

博士論文

論文題目 ビタミンD, アミノ酸による炎症制御機構と
サルコペニア治療可能性の検討

氏名 矢可部 満隆

目次

1. 要旨	1
2. 序文	2
3. 方法	14
4. 結果	27
5. 考察	49
6. 文献	58
7. 謝辞	67

1. 要旨

廃用性筋萎縮はサルコペニアの一因である。本研究では、炎症制御により廃用性筋萎縮が改善するかを検討した。アミノ酸の一つである HMB (β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸)は、PP1 α の発現上昇を介し、NF κ B 系、AP-1 系、IL-6 発現を抑制した。ビタミン D の抗炎症効果の 1 つは、VDR の κ B site への結合によると考えられた。HMB とビタミン D は、後肢懸垂モデルマウスの血清 IL-6 濃度上昇と筋萎縮因子発現を抑制し、筋萎縮を軽減した。運動と HMB の併用は、廃用性筋萎縮からの回復に有用であった。HMB, ビタミン D, 運動は廃用性筋萎縮の予防・改善に効果があり、サルコペニアにも応用できる可能性が示唆された。

2. 序文

サルコペニアの概念

サルコペニア(加齢性筋減少症)は、主に加齢に伴う筋量や筋力の減少を意味する。

1989年、Rosenbergは加齢に伴う筋肉量の減少を示す概念として、ギリシャ語の”sarx(筋肉)”と”penia(減少)”を組み合わせた”sarcopenia”という造語を用いた^{1,2}。その後

サルコペニアは、加齢に伴う筋量低下と筋力低下を表す概念として用いられてきた³。

サルコペニアの臨床研究では、筋力、身体機能、筋肉量などが評価項目として用いられてきた。筋力の指標としては、握力^{4,5}や脚力^{6,7}などが挙げられ、身体機能の指標

としては、歩行速度^{8,9}、SPPB(Short Physical Performance Battery: 歩行速度を含む総

合的な身体機能評価)^{10,11}などが用いられてきた。筋肉量については、DXA(dual energy

X-ray absorptiometry)法^{12,13}やBIA(Bioimpedance analysis)法^{14,15}により筋肉量を測定

して算出されたAMI(appendicular skeletal muscle mass index: 四肢筋量(kg)÷身長(m)²)が代表的指標である^{12,13,15}。しかし、サルコペニアの統一された定義、診断基準

はなかった。

2010年、The European Working Group on Sarcopenia in Older People(EWGSOP)により、サルコペニアは「筋量と筋力の進行性かつ全身性の減少に特徴づけられる症候群で、

身体的機能障害、QOL (Quality Of Life)の低下、死のリスクを伴うもの」と定義された¹⁶。このコンセンサスの中で、「骨格筋量低下を必須とし、加えて筋力低下または身体機能の低下を伴う」というサルコペニアの診断基準が推奨され、身体機能低下の基準は歩行速度0.8m/秒以下とされた(表1-A)。EWGSOPは、サルコペニアの病期(表1-B)、分類(表1-C)も提唱している。"前サルコペニア"は、筋量低下を認めるが、筋力と身体機能が保たれている状態を言う。"サルコペニア"は、筋量低下に加え、筋力低下か身体機能低下のいずれか一方を認める状態を言う。"重度サルコペニア"は、筋量、筋力、身体機能が全て低下している状態を言う。これらの病期は、治療の方針や目標設定に有用であると考えられる¹⁶。サルコペニアには、一次性(純粋に加齢のみによるもの)と二次性(栄養、不活動、疾患など、他の原因によるもの)に分類され、診断基準は同一である¹⁶。しかし高齢者では多数の疾患が合併していることが多く、一次性か二次性かを区別することが困難な場合もありうる¹⁶。

また、高齢者において、**frailty**(虚弱)という概念がある。Friedらは、5つの症状(意図せぬ体重減少、易疲労感、筋力低下、歩行速度低下、身体機能低下)のうちの3つ以上を高齢者が持つ場合を**frailty**とした¹⁷。**Frailty**は、高齢者の身体機能障害、入院、死亡のリスクを高めるものであり、身体的のみならず、精神的、社会的側面を含めた高齢者の特性を表す概念ととらえられるようになった¹⁸。サルコペニアと**frailty**の概

A. サルコペニアの診断基準（文献16より）

1. 骨格筋量低下
2. 筋力低下
3. 身体機能低下（歩行速度0.8m/秒以下）

1を必須とし、加えて2か3のいずれかを満たす。

B. サルコペニアの病期

	筋量	筋力	身体機能
Presarcopenia	↓		
Sarcopenia	↓	↓ または	↓
Severe sarcopenia	↓	↓	↓

C. サルコペニアの分類

1. Primary sarcopenia

純粋に加齢のみによるもの（他の原因なし）

2. Secondary sarcopenia

Nutrition-related sarcopenia

食欲不振、吸収不良などによるもの

Activity-related sarcopenia

長期臥床、不活動などによるもの

Disease-related sarcopenia

内臓疾患、悪性腫瘍、炎症などによるもの

表1. サルコペニアの診断基準 (A)、病期 (B)、分類 (C) (文献16より改変)

念には共通性があり、またこれらは加齢による臓器の機能低下によって起こる多彩な症状である老年症候群とも関連している¹⁹。

日本人を対象とした研究では、BIA法により測定したAMIが、18歳から39歳までの健康な若年者の平均値より2標準偏差を超えて低いことを筋肉量低下としたところ、カットオフ値は男性で7.0kg/m²、女性で5.8kg/m²となり、筋量低下は65歳以上の高齢男性の17.2%、高齢女性の19.9%で認めた²⁰。日本の65歳から89歳を対象とした2013年の研究ではEWGSOPの診断基準を用いており、有病率は男性で21.8%、女性で22.1%であった²¹。我が国は2012年現在、高齢化率が24.1%に達しており、531万人が要支援、要介護認定を受けている²²。また「日本の将来推計人口」によれば、2060年には高齢者(65歳以上)の割合は約40%に達すると見積もられている²³。サルコペニアは転倒などの老年症候群あるいはfrailtyをもたらし、要介護状態の原因となりうる。今後超高齢社会を迎える我が国において、サルコペニアによる要介護状態の予防、身体機能の維持・改善は重要な課題である。

サルコペニアの病態

若年者でも、脊髄損傷による神経切断や長期臥床により、廃用性筋萎縮を来しうる。一次性サルコペニアと廃用性筋萎縮はいずれも骨格筋萎縮をきたすが、病態は同一で

はない。一次性サルコペニアでは、筋萎縮の主な原因は筋線維数の減少であり²⁴、筋線維断面積の低下は軽度だが、速筋線維 (type II fibers) に選択的な断面積低下を認める²⁵。一方、廃用性筋萎縮では筋線維断面積の低下が主体であり、遅筋線維 (type I fibers) の減少や、遅筋線維から速筋線維への移行を認める²⁶。このため、サルコペニアも病態に応じて、異なった介入方針が必要と考えられる。

サルコペニアの原因

サルコペニアの成因として、以下のメカニズムが示唆されている。

一つは、筋合成能の低下である。IGF-I (insulin-like growth factor) は、PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinases) および Akt の細胞内シグナル伝達系を活性化させ、さらに下流の mTOR (mammalian target of rapamycin) を活性化させ、タンパク合成を亢進させる^{27, 28}。IGF-1/PI3K/mTOR 系は、筋肥大において重要であるが、加齢により活性が低下する²⁹。

二つ目は、筋分解能亢進である。2001年に筋特異的ユビキチンリガーゼ遺伝子である、MuRF1 (muscle-specific RING finger protein 1) と Atrogin-1 が同定された^{30, 31}。Atrogin-1 は *Fbxo32* 遺伝子にコードされている。これらは筋萎縮因子とも称され、神経切断、廃用などの幅広い病態で発現が増加するが、これらのいずれかをノックア

ウトしたマウスは神経切断による筋萎縮を来しにくい³¹。また、高齢者や高齢ラットの骨格筋では筋萎縮因子が増加することが報告されている^{32,33}。

サルコペニアと慢性炎症

サルコペニア発症には、慢性炎症の関与の可能性も示唆されている。地域高齢者のコホート研究で、血清 TNF α (tumor necrosis factor- α)高値は、5年後の筋量低下、握力低下のリスクファクターとなった³⁴。70歳以上の高齢者では、血清 IL-6 (interleukin-6)と筋肉量の間逆相関を認めた³⁵。2000年に Francesch らによって提唱された、“inflammaging” (“inflammation”+“aging”)という概念は、加齢と炎症には密接な関連があるとする³⁶。この概念における主役はマクロファージである。マクロファージは生命の初期から中期では、IL-6や TNF α を含む様々なサイトカインを産生し、免疫系を担う。加齢により、体が様々な外的刺激にさらされると、マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌が亢進し、それが老化を促進すると考えられる³⁶。

炎症において、NF κ B (nuclear factor-kappaB)系と AP-1 (activator protein 1)系は重要な役割を果たす。ヒトの IL-6プロモーターには NF κ B binding site および AP-1 binding site が存在し、IL-6発現において NF κ B および AP-1 が相補的に働くことが明らかになっている³⁷。また NF κ B 系および AP-1 系を抑制することで、TNF α , IL-1 β (interleukin-1 β),

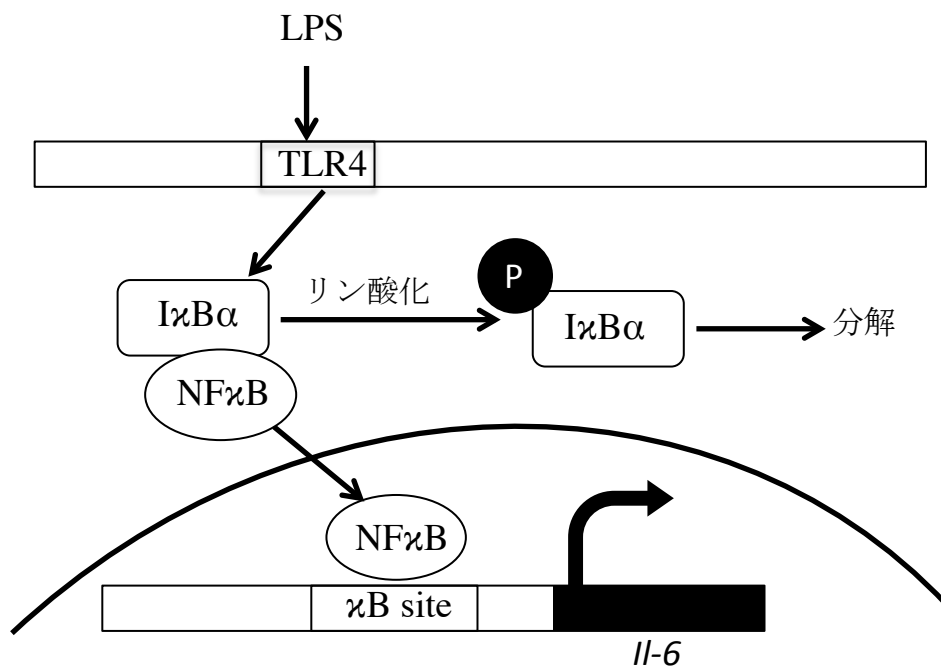
iNOS (inducible nitric oxide synthase) の発現が抑制されることが知られており^{38,39}、これらの転写も NF κ B, AP-1 によって調節されていることが示唆される。

NF κ B は、p65 と p50 から成り、抑制性のサブユニットである I κ B α と結合した状態で細胞質に存在している⁴⁰。LPS は TLR4 (toll-like receptor 4) に結合し、I κ B α をリン酸化、分解する。それにより I κ B α から外れた NF κ B は核内に移行し、プロモーターの κ B site に結合し、転写を開始する (図 1-A)⁴¹。

AP-1 は、c-Jun および c-Fos から構成されており、プロモーターの AP-1 site に結合することで、転写を開始する。上流には MAPK (mitogen-activated protein kinase) である JNK1/2 および p38 があり、c-Jun は主に JNK1/2 により、c-Fos は主に p38 によりリン酸化、活性化される^{42,43}。MAPK の上流には MKK (mitogen-activated protein kinase) があり、JNK1/2 の上流には MKK4, p38 の上流には MKK3/6 が存在する^{44,45}。さらに上流に PKR (double-stranded-RNA-dependent protein kinase) がある。PKR は、ウイルス感染などで活性化するが、LPS による MKK3/6, p38, MKK4, JNK1/2 のリン酸化、IL-6 発現において必要であり⁴⁶、炎症に関与していることが示唆される (図 2-B)。

PP1 (protein phosphatase 1) は、体内で様々なタンパク質に作用し、多様な機能を有する。PP1 α (protein phosphatase 1 α) は、PP1 の 3 つの catalytic subunit のうちの 1 つである⁴⁷。PP1 α の catalytic subunit は PKR に結合して、PKR のダイマー形成を阻害、

A



B

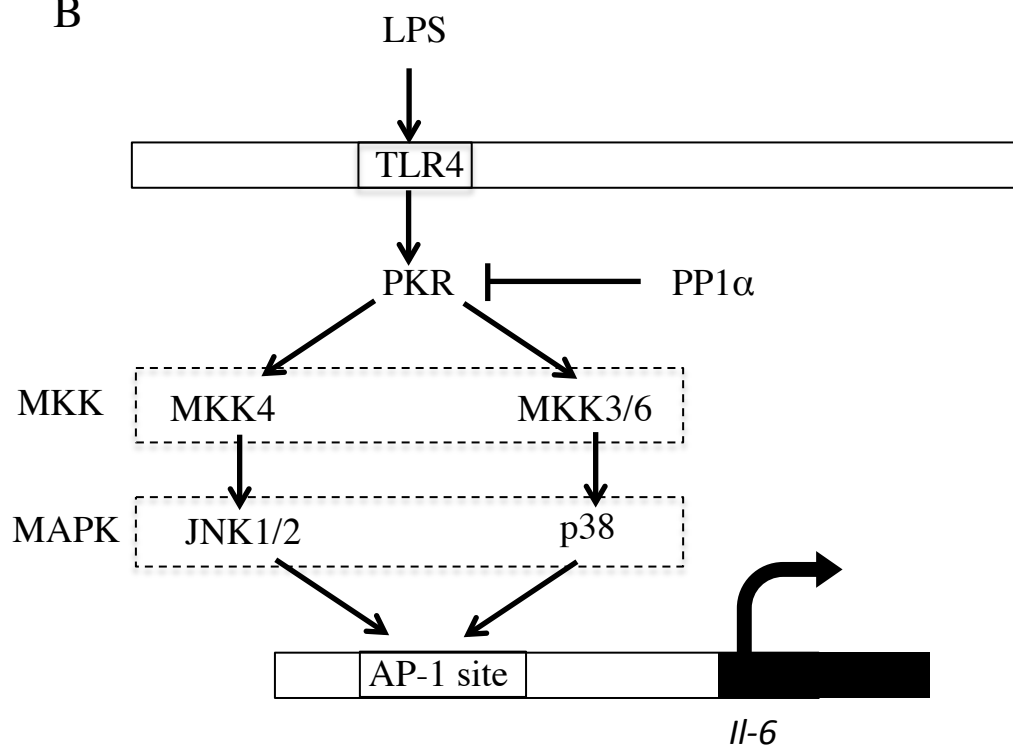


図1. LPSによるNF κ B系 (A), AP-1系 (B)活性化機構

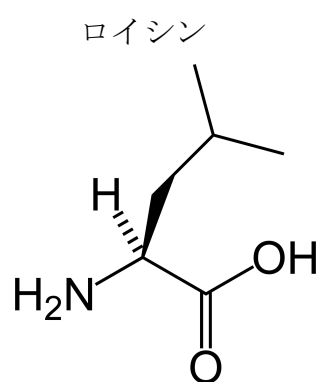
不活化させる (図 1-B)⁴⁸。

サルコペニアの治療

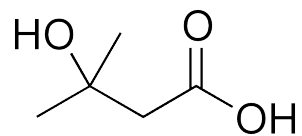
これまでの研究から、サルコペニアの予防、治療には、栄養、運動介入が有効である可能性が示唆されている。地域在住高齢者を対象とした縦断研究では、タンパク質摂取量の多い群は少ない群と比較して、3年後の骨格筋量低下が軽度であった⁴⁹。高齢者の摂取カロリーを増加させることで、身体機能が改善したという報告がある⁵⁰。高齢者に3ヶ月間、ロイシンを含む必須アミノ酸製剤を摂取させることで、筋力や身体機能が改善した⁵¹。ロイシンの代謝産物である HMB (β -hydroxy- β -methylbutyrate) (図 2-A)は、IGF-1/Akt/mTOR 系を活性化させることで筋合成を促進するほか⁵²、筋タンパク質異化抑制作用をもつことが報告されているが⁵³、体内では摂取されたロイシンの 5%程度しか生成されず、食事のみでは十分な摂取は困難である⁵⁴。HMB を高齢者に投与したところ、12 週または 1 年で筋量や身体機能を改善させたという報告がある^{55,56}。

