term outcomes of treatment for musculoskeletal disorders in a hospital-based alternative and complementary medicine clinic. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 1999; 5: 253-260.
- 6) Moery ER. Spaceflight and bone turnover-correlation with a new rat model of weight-lessness. *Bioscience* 1979; 29: 168-172.
- 7) Onda A, Jiao Q, Nagano Y et al. Acupuncture ameliorated skeletal muscle atrophy induced by hindlimb suspension in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 410: 434-439.
- 8) 柳原 大, 内藤久士. 運動とタンパク質・遺伝子. 第1版. 東京: NAP社; 2004. p.182-198.
- 9) Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 1014-1019.
- 10) 山田 茂, 福永哲夫. 生化学, 生理学からみた骨格筋に対するトレーニング効果. 第2版. 東京: NAP社; 2003. p.102-117.
- 11) Stitt TN, Drujan D, Clarke BA et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* 2004; 14: 395-403.
- 12) Toda S. Investigation of Electroacupuncture and Manual Acupuncture on Carnitine and Glutathione in Muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011; 297130.