高齢者では、血中 25(OH)D 濃度⁵⁷、骨格筋の VDR (vitamin D receptor)⁵⁸ 発現が低下しており⁵⁹、血中 25(OH)D 低値はサルコペニアや死亡のリスクを上昇させるという報告がある^{60,61}。高齢者を対象としたメタアナリシスでは、高用量の活性型ビタミン

A

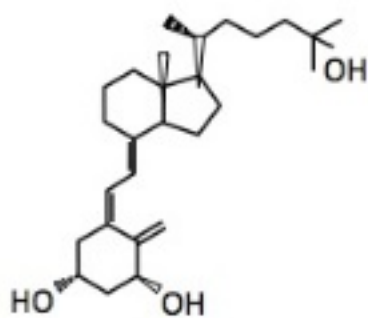


HMB



B

活性型ビタミンD
 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$



ED71
 $1\alpha,25(\text{OH})_2-2\beta-(3\text{-hydroxypropyloxy})\text{D}_3$

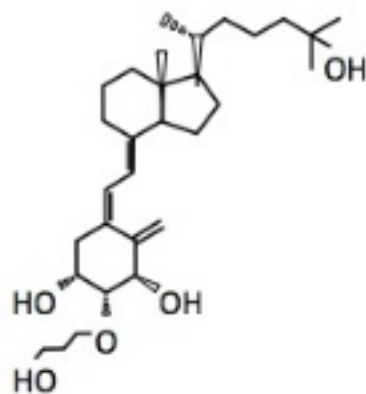


図2. 試薬の構造式

A. ロイシンおよびHMB

B. 活性型ビタミンDおよびED-71

ン D 摂取は高齢者の転倒を 22%減少させた⁶²。また、ビタミン D 誘導体である ED-71 (eldecalcitol) (図 2-B)には前腕骨骨折リスクを有意に低下させることが報告されている⁶³。これらの報告から、ビタミン D には下肢筋力増強効果があることが示唆される。

圧縮空気により負荷をかけるトレーニングマシンを用いて、抵抗運動を 1 時間、週 2 回、18 週間行うことで、高齢者の筋量を改善させたが、持久力トレーニングでは明らかな変化を認めなかったとする報告がある⁶⁴。筋肉に負荷のかかる運動が、サルコペニアの改善に有用であることが示唆される。

アミノ酸やビタミン D は抗炎症効果を有することが示唆されている。腺癌を有するマウスにロイシンを投与すると、骨格筋における PP1 α の発現が上昇し、PKR のリン酸化が抑制された⁶⁵。HMB には、ヒト単核球での TNF α 産生低下効果⁶⁶、放射線照射による粘膜炎症の軽減効果⁶⁷などがある。1,25(OH)₂D₃には、I κ B α のリン酸化抑制、分解抑制を介した NF κ B 系抑制作用があることが知られている⁶⁸。またビタミン D により発現が亢進する VDR は、核内受容体として、転写抑制効果 (トランスリプレッション)を発揮する⁶⁹。このように、アミノ酸やビタミン D が抗炎症効果を持つことが様々な研究で示唆されているが、そのメカニズムは詳細には解明されておらず、さらに炎症制御によりサルコペニアが改善するかどうかは明らかになっていない。

そこで今回、サルコペニアに対する、HMB、ビタミンD、運動およびそれらの併用効果について、抗炎症効果、筋萎縮因子抑制作用の観点から、*in vitro* および *in vivo* で検討した。

3. 方法

試薬

β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB)は Alfa Aesar (MA, USA)より、Lipopolysaccharide (LPS), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は Sigma Aldrich Japan (東京)より購入した。Eldecalcitol (ED-71)は、中外製薬株式会社 (東京)から供与された。

細胞培養

マウスのマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞, マウスの筋芽細胞である C2C12 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC)より購入した。生育培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日研生物医学研究所, 京都)に、10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, France), 100 U/ml ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies inc, NY, USA)を加えたものを用いた。培養は 37°C , 5% CO_2 存在下で、生育培地にて行った。C2C12 細胞の分化誘導には、DMEM に 2% horse serum (HS) (Invitrogen, CA, USA), 100 U/ml ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを加えた、分化培地で行った。C2C12 細胞密度が 6 well 培養プレートで 80-90%に達した

とき、生育培地を分化培地に交換した。交換は 48 時間ごとに行った。4-5 日後、筋芽細胞が筋管に分化してから、実験を行った。

RNA 解析

RAW264.7 細胞に HMB 5 mM または $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 nM または ED-71 10 nM で 12 時間前処置を行い、LPS 1 ng/ml を添加し 2 時間培養した。分化 C2C12 筋管を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 nM または HMB 1 mM で 12 時間前処置後、LPS 10 ng/ml を添加し 2 時間培養した。細胞からの Total RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA) により行った。RNA は、DNase I (Fisher Scientific, PA, USA) による処理を行った。

ヒラメ筋からの Total RNA 抽出のため、回収したヒラメ筋を直ちに RNAlater (Qiagen, CA, USA) に浸して RNA を安定化させた。ヒラメ筋は 4°C で一晩保存し、翌日 RNAlater から取り出して -80°C で保存した。-80°C で保存したヒラメ筋を解凍し、RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, CA, USA) を用いて RNA を抽出した。

逆転写反応は、Omniscript RT Kit (Qiagen, CA, USA) と Oligo (dT) プライマー (Invitrogen, CA, USA) により行い、cDNA を合成した。PCR は、得られた cDNA と SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, CA, USA), 特異的プライマーを用いて行い、解

析は 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)により行った。使用し

たプライマーおよびその配列は、以下のとおりである。

遺伝子名	プライマー配列 (5'→3')	
ribosomal protein, large, P0 (<i>36B4</i>)	Forward	GTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG
	Reverse	AATCTCCAGAGGCACCATTGA
interleukin-6 (<i>Il6</i>)	Forward	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
	Reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
tumor necrosis factor α (<i>Tnf</i>)	Forward	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	Reverse	GCTACGACGTGGGCTACAG
interleukin-1 β (<i>Il1b</i>)	Forward	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
	Reverse	GCAACTGTTCTGAACTCAACT
nitric oxide synthase 2, inducible (<i>Nos2</i>)	Forward	CCAAGGTCTACGTTTCAGGACA
	Reverse	GCCACCAGCTTCTTCAATGT
protein phosphatase 1 α (<i>Ppp1ca</i>)	Forward	ATGTCCGACAGCGAGAAGC
	Reverse	ACAGCCGTAGAAGGTCATAGT
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
MuRF1 (<i>Trim63</i>)	Forward	TGCCTGGAGATGTTTACCAAGC
	Reverse	AAACGACCTCCAGACATGGACA
Atrogin-1 (<i>Fbxo32</i>)	Forward	AAGGCTGTTGGAGCTGATAGCA
	Reverse	CACCCACATGTTAATGTTGCC

ルシフェラーゼアッセイと siRNA 導入

RAW264.7 細胞に Lipofectamine LTX (Invitrogen, CA, USA)を用い、AP-1. luc plasmid (Stratagene, CA, USA)および pRL-Sv40. luc plasmid (Promega, WC, USA)のトランスフェクションを行った。RAW264.7 細胞を 1×10^5 個/well となるように 24 well プレート

に撒き、密度が 50-60%になるまで培養した。1 well あたり AP-1.luc plasmid 0.5 μ g, pRL-Sv40-luc 10 ng が加えられるよう、プラスミドを試薬と混合し、培養メEDIUM に加えた。その 24 時間後、HMB 5 mM により 12 時間前処置を行い、LPS 1 ng/ml を添加してさらに 12 時間培養を行い、サンプルを Passive lysis buffer で回収した。

AP-1.luc ルシフェラーゼ活性を DLReady Luminometer (Berthold Technologies, Germany)により測定し、pRL-Sv40.luc 活性により補正した。

RAW264.7 細胞への siRNA 導入は、Lipofectamine LTX を用いた。RAW264.7 細胞を 3×10^5 個/well となるように 6 well プレートに撒き、細胞密度が 50-60%になるまで培養した。コントロール siRNA または PP1 α siRNA (Santa Cruz, CA, USA)を Lipofectamine LTX と混合し、最終濃度が 50 nM となるように well に添加し、24 時間トランスフェクトした。その後、試薬を添加し、ウェスタンブロット法を行った。

ウェスタンブロット法

細胞を氷冷 PBS によって洗浄し、lysis buffer (RIPA buffer (Sigma Aldrich Japan, 東京) + cOmplete Mini (Roche Applied Science, Germany) +PhosSTOP (Roche Applied Science, Germany))により溶解、ホモジナイズした。遠心した上清を試料とした。タンパク質 10 μ g にサンプルバッファー (50 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol,

10% Glycerol, 0.005%BPB)を加え、95°Cで5分間加熱し、冷却後に10%アクリルアミドゲル (Wako, 大阪)を用いて SDS-PAGE を行った。ゲルをセミドライ法にて PVDF membrane に転写し、5%スキムミルクまたは5% Phosphoblocker (Cell Biolabs, CA, USA) を含む 0.1%Tween/TBS にて室温で30分間ブロッキングし、一次抗体を室温で1時間反応させた。P-I κ B α , I κ B α , P-JNK1/2, total JNK1/2, P-p38, total p38, P-MKK4, P-MKK3/6 に対する一次抗体は Cell Signaling (MA, USA)より、抗 PP1 α 抗体は Santa Cruz (CA, USA)より、抗 β -actin 抗体は Sigma Aldrich Japan より購入した。一次抗体反応後、PVDF membrane を 0.1% Tween/TBS にて3回洗浄し、二次抗体を室温、1時間反応させた。マウス、ウサギ二次抗体は GE healthcare (UK)より購入した。その後、0.1% Tween/TBS で3回洗浄し、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, France)で X 線フィルムに露光し検出した。

ChIP (chromatin immunoprecipitation)

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)は、タンパク質に対する抗体を用いて DNA とタンパク質との相互作用を研究する方法である^{70,71}。RAW264.7 細胞に対し、最終ホルムアルデヒド濃度が1%となるようにホルマリンを加え、10分間クロスリンクさせた。最終濃度が1.25 M となるようにグリシンを加えて5分置き、クロスリンクを停止させ

た。氷冷 PBS (Phosphate buffered saline)で 2 回洗浄し、細胞を回収、サンプルあたり 4×10^7 個の細胞を回収した。細胞を 700 g で 3 分間遠心し、沈殿を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS) 300 μ l + 10 \times cOmplete Mini (Roche Applied Science, Germany)溶液 30 μ l で溶解し、氷上に 10 分間置いた。Bioruptor (Diagenode, NJ, USA)で DNA が 300-1000bp の大きさになるよう断片化した。その後 15,000 g で 10 分間遠心し、上清を回収した。アガロースビーズ (Santa Cruz, CA, USA) を Dilution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 167 mM NaCl, 1.1% Triton-X-100, 0.11% sodium deoxycholate)で洗浄した。サンプルに Dilution buffer を 3 ml 加え、洗浄したビーズを入れて、4°C, 30 分間ローテーターで攪拌し、非特異的吸着を取り除いた。700 g で 3 分間遠心し、上清を回収した。このうち 100 μ l を input として-80°Cで凍結保存した。残りの 1 ml にコントロール IgG, 抗 p65 IgG, 抗 VDR IgG (Santa Cruz, CA, USA) を添加し、4°C, 12 時間ローテーターで攪拌し、免疫沈降を行った。15,000 g で 10 分間遠心し、上清を回収し、ビーズを加え、4°Cで 1 時間、ローテーターで攪拌し、ビーズと抗体を結合させた。700 g で 30 分遠心し、5 分間氷上に置き、上清を捨てた。ビーズを、Dilution buffer で 2 回、RIPA buffer (150 mM NaCl)で 2 回、RIPA buffer (500 mM NaCl)で 2 回、LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate)で 2 回、TE buffer で 2 回洗浄した。

Elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS)

200 μ l 添加し、一晚 65°Cで加熱し、クロスリンクを解除した。RNase A 4 mg/ml を 1 μ l 加え、37°Cで 30 分間インキュベートした。10 mg/ml proteinase K を 1 μ l 加え、55°Cで 1 時間インキュベートした。20 mg/ml グリコーゲン を 1 μ l 加え、攪拌、遠心し、上清を回収した。210 μ l のフェノール/CIAA (Wako, 大阪)を加え、攪拌後、15,000 g で 3 分間遠心して上清を回収。さらに、有機層に 180 μ l の TE- 200 mM NaCl を加え、攪拌後、遠心して上清を回収した。これらの上清に 100%エタノール 800 μ l を加え、攪拌し、-20°Cで 2 時間置いた。4°C, 15,000 g で 30 分遠心した。沈殿を 75%エタノールでリンスし、再び 4°C, 15,000 g で 5 分間遠心した。そして上清を捨て、4°Cで風乾させた。精製した DNA に対し、real-time PCR を行った。 α B site in IL-6 のプライマーとして、以下を用いた。

5'-CGATGCTAAACGACGTCACATTGTGCA-3'(forward)

5'-CTCCAGAGCAGAATGAGCTACAGACAT-3' (reverse)

動物

日本クレア (東京)より購入した C57BL/6J 雄マウスを用いた。マウスは空調(22°C)、照明 (12 時間 on, 12 時間 off) 設備の整った部屋で飼育した。各実験は、マウスを 1

匹ずつ別々のケージに入れて実施した。マウスへの経口投与は、テフロン製マウス用経口ゾンデを用い、エーテル麻酔下で行った。実験終了時、マウスは炭酸ガス吸入により安楽死させた。

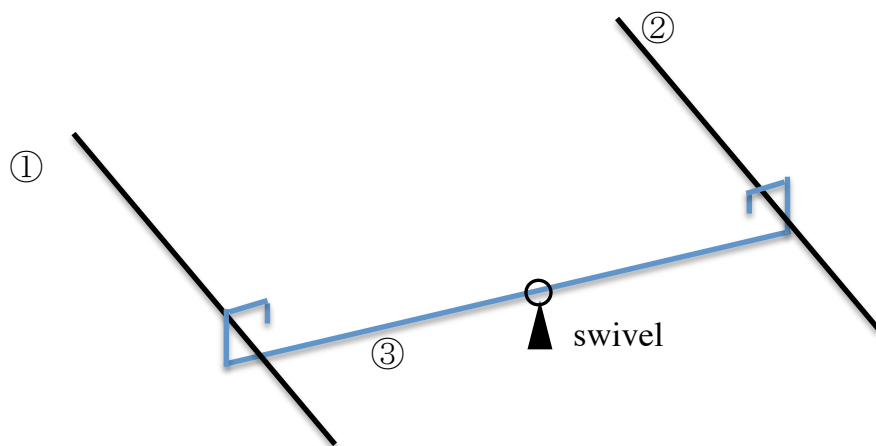
後肢懸垂法

後肢懸垂モデルは、骨格筋萎縮の研究に幅広く使用されている³¹。ケージの上部、ケージの床から約 15cm の高さに、2 本のピアノ線 (①, ②) を 18cm 間隔で平行になるよう固定した。①, ② に垂直になるように、両端を曲げたピアノ線③を取り付けた。さらに③に、swivel (回転式接合部) のついた金具を通し、swivel の下には金属製クリップを取り付けた (図 3-A)。

マウスの尾全体を医療用テープで包み、保護した。そして、テープで作ったハーネスを尾の付け根付近にとりつけ、マウスの後肢がケージの床に触れないように尾を持ち上げた。ハーネスの上端をクリップに挟み、マウスの体が床に対して 30-40 度の角度を保つように調節した (図 3-B)。これにより、マウスが後肢を懸垂した状態のまま、ケージの中を自由に動き、餌、水を自由に摂取できるようにした。

図 4-A のプロトコールに従い、実験を行った。C57BL/6J 雄マウス 12 週齢を、1) 対照群 2) 後肢懸垂群 3) 後肢懸垂+ビタミン D 群 4) 後肢懸垂+HMB 群の 4 群に分けた

A



B



図3. 後肢懸垂マウス

Aのようにピアノ線を固定した。Swivel (回転式結合部)にはクリップを取り付けた。Bが今回の実験で用いた後肢懸垂マウスの写真である。

(各 n=4)。雄マウスが 12 週齢に達した時を day 0 とし、安楽死前日まで毎日、薬剤または vehicle を投与した。1,25(OH)₂D₃ はコーン油に溶解して 0.1 µg/kg/日、HMB は蒸留水に溶解して 340 mg/kg/日を投与した。後肢懸垂を day 7 から day 21 まで行い、安楽死させたマウスからヒラメ筋を回収し、デジタル精密秤で重量を測定した。

ヒラメ筋における筋萎縮因子発現の検討のため、同様に 4 つの群を設定した。雄マウスが 12 週齢に達した時を day 0 とし、安楽死前日まで毎日、薬剤または vehicle を投与した。後肢懸垂は、day 7 から day 10 まで行い、RNA の実験用にヒラメ筋を回収した。

マウスの抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体である MR16-1 は、中外製薬株式会社(東京)から供与された。C57BL/6J 雄マウス 11 週齢を用い、図 4-B に示したプロトコールに従い実験を行った。MR16-1 は PBS に溶解して、1 回あたり 2mg または 0.5mg を腹腔内投与した。他のマウスには vehicle として、PBS のみを腹腔内投与した。実験開始を day 0 とし、day 21 より後肢懸垂を開始し、day 35 に安楽死させた。

トレッドミルによる運動

C57BL/6J マウス 12 週齢を 25 匹用意し、5 匹を対照群、20 匹を後肢懸垂群とした。さらに後肢懸垂群を、1) 介入なし群 2) 運動群 3) HMB 群 4) 運動+HMB 群の 4 群

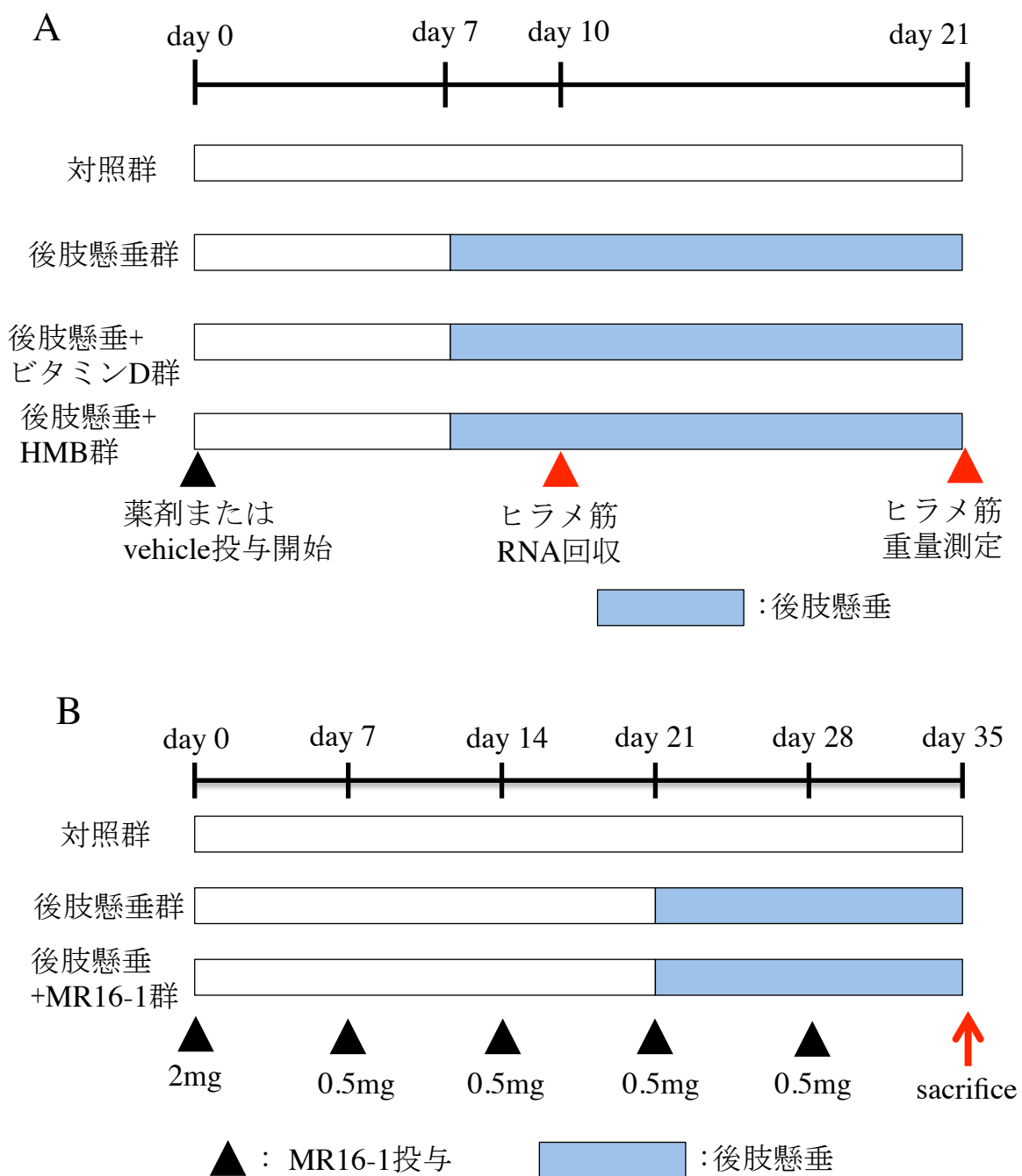


図4. 実験プロトコール

後肢懸垂による筋萎縮に対する、ビタミンDおよびHMBの効果(A)、
MR16-1の効果 (B)を検討した。

(各 n=5)に分けた。1)から 4)のマウスは、14 日間の後肢懸垂を行い、その後 7 日間の回復期間を設けた。回復期間中、1)のマウスは、ケージの中で自由に動けるようにしたのみで、それ以外の介入を行わなかった。2)のマウスには、トレッドミル MK-680C (室町機械, 東京)を用いて、勾配 20 度、速度 6m/分で、1 日 1 時間の運動を、後肢懸垂終了の翌日から安楽死の前日まで毎日 (計 6 回)行った。3)のマウスには、HMB 340 mg/kg/日を毎日、計 6 回投与した。4)のマウスには、運動と HMB 投与の両方を行った。HMB 摂取を行わなかった群では、等量の蒸留水を vehicle として投与した。マウスは回復期間終了後に安楽死させた。

HE (Hematoxylin-Eosin)染色

回収したマウスのヒラメ筋を、4%ホルムアルデヒド溶液に浸して固定した。パラフィンに埋包してブロックを作り、Leica microtome (Leica Instruments GmbH, Hubloch, Germany)で 5 μ m にスライスし、40-50°Cの湯に浮かせてからスライドグラスに付着させ、一晩乾燥させた。キシレンによる 5 分間の洗浄を 3 回行い、100%エタノール, 90%エタノール, 70%エタノールに 2 分間ずつ浸した後、水洗した。そして、Hematoxylin 水溶液にて 5 分間染色し、軽く水で洗った後、Eosin 水溶液で 5 分間染色した。その後、70%, 90%, 100%エタノールに 1 分間ずつ浸し、キシレンに 2 分間、3 回浸した後、

カバーガラスをのせてプレパラートを作製した。染色標本を BZ-9000 (株式会社キーエンス、大阪)により撮影し、Image J version 1.44 (National Institutes of Health, USA)により筋線維断面積を測定した。

ELISA

安楽死後に心臓採血を行い、15,000 g, 10 分間遠心分離して血清を回収した。マウスの血清 IL-6 測定には、mouse IL-6 ELISA kit (RayBiotech, GA, USA)を用いた。

統計解析

本文および図表中の数値は全て、平均値 \pm S.E. (標準誤差)で表示した。多群比較は one-factor ANOVA により行った。P<0.05 を統計学的有意とした。

4. 結果

HMB による、NF κ B 系および MAPK 系を介した炎症抑制作用

Inflammaging の概念によれば、マクロファージからの炎症性サイトカインが老化に関与するとされる。サルコペニアにおいても、マクロファージからの炎症性サイトカインが一因であるという仮説に基づき、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞における HMB の抗炎症効果を検討した。マクロファージ刺激には LPS を用いた。LPS により、炎症性サイトカインである IL-6, TNF α , IL-1 β , iNOS の発現は増加したが、HMB はこれらを抑制した (図 5)。そこで、HMB が NF κ B 系、AP-1 系のそれぞれに抑制的に働くかどうかを調べた。

RAW264.7 細胞に LPS を添加すると、30 分後に P-I κ B α が増加し、I κ B α が減少したが、HMB は LPS の作用を抑制した (図 6-A)。これにより、P-I κ B α /I κ B α ratio の上昇が有意に抑制された (図 6-B)。よって、HMB による NF κ B 系抑制が、炎症性サイトカイン発現抑制の一つの機序と考えられた。

RAW264.7 細胞に AP-1. luc plasmid をトランスフェクトさせ、AP-1 系に対する HMB の作用について検討した。LPS 投与により、12 時間後に AP-1 活性は上昇したが、HMB はそれを抑制した (図 7-A)。したがって、HMB は AP-1 系も抑制すると考えられた。

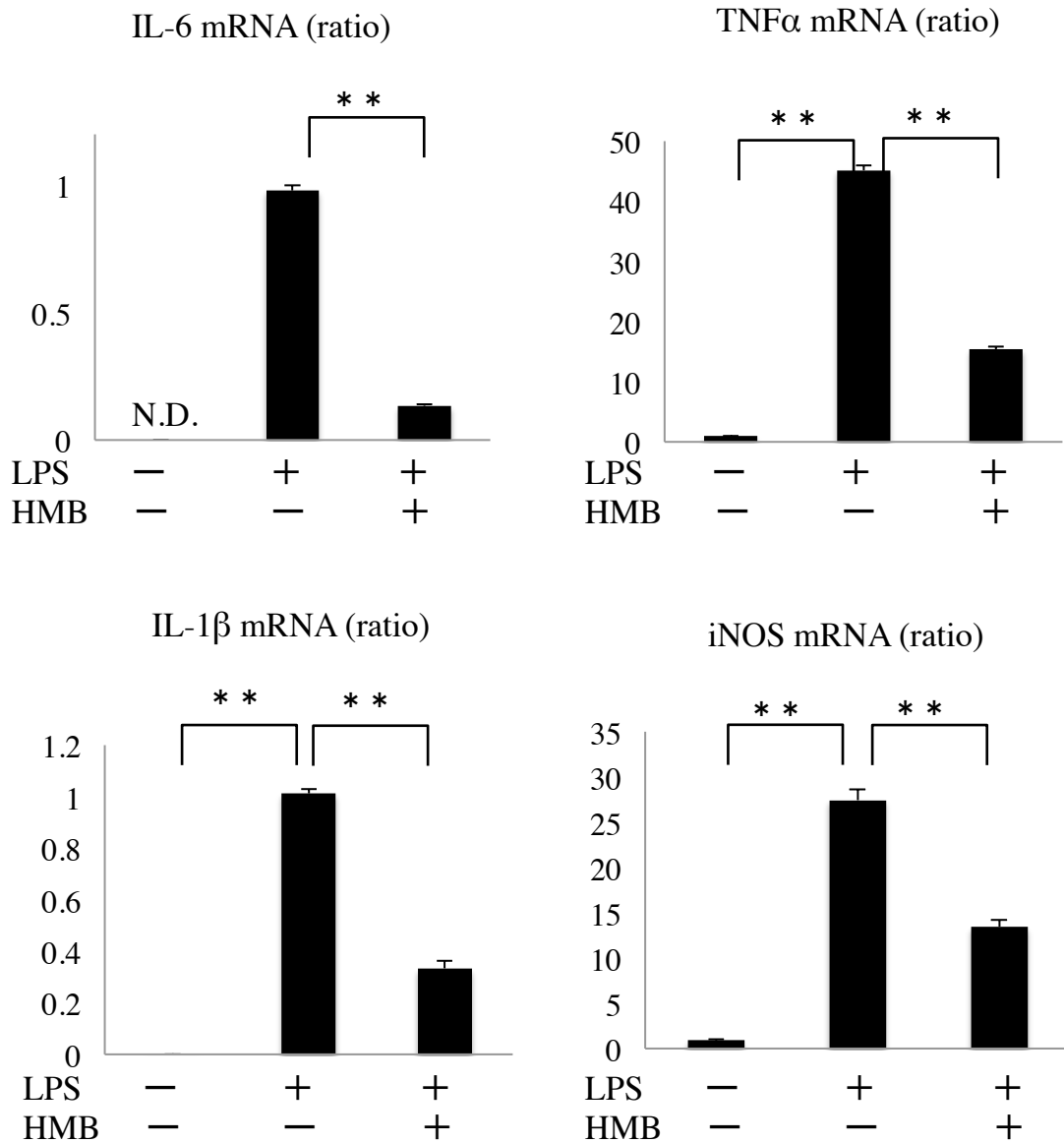


図5. HMBによる炎症性サイトカイン抑制効果

RAW264.7細胞をHMB 5 mMで12時間前処置後、LPS 1 ng/mlを添加して2時間培養した。

n=3, **p<0.01

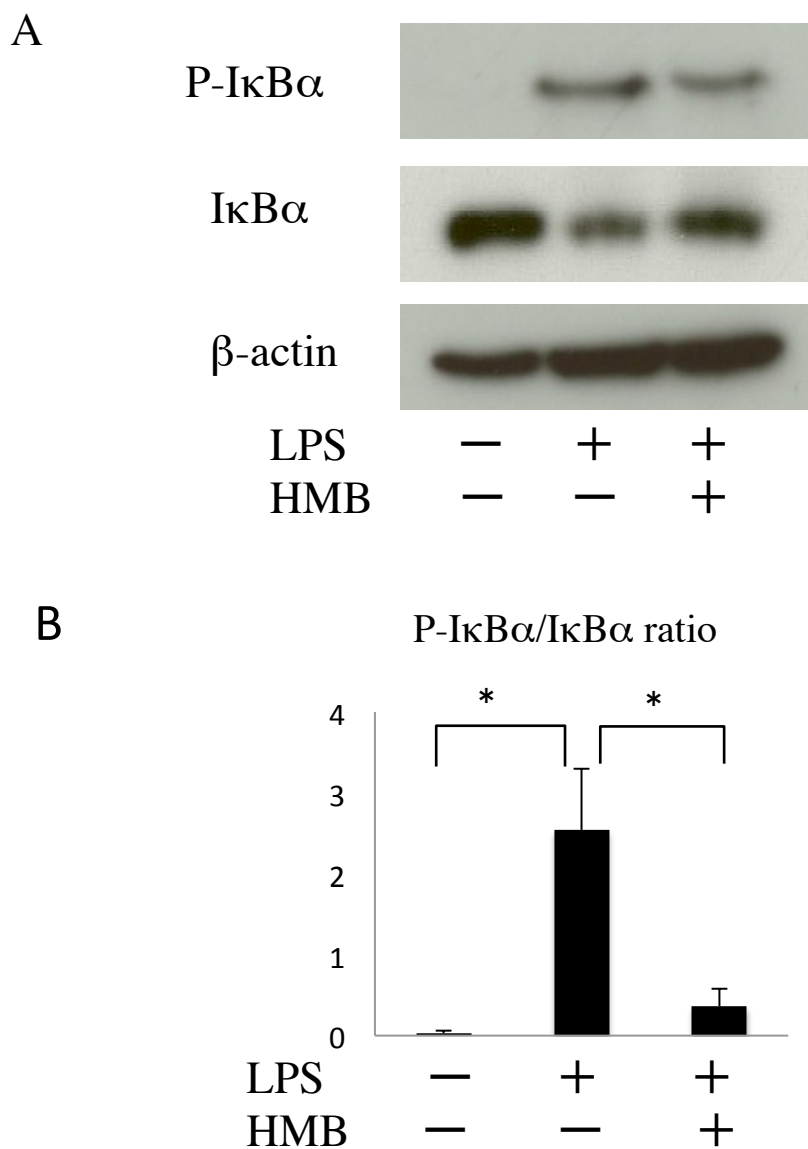


図6. NF κ B系に対するHMBの抑制作用

RAW264.7細胞をHMB 5 mMで6時間前処置後、LPS 1 ng/mlを添加して30分間培養した (A)。Image Jにより、P-I κ B α /I κ B α ratioとして示した (B)。

n=3, *p<0.05

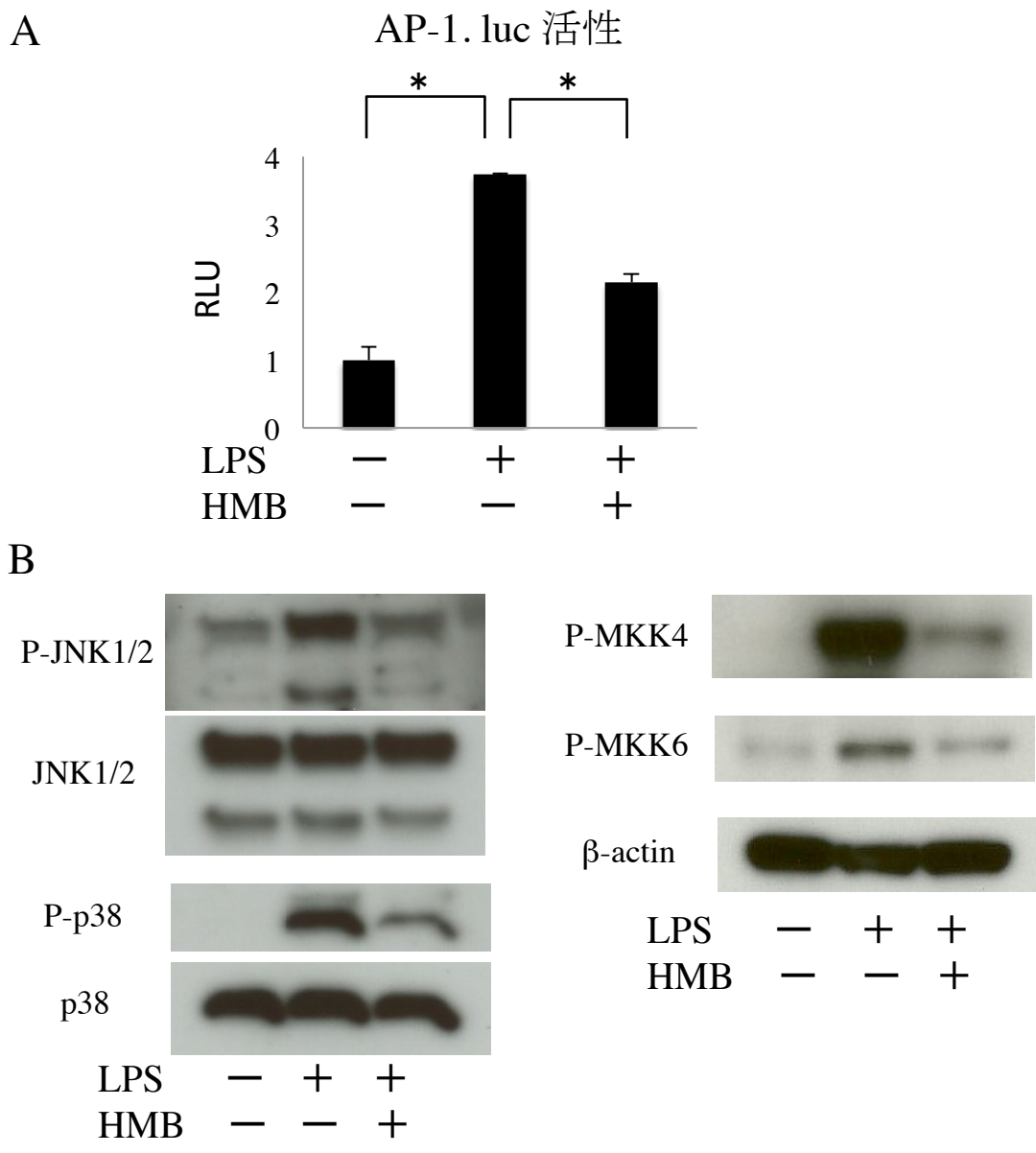


図7. HMBによるAP-1系の抑制効果

(A) RAW264.7細胞にAP-1.luc, pRL-Sv40.lucをトランスフェクションさせ、HMB 5 mMで12時間前処置後、LPS 1 ng/mlを添加して12時間培養し、AP-1. luc活性を測定した。

(B) RAW264.7細胞をHMB 5 mMで12時間前処置後、LPS 1 ng/mlを添加して15分間培養した。

n=3, *p<0.05

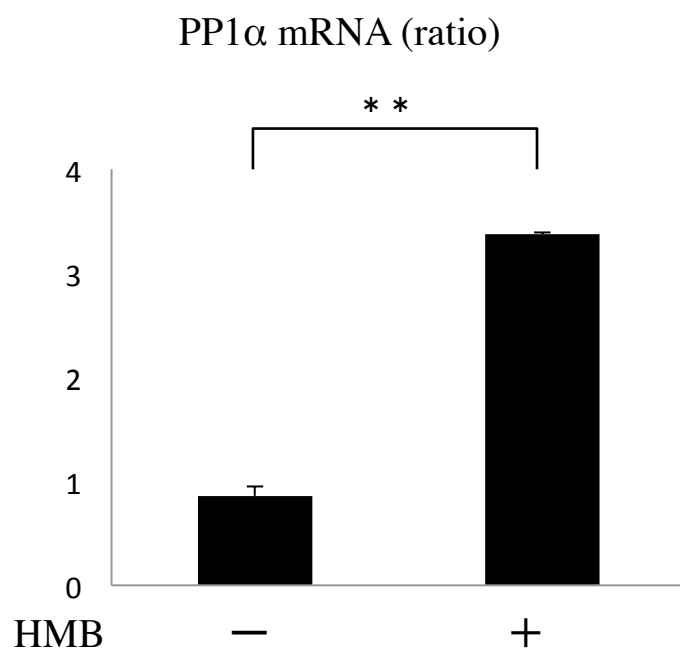
AP-1 の上流にある MAPK (JNK1/2, p38) および、その上流の MKK (MKK3/6, MKK4) に対する HMB の作用を検討した。RAW264.7 細胞に LPS を投与すると、15 分後には JNK1/2, p38 がリン酸化されたが、HMB はこれらのリン酸化を抑制した。MKK (MKK3/6, MKK4) も、HMB によりリン酸化が抑制された (図 7-B)。

次に、HMB の作用メカニズムを検索するため、PP1 α に着目した。RAW264.7 細胞に HMB を投与すると、PP1 α の発現が mRNA レベル (図 8-A)、タンパク質レベル (図 8-B) で増加した。次に、PP1 α siRNA によるノックダウンを行い (図 9-B)、同様の実験を行った。HMB による p38, JNK1/2 のリン酸化抑制効果が、ノックダウンにより無効化された (図 9-A)。なお、P-I κ B α については、ノックダウンによる明らかな変化を認めなかった。

以上より、HMB は NF κ B 系、AP-1 系の両者を抑制することで、炎症性サイトカインの発現を抑制することがわかった。さらに、少なくとも MAPK (p38, JNK1/2) のリン酸化抑制においては、HMB による PP1 α の発現増加が関与していることが示唆された。

ビタミン D による抗炎症効果

A



B

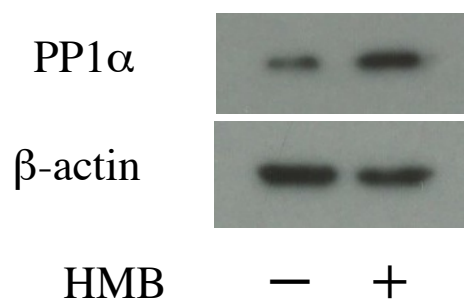
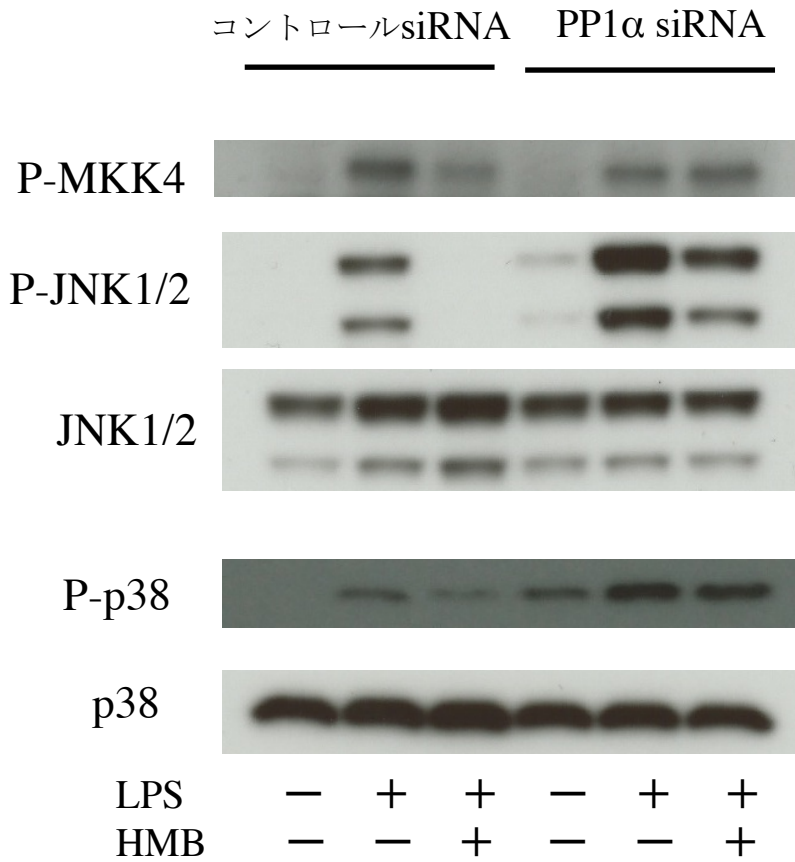


図8. HMBによるPP1 α 増加効果

RAW264.7細胞にHMB 5 mMを添加し、3時間後にRNA解析を(A)、6時間後にタンパク質解析を行った (B)。

n=3, ** p<0.01

A



B

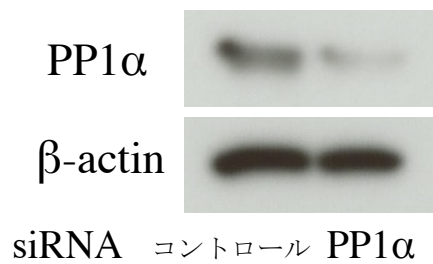


図9. HMBの抗炎症作用に対するPP1 α の影響

(A, B) RAW264.7細胞にコントロールsiRNAまたはPP1 α siRNA 50 nMをトランスフェクションさせ、HMB 5 mMで6時間前処置後、LPS 1 ng/mlを添加し、15分間培養した。

1,25(OH)₂D₃により発現が増加する VDR は、核内受容体として様々な転写に関わることが示唆されているが、その作用メカニズムは十分には解明されていない。そこで、炎症抑制における VDR の作用を検討した。RAW264.7 細胞で 1,25(OH)₂D₃ および ED-71 は、LPS による IL-6 発現を抑制した (図 10)。ChIP により、IL-6 プロモーターの κ B site における、VDR の作用を検討した。LPS 100 ng/ml を添加すると、2 時間後に p65 が κ B site にリクルートされた (図 11-A)。ビタミン D による前処置後に LPS 添加を行ったところ、 κ B site に VDR がリクルートされた (図 11-B)。

HMB とビタミン D の併用効果

以上より、HMB は PP1 α を介して、ビタミン D は VDR を介して作用していることから、両者の抗炎症効果のメカニズムが異なっていると考えられた。そのため、両者の併用による効果を調べた。分化させた C2C12 筋管においても、LPS により IL-6 の発現は増加したが、1,25(OH)₂D₃ と HMB はその発現を抑制し、両者の併用によりさらに発現が抑制された (図 12)。

後肢懸垂モデルにおける、ビタミン D および HMB の筋萎縮予防効果

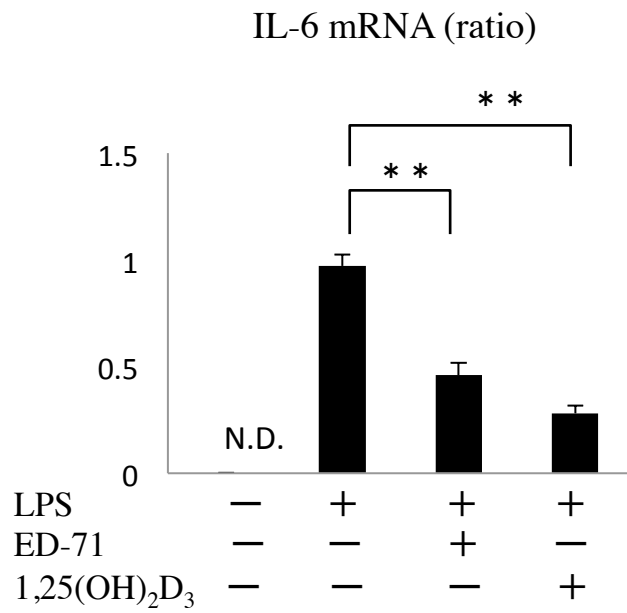


図10. ビタミンDによる抗炎症効果

RAW264.7細胞を、ED-71 10 nMまたは1,25(OH)₂D₃ 10 nMで12時間前処置をした後、LPS 1 ng/mlを添加し2時間培養した。

n=3, **p<0.01

ChIPの模式図

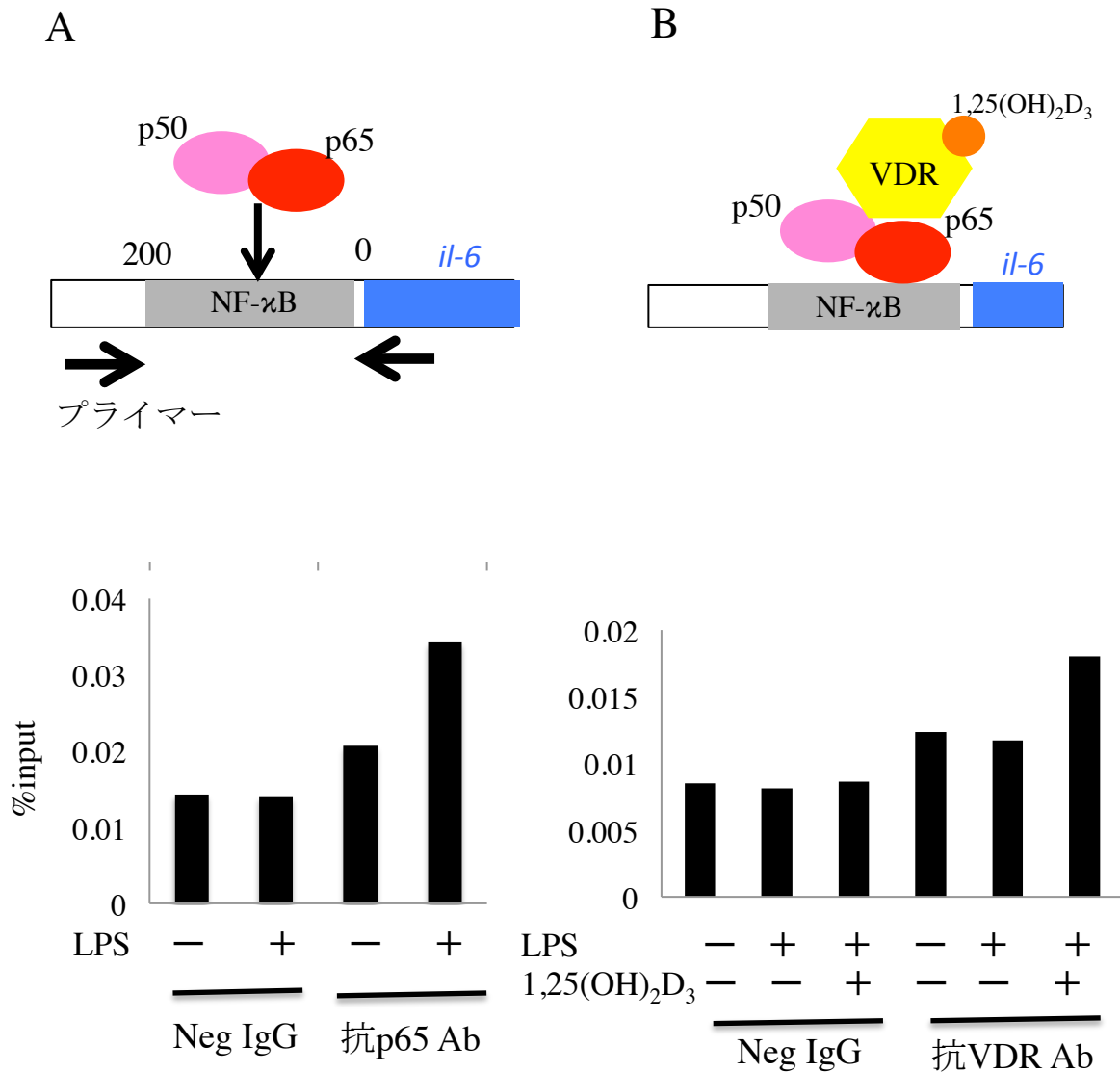


図11. ビタミンDによる、核内受容体を介した転写制御機構

免疫沈降後、*il-6*プロモーターの κ B結合部位に特異的なプライマーでreal-time PCRを行い、検出した。(A) LPS 100 ng/mlを添加して2時間培養し、ネガティブコントロール抗体または抗p65抗体でChIPを行った。(B) 1,25(OH)₂D₃ 100 nMで12時間前処置をした後、LPS 100 ng/mlを添加して2時間培養し、ネガティブコントロール抗体 (Neg IgG) または抗VDR抗体でChIPを行った。

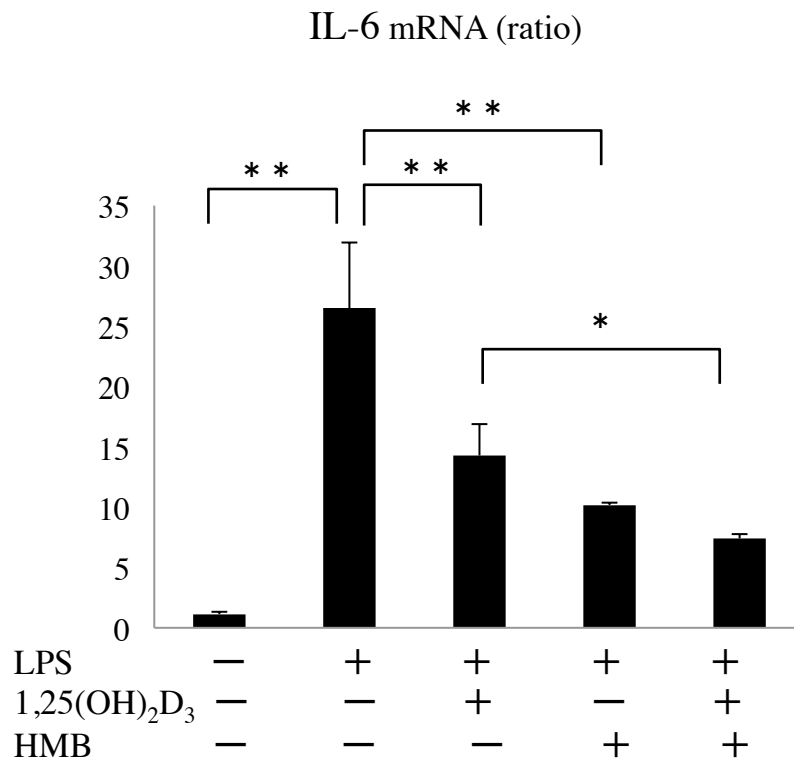


図12. ビタミンDとHMBの相乗的な抗炎症効果

C2C12細胞を分化培地で4-5日間培養し、筋管に分化させた後、
 1,25(OH)₂D₃ 10 nM またはHMB 1 mMで12時間前処置後、LPS 10 ng/mlを
 添加して2時間培養した。

n=3, * p<0.05, ** p<0.01

まず、後肢懸垂による筋重量の変化、体重の変化を調べ、骨格筋であるヒラメ筋重量の測定を行った。本研究では、骨格筋の代表としてよく用いられる、ヒラメ筋を用いた。14日間の後肢懸垂により、ヒラメ筋重量は経時的に低下した (図 13-A)。また、14日間後肢懸垂を行ったマウスでは、対照群と比較して体重が有意に低下し (図 13-B)、血清 IL-6 の有意な増加を認めた (図 13-C)。ヒラメ筋における IL-6 の mRNA 発現量には変化を認めなかった (図 13-D)。

若年マウスと比較した、高齢マウスの筋重量、血清 IL-6 についても検討した。104週齢の高齢マウスでは、若年マウスと比較して、体重あたりのヒラメ筋重量の低下を認めた (図 14-A)。また高齢マウスでは、血清 IL-6 が有意に高値であった (図 14-B)。

後肢懸垂で生じる筋萎縮に対する予防効果を検討するため、ビタミン D および HMB を後肢懸垂モデルに投与した。7日間前から $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または HMB を投与することで、後肢懸垂によるヒラメ筋重量の低下が抑制された (図 15-A)。後肢懸垂を行った3群で、体重には有意差を認めなかった (図 15-B)。HE染色を行い筋線維断面積を測定したところ、断面積についても同様の結果が得られた (図 15-C, D)。

次に、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および HMB が筋萎縮因子に作用している可能性について検討した。3日間の後肢懸垂により、ヒラメ筋の MuRF1 および Atrogin-1 の発現が増加したが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および HMB はその発現を有意に低下させた (図 16-A, B)。

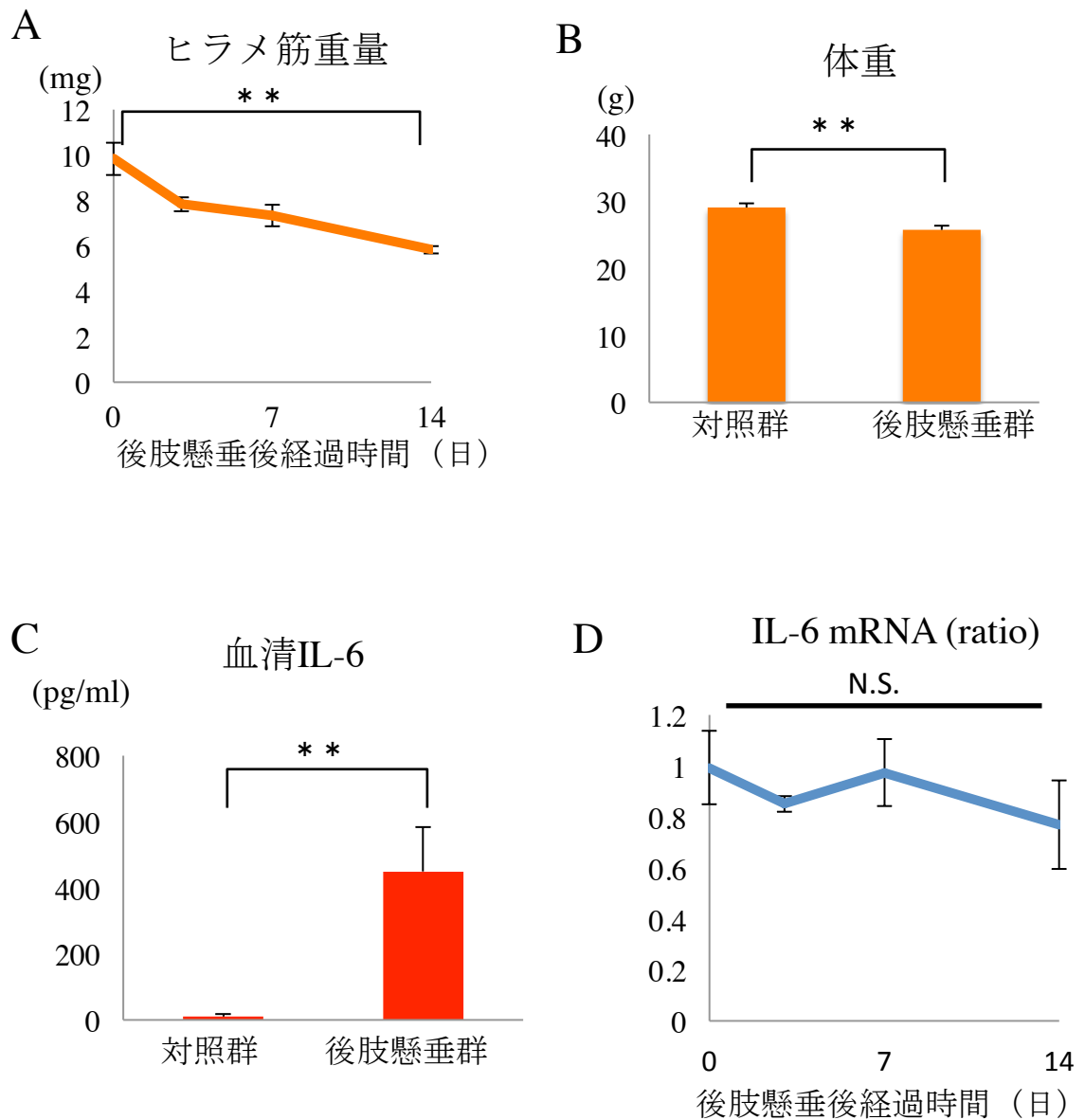


図13. 後肢懸垂マウスの筋量、血清IL-6

C57BL/6J雄マウス12週齢に後肢懸垂を行い、3日目、7日目、14日目でヒラメ筋重量 (A)とヒラメ筋のIL-6発現量 (D)を測定した。14日間後肢懸垂したマウスと対照群とで、体重 (B)および血清IL-6 (C)を比較した。

(A, B, D) n=3 (C) n=5, **p<0.01

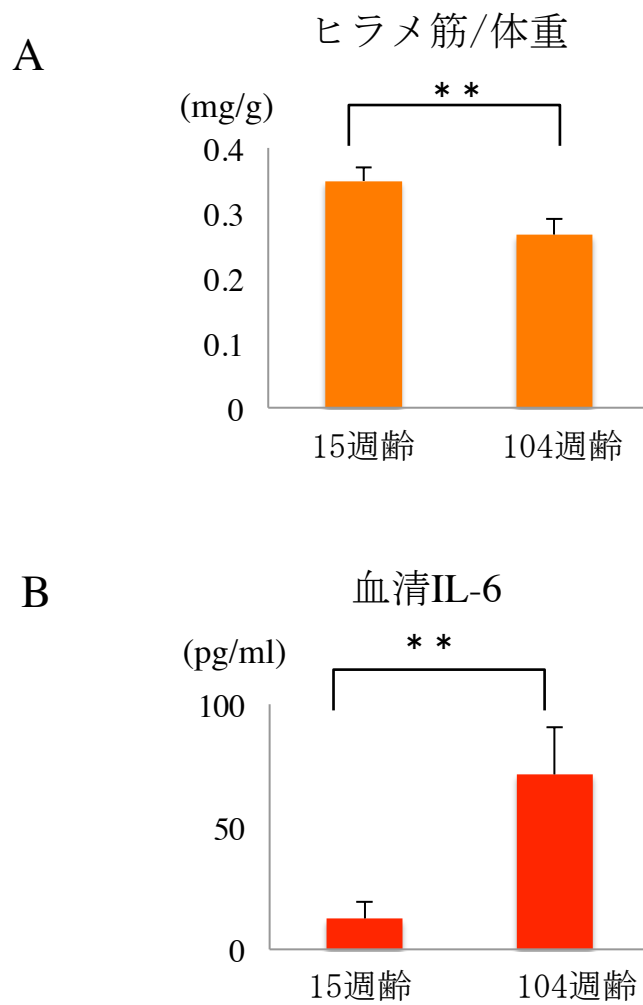


図14. 老齢マウスの筋量と血清IL-6

C57BL/6J雄マウスの15週齢と104週齢について、体重あたりのヒラメ筋重量 (A)と血清IL-6 (B)を測定した。

n=4, **p<0.01

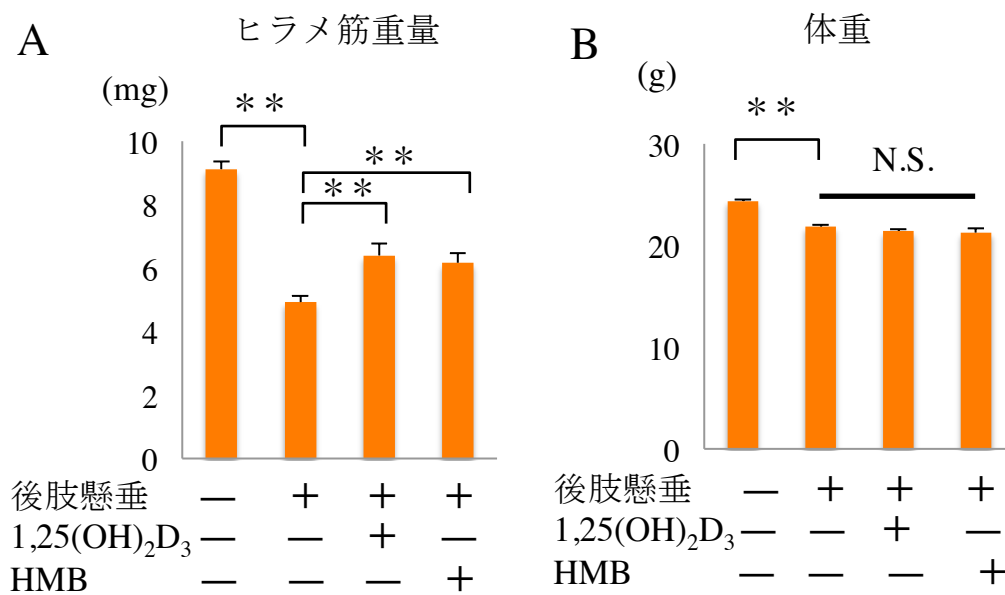
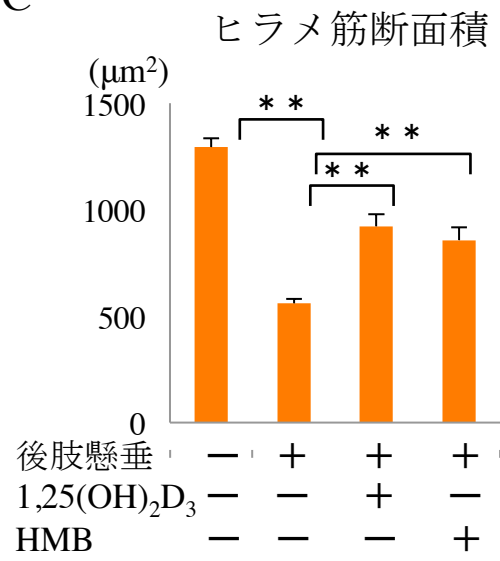


図15. 後肢懸垂による筋萎縮に対する、ビタミンDおよびHMBの効果

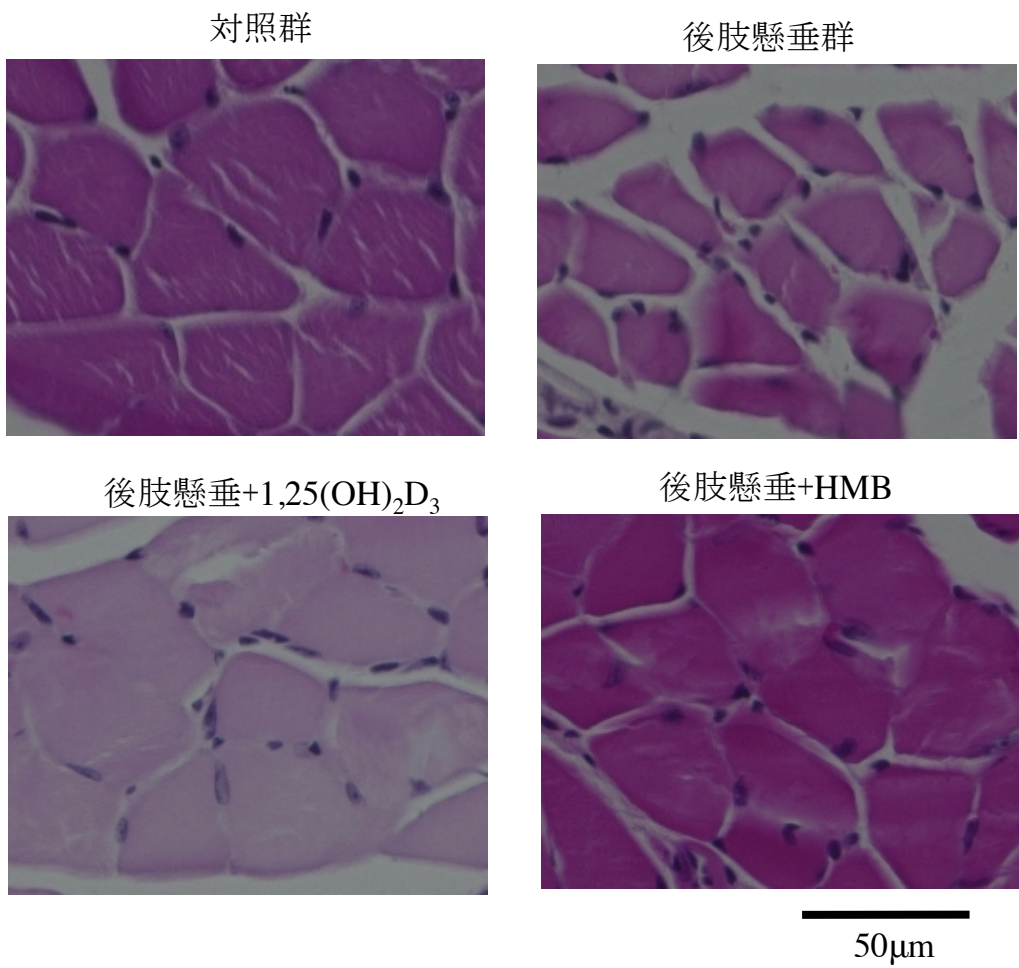
C57BL/6J雄マウス12週齢に、1,25(OH)₂D₃ 0.1 μg/kg/日またはHMB 340 mg/kg/日を7日間投与し、14日間懸垂後、ヒラメ筋重量 (A)、体重 (B)を測定した。また、HE染色を行い、Image Jにより筋線維の断面積を測定した (C)。筋線維の顕微鏡写真 (400倍)をDに示す。

n=4, ** p<0.01

C



D



上記の実験において、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)、HMB (340 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$)による後肢懸垂に伴う筋萎縮因子発現の抑制を確認したことから、次に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、HMB 170 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ と各投与量を 1/2 ずつに減量した上で、両者に併用効果があるかを検討した。MuRF1 および Atrogin-1 は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または HMB 単独では有意な抑制を受けなかった。しかし、両者の併用により、その発現は有意に抑制された (図 16-C, D)。

図 12-C で示したように、後肢懸垂で血清 IL-6 が上昇したため、血清 IL-6 の上昇が筋萎縮に関与している可能性について検討した。抗 IL-6 受容体抗体である MR16-1 をマウスに腹腔内投与し、14 日後の後肢懸垂を行ったところ、ヒラメ筋重量の低下は MR16-1 投与により抑制された (図 17-A)。後肢懸垂を行った 2 群で、体重は有意差を認めなかった (図 17-B)。

そこで、ビタミン D または HMB の投与が、後肢懸垂による血清 IL-6 の上昇を抑制させるかを検討した。14 日間の後肢懸垂により上昇した血清 IL-6 は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または HMB 単剤では有意な低下を示さなかったが、両者の併用により有意に低下した (図 18)。

廃用性筋萎縮を来したマウスに対する、HMB と運動の筋量回復促進効果

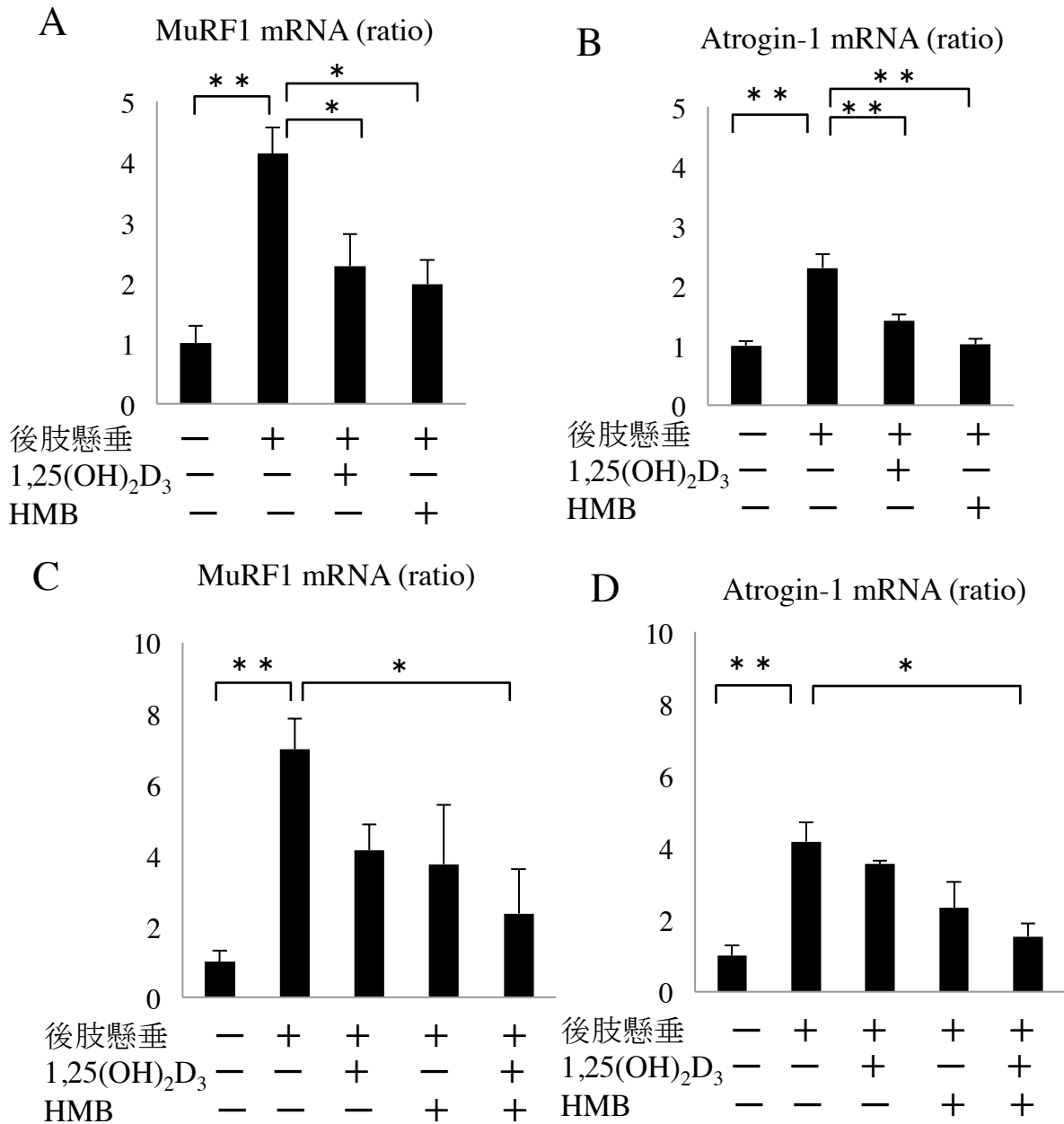


図16. ビタミンD, HMBによる筋萎縮因子抑制効果

C57BL/6J雄マウス12週齢に、1,25(OH)₂D₃ 0.1 µg/kg/日またはHMB 340 mg/kg/日を1週間投与後、3日間後肢懸垂を行った。ヒラメ筋RNAにおける筋萎縮因子の発現を測定した (A, B)。同マウスに、1,25(OH)₂D₃ 0.05 µg/kg/日またはHMB 170 mg/kg/日またはその両者を1週間投与後、1.5日間後肢懸垂を行い、ヒラメ筋の筋萎縮遺伝子の発現を測定した (C, D)。 n=4, *p<0.05, **p<0.01

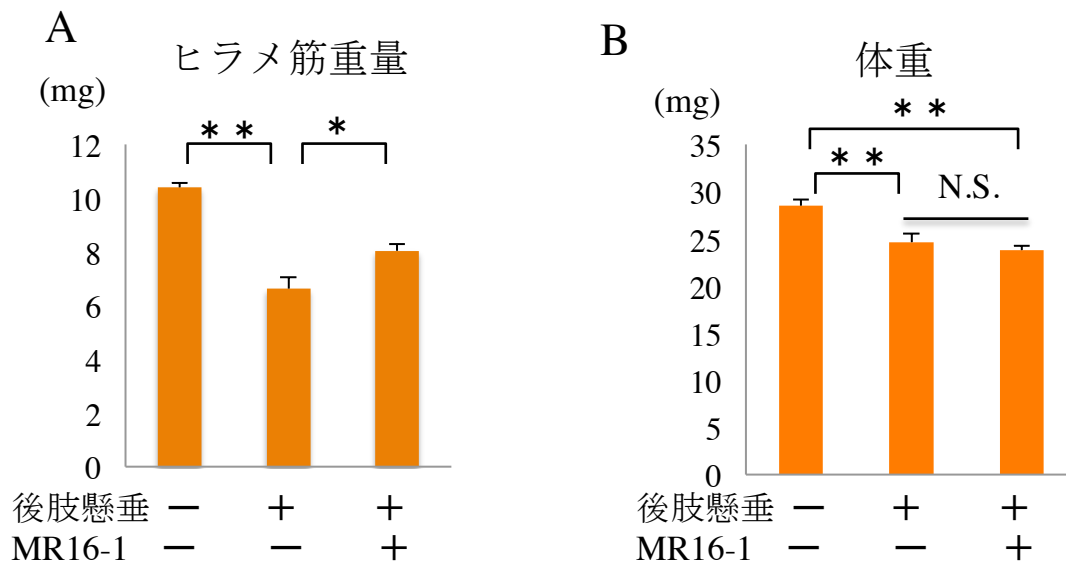


図17. 抗IL-6受容体抗体による筋萎縮抑制効果

図3-Bのプロトコールに従って、C57BL/6J雄マウス11週齢にMR16-1を投与し、14日間後肢懸垂を行った後、ヒラメ筋重量 (A)、体重 (B)を測定した。

n=5, *p<0.05, **p<0.01

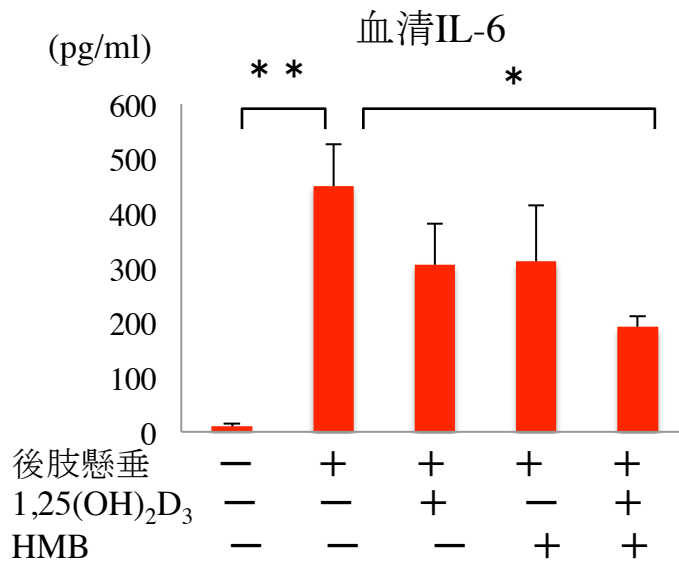


図18. ビタミンDおよびHMBによる、血清IL-6増加抑制効果

C57BL/6J雄マウス12週齢に1,25(OH)₂D₃ 0.1μg/kg/日またはHMB 340mg/kg/日を7日間投与後、後肢懸垂を14日間行い、血清IL-6をELISAにより測定した。

n=4, *p<0.05, **p<0.01

これまでの実験は、ビタミン D または HMB により筋萎縮を予防できるかという観点から行った。今度は、一度後肢懸垂により萎縮した骨格筋が、運動や HMB 投与により回復が促進されるかを検討した。

各群の体重経過を図 19-A に示す。14 日間の後肢懸垂を行った各群では、体重減少を認めた。7 日間の回復期間後、体重は回復傾向にあり、後肢懸垂を行った 4 群では最終体重に有意差を認めなかった。ヒラメ筋重量は、介入なし群では対照群と比較して有意に低下していたが、運動群と運動+HMB 群で、介入なし群よりも有意に高値であった (図 19-B)。腓腹筋重量は、介入なし群では対照群と比較して有意に低下していたが、運動+HMB 群のみで有意に高値であった (図 19-C)。

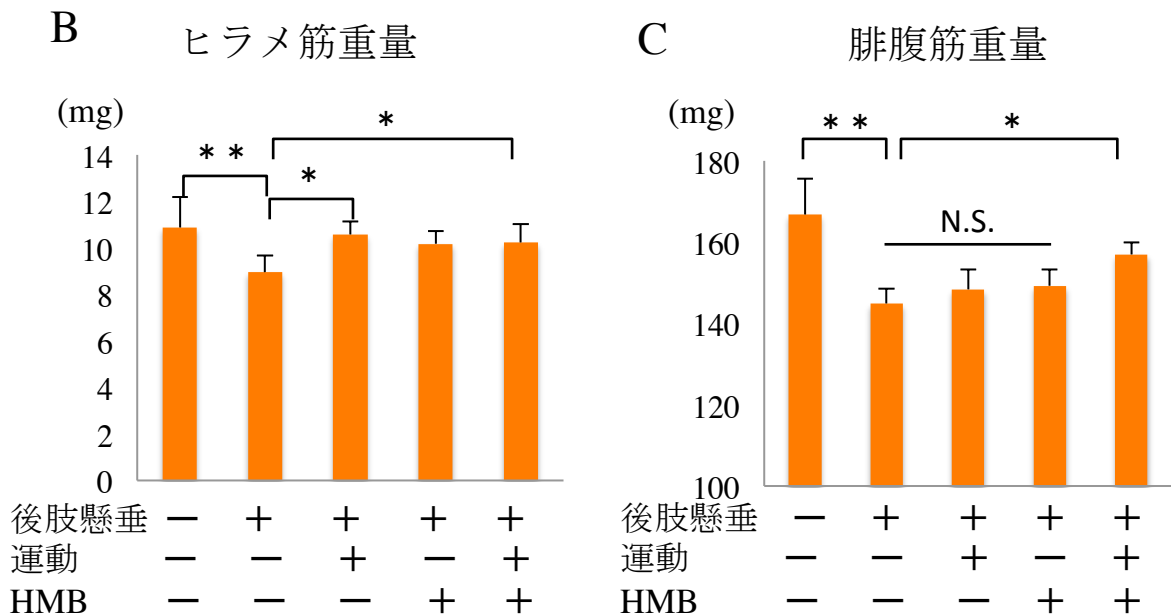
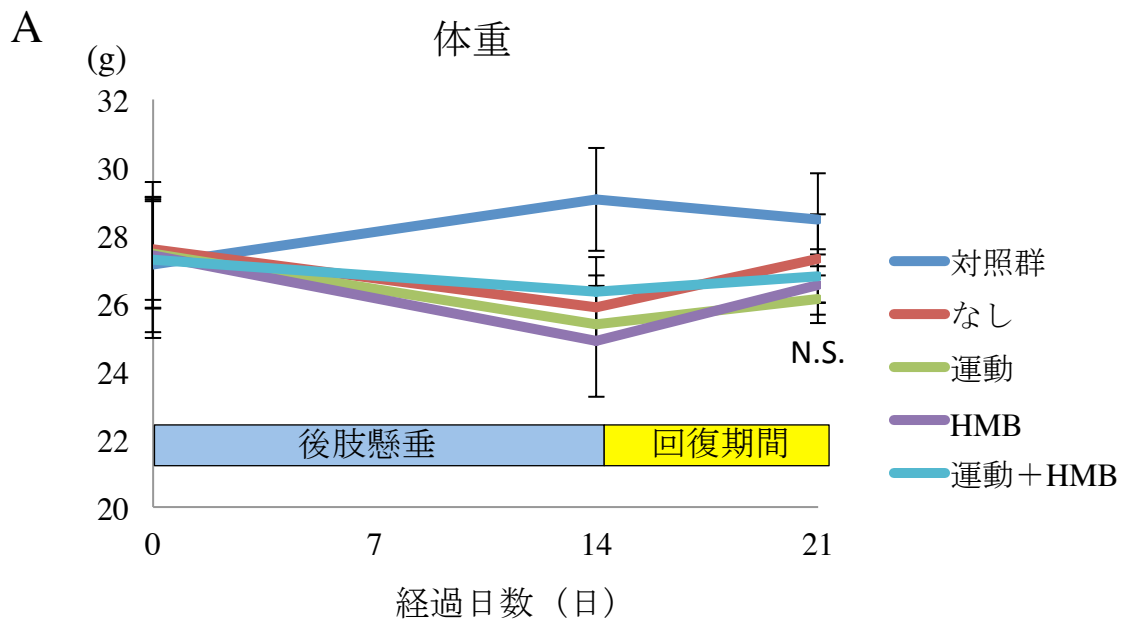


図19. 後肢懸垂後の運動、HMBによる筋量回復効果

C57BL/6J雄マウスに14日間の後肢懸垂後、7日間の回復期間を設けた。回復期間中、トレッドミルによる運動またはHMB 340 mg/kg/日の投与を行った。実験中の体重の経過 (A), ヒラメ筋重量 (B), 腓腹筋重量 (C)を示す。

n=5, *p<0.05, **p<0.01

5. 考察

本研究では、アミノ酸、ビタミン D による炎症制御と、それを利用した筋萎縮改善の可能性の検討を目的として研究を行い、その結果、HMB が NF κ B 系および AP-1 系の抑制により IL-6 の発現を抑制すること、AP-1 系抑制には PP1 α の発現増加を介していること、HMB およびビタミン D が血清 IL-6 上昇を抑制することで後肢懸垂による筋萎縮を抑制すること、運動と HMB の併用が後肢懸垂による筋萎縮からの回復を促進することを明らかにすることができた。

HMB およびビタミン D の抗炎症効果

HMB の抗炎症効果には、ヒト単核球での TNF α 産生低下効果⁶⁶、放射線照射による粘膜炎症の軽減効果⁶⁷などが報告されており、また HMB が PKR 活性化を抑制することで、LPS による筋合成能の低下を軽減することが報告されていた⁷²。しかし、HMB による PKR の抑制機序は不明であり、また HMB による PKR 抑制が下流の MKK, MAPK 活性や炎症性サイトカインの発現に影響するかはこれまで報告がなかった。本研究で、HMB は IL-6, TNF α を初めとする炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかになった (図 5)。HMB は、NF κ B 系 (図 6-A, B) および AP-1 系 (図 7-A) の両

者を抑制した。HMB は、AP-1 の上流の MAPK (p38, JNK1/2), MKK (MKK3/6, MKK4) の活性も抑制した (図 7-B)。

PKR をノックダウンしたマウス胚性線維芽細胞 (MEF) では、LPS による MKK3/6, p38, MKK4, JNK1/2 のリン酸化が阻害され、IL-6 発現が抑制される⁴⁶。また PKR は直接 MKK6 と結合し、活性化させる⁷³。これらより、IL-6 発現に PKR が必要であり、その経路には MAPK, MKK が関与していることが示唆される。ロイシンは *in vivo* に おいて骨格筋の PP1 α の発現を増加させ、PKR のリン酸化を抑制する⁶⁵。HMB は、PP1 α の発現を遺伝子、タンパク質レベルで増加させた (図 8-A, B)。さらに PP1 α をノックダウンすると HMB の効果が無効化された (図 9-A, B)。よって、HMB による IL-6 の発現抑制は、PP1 α , PKR を介してのものであることが示唆された。

ロイシンで HMB と同様の実験を行ったが、JNK1/2, p38 のリン酸化抑制は見られなかった (data not shown)。HMB はロイシンに類似する作用を持つものの、*in vitro* においては、HMB の方が強力な抗炎症効果を持つと考えられた。ロイシンを含む必須アミノ酸は、細胞膜に発現するアミノ酸トランスポーターである SLC7A5 (Solute carrier family 7 member 5) を介し、細胞内グルタミンと入れ替わる形で細胞内に流入し、Rag を介して mTOR を活性化させることが示唆されている⁷⁴。HMB も同様に細胞内に流入する可能性があるが、そのメカニズムは今後検討する必要がある。

以上より HMB は、NF κ B 系および AP-1 系を抑制することで、炎症性サイトカインの発現を抑制すること、また AP-1 系の抑制には、PP1 α の発現上昇による PKR 活性の抑制が関与していることが示唆された (図 20)。

ビタミン D および ED-71 にも、抗炎症効果を認めた (図 10)。VDR は、核内受容体として働く。VDR は p65 と結合するが⁷⁵、VDR が炎症制御において核内に移行して転写に関与するかどうかは明らかでなかった。今回、ChIP により、VDR が核内に移行して IL-6 プロモーターの κ B site にリクルートされることが示唆された (図 11-B)。VDR は核内受容体の 1 つであり、様々な遺伝子においてトランスクリプションに関与している⁶⁹。 κ B site においても、他の共役因子を IL-6 プロモーターに誘導し、IL-6 の転写抑制を行う可能性がある。核内受容体はそれぞれ特有の応答配列を持つが⁷⁶、本研究において PCR で検出した部位には VDR 応答配列は含まれていない。従って、図 11-B のような状態になることが示唆された。なお、他の共役因子や詳細な転写抑制のメカニズムは明らかにできておらず、今後の検討課題である。

炎症抑制においても、両者は相乗的な効果を発揮した (図 12)。HMB は PP1 α に作用し、ビタミン D は VDR を介して作用する。この両者の異なった作用機序が、併用による抗炎症効果をもたらすと考えられた。

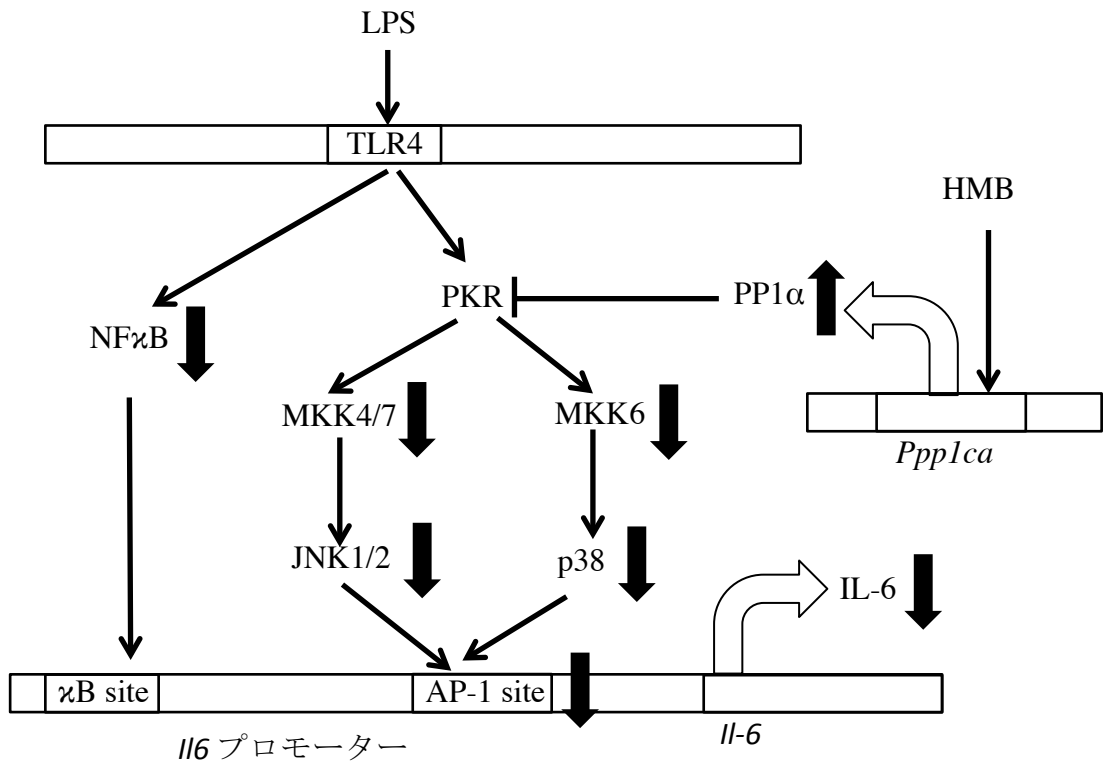


図20. HMBの抗炎症効果

本研究で明らかになったHMBのIL-6発現抑制作用を矢印(➡)で示した。

炎症制御による廃用性筋萎縮の改善効果

Inflammaging の概念によれば、加齢により血中の炎症性サイトカインは増加する。高齢マウスでは若年マウスと比較して、血清 IL-6 が高値であった (図 14-B)。一方、ヒラメ筋における IL-6 発現は有意差を認めなかった (data not shown)。ヒトのコホート研究で、血清 IL-6 高値がその後の筋力低下のリスクファクターとなることが報告されている⁷⁷。また IL-6 を過剰発現させたマウスでは筋萎縮を認めたが、MR16-1 投与によりそれが無効化された⁷⁸。血清 IL-6 は、骨格筋において SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) の発現を増加させ、下流の IRS-1, Akt 活性を低下させることにより、MuRF1, Atrogin-1 の発現を増加させることが示唆されている⁷⁹。このことから、IL-6 がサルコペニアの発症に関与している可能性がある。MR16-1 は、マウス IL-6 受容体のモノクローナル抗体で、IL-6 の生物学的作用を阻害する。後肢懸垂モデルに MR16-1 を投与することで、ヒラメ筋萎縮が部分的に抑制された (図 17-A)。よって、過剰な IL-6 を抑制することは、廃用性筋萎縮の予防、改善につながる可能性が示唆された。一方で IL-6 は、骨格筋の運動により分泌されるマイオカインの 1 つでもあり、筋の成長にも関与することが示唆されている⁸⁰。筋肉トレーニングを含む様々な運動で、血清 IL-6 は上昇する⁸¹。*In vitro* では、分化 C2C12 筋管に電気刺激を与えると、培養液中の IL-6 が増加した⁸²。このように IL-6 は多面的な作用を持つサイトカ

インである。後肢懸垂で、マウスのヒラメ筋における IL-6 の発現は増加していなかった (図 13-D)。後肢懸垂を行うと、骨髄細胞からの IL-6 産生が亢進することが報告されている⁸³。また、後肢懸垂は門脈内の LPS 濃度を増加させることが報告されており、これは腸上皮における細菌や毒素の透過性亢進による可能性が示唆されている⁸⁴。よって、後肢懸垂により血中に増加した LPS が、マクロファージや T 細胞からの IL-6 産生を亢進させた可能性も考えられる。骨格筋により産生される IL-6 は筋萎縮に寄与しないが、他の臓器に産生される IL-6 が筋萎縮に関与している可能性が示唆される。今後 IL-6 はサルコペニアの有用なバイオマーカーになりうる。

HMB およびビタミン D も、筋萎縮改善効果を示した。HMB, ビタミン D は、後肢懸垂によるヒラメ筋の萎縮を抑制し (図 15-A, C, D)、両者の併用は有意に血清 IL-6 の上昇を抑制した (図 18)。さらに、HMB, ビタミン D のいずれもが、ヒラメ筋の筋萎縮因子の発現を低下させた (図 16-A, B)。HMB とビタミン D の併用でも、有意に筋萎縮因子は低下した (図 16-C, D)。血清 IL-6 濃度の抑制により、MuRF1, Atrogin-1 の発現が抑制され、筋萎縮を軽減したと考えられる。

本研究では、ビタミン D、HMB は単独で、抗炎症効果、筋萎縮関連遺伝子抑制効果を示した。臨床研究においても、ビタミン D、HMB がサルコペニアを改善させることが示唆されている^{55, 56, 62}。HMB はタンパク合成系である mTOR を活性化し⁵²、

ビタミン D は *in vitro* において VDR を介した筋細胞の増殖、筋管肥大に関与している⁸⁵。これらの作用もサルコペニア改善において重要と考えられる。ヒトを対象とする研究で、血中ビタミン D が低値の場合、HMB による有意な筋力改善が認められなかったとする報告がある⁸⁶。このことから、両者の併用が、サルコペニア改善により有用である可能性が示唆された。

本研究では、後肢懸垂マウスをサルコペニアのモデルとして用いた。後肢懸垂による筋萎縮は廃用性筋萎縮であり、一次性サルコペニアと同一の病態ではない。一次性サルコペニアと廃用性筋萎縮の病態の違いはまだ明らかでないものの、高齢者のサルコペニアの原因は複合的であることが多く、また廃用はサルコペニア発症の要因として重要である⁸⁷。その意味で、本研究は、二次性サルコペニアの予防、改善という観点からのものである。廃用では一般に遅筋が低下するが、14 日間の後肢懸垂では、ヒラメ筋の筋線維における遅筋の割合は不変か軽度低下にとどまり、筋線維断面積が低下する^{88,89}。よって、遅筋の割合は後肢懸垂マウスと高齢マウスで大差なく、速筋線維の断面積低下は両者に共通している一方で、後肢懸垂マウスでは高齢マウスよりも遅筋線維の断面積低下が目立っていると考えられる。本研究で、後肢懸垂モデルと高齢マウスでは、いずれも対照群と比較し、筋量の減少、血清 IL-6 高値を呈していた (図 13, 14)。また MuRF1, Atrogin-1 は、両者の発症に関与していることが示唆され

ている³¹⁻³³。そのため、後肢懸垂マウスを用いて検討した薬剤や運動の効果は、二次性サルコペニアだけでなく、高齢マウス、ひいては一次性サルコペニアにも応用できる可能性がある。しかし、薬剤や運動がヒトのサルコペニアでも同様に有用であるかについては、さらなる検討が期待される。

サルコペニアに対する運動と栄養の併用効果

ヒトを対象とした研究でも、栄養と運動の組み合わせが筋量、身体機能改善に有効であったという報告がある^{90,91}。

後肢懸垂からの腓腹筋重量回復において、運動または **HMB** 単独では、有意な改善を認めなかった (図 19-C)のに対し、運動と **HMB** の併用を行うことで、筋量回復が有意に促進された (図 19-B, C)。そのため、サルコペニアのリハビリテーションには両者の併用が望ましいことが示唆された。体重は後肢懸垂を行った全ての群で回復し、回復期間終了時には有意差を認めなかった (図 19-A)。このことから、回復期間に介入を行わなかった群では、筋以外の組織 (体脂肪など)の割合が増加し、サルコペニア肥満に類似した状態に陥る可能性が示唆された。サルコペニア肥満では、筋量低下と体重増加を認め、サルコペニアまたは肥満単独の場合よりも、高血圧⁹²、動脈硬化⁹³のリスクが上昇する。臨床的にも、サルコペニアのリハビリテーションにおいて、

運動と HMB を組み合わせることにより、体脂肪を大きく増やすことなくサルコペニアを改善させられる可能性が示唆された。

本研究により、マウスにおいて、HMB、ビタミン D の抗炎症作用がサルコペニアを改善させる可能性が示唆された。ヒトにおいても、筋萎縮関連遺伝子がサルコペニアに関与している可能性が示唆されている。よって、HMB とビタミン D の抗炎症作用は、ヒトにおいても筋萎縮関連遺伝子を抑制し、サルコペニアの予防、改善につながると考えられた。さらに、*in vitro* および *in vivo* においてビタミン D と HMB は併用効果があることから、高齢者のサルコペニアにおいても、HMB とビタミン D の単独投与より併用投与の方が、改善効果を期待できる可能性がある。また HMB と運動の併用も、高齢者のサルコペニア改善に有用である可能性が示唆された。

高齢者にとって、サルコペニアの予防、サルコペニア発症後の機能改善は重要である。しかし合併症によっては、特定の薬剤摂取や運動が困難な例もある。アミノ酸 (HMB)、ビタミン D、運動の中から、利用可能なもの組み合わせることが、高齢者サルコペニアの予防・改善につながると考えられた。

6. 文献

1. Rosenberg IH. Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988. *Am J Clin Nutr.* 1989;50:1231-1233.
2. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr.* 1997;127:990S-991S.
3. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 2001;137:231-243.
4. Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, Corsi AM, Rantanen T, Guralnik JM, Ferrucci L. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol.* 2003;95:1851-1860.
5. Al Snih S, Markides KS, Ottenbacher KJ, Raji MA. Hand grip strength and incident ADL disability in elderly Mexican Americans over a seven-year period. *Aging Clin Exp Res.* 2004;16:481-486.
6. Bean JF, Kiely DK, Herman S, Leveille SG, Mizer K, Frontera WR, Fielding RA. The relationship between leg power and physical performance in mobility-limited older people. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:461-467.
7. Suzuki T, Bean JF, Fielding RA. Muscle power of the ankle flexors predicts functional performance in community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49:1161-1167.
8. Guralnik JM, Ferrucci L, Pieper CF, Leveille SG, Markides KS, Ostir GV, Studenski S, Berkman LF, Wallace RB. Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000;55:M221-231.
9. Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Simonsick EM, Harris TB, Penninx BW, Brach JS, Tylavsky FA, Satterfield S, Bauer DC, Rubin SM, Visser M, Pahor M. Added value of physical performance measures in predicting adverse health-related events: results from the Health, Aging And Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57:251-259.
10. Guralnik JM, Simonsick EM, Ferrucci L, Glynn RJ, Berkman LF, Blazer DG, Scherr PA, Wallace RB. A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission. *J Gerontol.* 1994;49:M85-94.
11. Functional outcomes for clinical trials in frail older persons: time to be moving. *J*

Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008;63:160-164.

12. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol.* 1998;147:755-763.

13. Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick E, Goodpaster B, Nevitt M, Kritchevsky SB, Tylavsky FA, Rubin SM, Harris TB. Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function. *J Am Geriatr Soc.* 2003;51:1602-1609.

14. Chien MY, Huang TY, Wu YT. Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56:1710-1715.

15. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:889-896.

16. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M, Zamboni M. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010;39:412-423.

17. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56:M146-156.

18. Bauer JM, Sieber CC. Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp Gerontol.* 2008;43:674-678.

19. Inouye SK, Studenski S, Tinetti ME, Kuchel GA. Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55:780-791.

20. Tanimoto Y, Watanabe M, Sun W, Hirota C, Sugiura Y, Kono R, Saito M, Kono K. Association between muscle mass and disability in performing instrumental activities of daily living (IADL) in community-dwelling elderly in Japan. *Arch Gerontol Geriatr.* 2012;54:e230-233.

21. Yamada M, Nishiguchi S, Fukutani N, Tanigawa T, Yukutake T, Kayama H, Aoyama T, Arai H. Prevalence of Sarcopenia in Community-Dwelling Japanese Older Adults. *J Am Med Dir Assoc.* 2013.

22. 厚生労働省. 介護保険事業状況報告. 2010.

23. 厚生労働省. 日本の将来人口推計. 2010.

24. Lexell J, Taylor CC, Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? *Total*

number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci.* 1988;84:275-294.

25. Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E151-157.

26. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:2191-2199.

27. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1014-1019.

28. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1009-1013.

29. Parkington JD, LeBrasseur NK, Siebert AP, Fielding RA. Contraction-mediated mTOR, p70S6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2004;97:243-248.

30. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:14440-14445.

31. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294:1704-1708.

32. Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics.* 2005;21:253-263.

33. Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I, Derijard B. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:794-801.

34. Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tylavsky FA, Visser M. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;64:1183-1189.

35. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB,

- Nevitt M, Harris TB. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002;57:M326-332.
36. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-254.
37. Lu H, Wu JY, Kudo T, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Mol Biol Cell*. 2005;16:4954-4966.
38. Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM. Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology*. 2000;48:173-183.
39. Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci*. 2007;81:1602-1614.
40. Rupec RA, Poujol D, Grosgeorge J, Carle GF, Livolsi A, Peyron JF, Schmid RM, Baeuerle PA, Messer G. Structural analysis, expression, and chromosomal localization of the mouse *ikba* gene. *Immunogenetics*. 1999;49:395-403.
41. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K, Akira S. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature*. 2004;430:218-222.
42. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:205-219.
43. Tanos T, Marinissen MJ, Leskow FC, Hochbaum D, Martinetto H, Gutkind JS, Coso OA. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J Biol Chem*. 2005;280:18842-18852.
44. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*. 1996;16:1247-1255.
45. Yang D, Tournier C, Wysl M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3004-3009.
46. Goh KC, deVeer MJ, Williams BR. The protein kinase PKR is required for p38

MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J.* 2000;19:4292-4297.

47. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002;115:241-256.

48. Tan SL, Tareen SU, Melville MW, Blakely CM, Katze MG. The direct binding of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 to the PKR protein kinase is necessary but not sufficient for inactivation and disruption of enzyme dimer formation. *J Biol Chem.* 2002;277:36109-36117.

49. Houston DK, Nicklas BJ, Ding J, Harris TB, Tylavsky FA, Newman AB, Lee JS, Sahyoun NR, Visser M, Kritchevsky SB. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:150-155.

50. Volkert D, Hubsch S, Oster P, Schlierf G. Nutritional support and functional status in undernourished geriatric patients during hospitalization and 6-month follow-up. *Aging (Milano).* 1996;8:386-395.

51. Scognamiglio R, Piccolotto R, Negut C, Tiengo A, Avogaro A. Oral amino acids in elderly subjects: effect on myocardial function and walking capacity. *Gerontology.* 2005;51:302-308.

52. Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E923-931.

53. Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, Loughna P, Churchward-Venne TA, Breen L, Phillips SM, Etheridge T, Rathmacher JA, Smith K, Szewczyk NJ, Atherton PJ. Effects of leucine and its metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol.* 2013;591:2911-2923.

54. Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. *Nutr Metab (Lond).* 2008;5:1.

55. Baier S, Johannsen D, Abumrad N, Rathmacher JA, Nissen S, Flakoll P. Year-long changes in protein metabolism in elderly men and women supplemented with a nutrition cocktail of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), L-arginine, and L-lysine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2009;33:71-82.

56. Flakoll P, Sharp R, Baier S, Levenhagen D, Carr C, Nissen S. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition*. 2004;20:445-451.
57. Perry HM, 3rd, Horowitz M, Morley JE, Patrick P, Vellas B, Baumgartner R, Garry PJ. Longitudinal changes in serum 25-hydroxyvitamin D in older people. *Metabolism*. 1999;48:1028-1032.
58. Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, Dick W. In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J*. 2001;33:19-24.
59. Bischoff-Ferrari HA, Borchers M, Gudat F, Durmuller U, Stahelin HB, Dick W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J Bone Miner Res*. 2004;19:265-269.
60. Scott D, Blizzard L, Fell J, Ding C, Winzenberg T, Jones G. A prospective study of the associations between 25-hydroxy-vitamin D, sarcopenia progression and physical activity in older adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73:581-587.
61. Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:91-100.
62. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, Wong JB, Egli A, Kiel DP, Henschkowski J. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2009;339:b3692.
63. Nakamura T, Takano T, Fukunaga M, Shiraki M, Matsumoto T. Eldecalcitol is more effective for the prevention of osteoporotic fractures than alfacalcidol. *J Bone Miner Metab*. 2013;31:417-422.
64. Sipila S, Suominen H. Effects of strength and endurance training on thigh and leg muscle mass and composition in elderly women. *J Appl Physiol*. 1995;78:334-340.
65. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J*. 2007;407:113-120.
66. Nunes EA, Lomax AR, Noakes PS, Miles EA, Fernandes LC, Calder PC. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate modifies human peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in vitro. *Nutrition*. 2011;27:92-99.
67. Yavas C, Yavas G, Acar H, Toy H, Yuce D, Akyurek S, Ata O. Amelioration of radiation-induced acute inflammation and mucosal atrophy by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, L-glutamine, and L-arginine: results of an experimental

- study. *Support Care Cancer*. 2013;21:883-888.
68. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:889-897.
69. Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids*. 2013;78:127-136.
70. Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell*. 2004;116:511-526.
71. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol Cell Biol*. 2009;29:3544-3555.
72. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E1409-1416.
73. Silva AM, Whitmore M, Xu Z, Jiang Z, Li X, Williams BR. Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem*. 2004;279:37670-37676.
74. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136:521-534.
75. Lu X, Farmer P, Rubin J, Nanes MS. Integration of the NfkappaB p65 subunit into the vitamin D receptor transcriptional complex: identification of p65 domains that inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated transcription. *J Cell Biochem*. 2004;92:833-848.
76. Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:44-55.
77. Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Visser M. Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *Am J Med*. 2006;119:526 e529-517.
78. Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H, Monden M. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;97:244-249.

79. Zhang L, Du J, Hu Z, Han G, Delafontaine P, Garcia G, Mitch WE. IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:604-612.
80. Munoz-Canoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 2013;280:4131-4148.
81. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006;12:6-33.
82. Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E1191-1204.
83. Grano M, Mori G, Minielli V, Barou O, Colucci S, Giannelli G, Alexandre C, Zallone AZ, Vico L. Rat hindlimb unloading by tail suspension reduces osteoblast differentiation, induces IL-6 secretion, and increases bone resorption in ex vivo cultures. *Calcif Tissue Int.* 2002;70:176-185.
84. Rivera CA, Tchardtchi MH, Mendoza L, Smith CW. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading. *J Appl Physiol (1985).* 2003;95:1656-1663.
85. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Mokbel N, Cheng K, Gunton JE. Vitamin D Signaling Regulates Proliferation, Differentiation, and Myotube Size in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology.* 2014;155:347-357.
86. Fuller JC, Jr., Baier S, Flakoll P, Nissen SL, Abumrad NN, Rathmacher JA. Vitamin D status affects strength gains in older adults supplemented with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine: a cohort study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011;35:757-762.
87. Wall BT, van Loon LJ. Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. *Nutr Rev.* 2013;71:195-208.
88. Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, Digennaro C, Dinardo MM, Camerino GM, Ricciuti P, Brocca L, Pellegrino MA, Bottinelli R, Camerino DC. Antioxidant treatment of hindlimb-unloaded mouse counteracts fiber type transition but not atrophy of disused muscles. *Pharmacol Res.* 2010;61:553-563.
89. Hanson AM, Stodieck LS, Cannon CM, Simske SJ, Ferguson VL. Seven days of muscle re-loading and voluntary wheel running following hindlimb suspension in mice restores running performance, muscle morphology and metrics of fatigue but not muscle strength. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010;31:141-153.
90. Candow DG, Forbes SC, Little JP, Cornish SM, Pinkoski C, Chilibeck PD. Effect of nutritional interventions and resistance exercise on aging muscle mass and strength.

Biogerontology. 2012;13:345-358.

91. von Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2010;1:129-133.

92. Park SH, Park JH, Song PS, Kim DK, Kim KH, Seol SH, Kim HK, Jang HJ, Lee JG, Park HY, Park J, Shin KJ, Kim DI, Moon YS. Sarcopenic obesity as an independent risk factor of hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2013.

93. Kohara K, Ochi M, Tabara Y, Nagai T, Igase M, Miki T. Arterial stiffness in sarcopenic visceral obesity in the elderly: J-SHIPP study. *Int J Cardiol*. 2012;158:146-148.

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院医学系研究科 老年病科 教授の秋下雅弘先生をはじめ、老年病科 准教授の小川純人先生、老年病科 特任講師の大田秀隆先生にご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。また多くのご協力をいただきました老年病科の研究室の皆様に感謝いたします。