

加齢に伴う運動能力低下・サルコペニアのバイオマーカーとしての血中アドロピンの臨床応用と基礎的検討

北海道大学大学院 福 島 新
(共同研究者) 同 絹 川 真太郎
同 横 田 卓
同 高 田 真 吾
北 翔 大 学 沖 田 孝 一

Clinical and Basic Investigations on the Serum Adropin as a Surrogate Marker for Age-Related Exercise Intolerance and Sarcopenia

by

Arata Fukushima, Shintaro Kinugawa,
Takashi Yokota, Shingo Takada,
*Department of Cardiovascular Medicine,
Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University*
Koichi Okita
*Graduate School of Program in Lifelong Learning Studies,
Hokusho University*

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate whether adropin, a novel regulator of metabolic homeostasis, is involved in lowered exercise capacity and skeletal muscle atrophy due to aging (sarcopenia). We focused on heart failure, which is a representative disease of sarcopenia, and tested this hypothesis in clinical studies for patients with heart failure and in experimental settings using heart failure model

after myocardial infarction. The serum adropin levels of heart failure patients was 1.44 ± 0.09 (ng / mL), which was significantly lower than that of the healthy control group (1.64 ± 0.07). Moreover, serum adropin levels showed a significant positive correlation with the maximum oxygen uptake and anaerobic metabolic threshold, which are indicators of exercise tolerance ($r = 0.65, 0.59$, respectively). In addition, serum adropin levels showed a significant negative correlation with the ventilatory response which is an index of shortness of breath ($r = -0.61$). We created post-infarct heart failure model by ligating left coronary artery of 10 - 12 week old C57BL / 6J mice. In this model, the exercise time, exercise distance, and maximum oxygen uptake were all significantly reduced compared to the Sham group. These lowered exercise capacities were associated with a reduction in mitochondrial oxidative capacity in the skeletal muscle of those mice. As a future plan, we will quantify adropin concentration in those skeletal muscle tissues and will examine whether adropin levels are associated with muscle mitochondrial oxidative capacities under each energy substrate. Our findings suggest that serum adropin levels may a new surrogate marker for sarcopenia and exercise intolerance associated with heart failure as well as aging.

要 旨

本研究は加齢に伴う運動耐容能低下および骨格筋萎縮（サルコペニア）において、最近見出されたエネルギー恒常性維持に関わるホルモン、アドロピンの役割を検討した。サルコペニアを呈する代表疾患である心不全に着目し、慢性心不全患者を対象とした臨床研究と心筋梗塞後心不全モデル動物を用いた動物実験によってこれを検証した。心不全患者の血清アドロピン値は 1.44 ± 0.09 (ng/mL) と健常対照群 (1.64 ± 0.07 , ng/mL) と比較して有意に低値であった ($p < 0.01$)。さらに血清アドロピンは運動耐容能の指標である最大酸素摂取量および嫌気性代謝閾値と有意な正の相関を示した ($r = 0.65, 0.59$)。一方で血清アドロピンは換気応答と有意な負の相関を示した ($r = -0.61$)。10-12週齢C57BL/6Jマウスを用いて左冠動脈を結紮し、心筋梗塞後心不全モデル動物を作製した。梗塞後心不全マウスでは Sham 群と比較し運動時間・運

動距離・最大酸素摂取量は有意に低下した。さらにこれらの低下は骨格筋ミトコンドリア呼吸能の低下と関連していた。今後、骨格筋組織のアドロピンを定量し、骨格筋ミトコンドリアにおける各エネルギー代謝基質の呼吸能との関連を検討する予定である。以上から血中アドロピンはサルコペニアや運動耐容能低下の新たなサロゲートマーカーとなる可能性が示唆される。

緒 言

わが国では人口の高齢化が急速に進んでおり、65歳以上の高齢化率が平成27年度には総人口の26.7%まで達した。高齢化はその疾患そのものの臨床上の問題に加えて、合併する全身の脆弱や骨格筋異常が身体的自立の喪失をもたらし、要介護化の危険性を増加させるため臨床上の問題とともに医療経済も含んだ重要な社会問題である。

加齢に伴う身体・精神機能の低下は虚弱（フレイル）と総称されるが、Friedらはフレイルサイ

クルにおいて高齢者は種々の要因で活動量が低下し食欲低下等によって栄養摂取量が減少し、それが加齢に伴う骨格筋量の低下（サルコペニア）につながることを提唱している¹⁾。サルコペニアは、骨格筋蛋白質の同化・異化不均衡による異化亢進によって引き起こされる。インスリン様成長因子（IGF-1）は成長ホルモンや運動刺激により筋細胞内で合成され、Akt 経路を介してラパマイシン標的蛋白（mTOR）を活性化し、筋蛋白質合成を促す。然し、サルコペニアでは骨格筋局所での IGF-1 の発現低下、Akt のリン酸化障害が筋蛋白質合成障害をもたらすことが報告されている²⁾。Akt は筋蛋白質合成経路であるとともに、主要なインスリンシグナルであることから、Akt のリン酸化障害は骨格筋のインスリン抵抗性をも示唆する。我々はこれまで骨格筋におけるインスリン抵抗性が骨格筋ミトコンドリア機能ならびに運動耐容能と密接に関連することを明らかにしてきた³⁾。さらに我々は、アンジオテンシン II 誘発性骨格筋萎縮モデルにおいて、筋萎縮より先行してミトコンドリア機能障害が生じることを見出した⁴⁾。これらの検討は、骨格筋エネルギー代謝異常がサルコペニアの発症起点となり、運動耐容能低下へと進展することを示唆する。

アドロピンはエネルギー代謝の恒常性維持に関連する遺伝子にコードされたペプチドホルモンであり、2008 年に Kumar らによって同定された⁵⁾。アドロピンは肝、脳組織だけでなく骨格筋、心筋、血管内皮細胞からも産生され血中に分泌される。血中の内因性アドロピンは食前に増加し食後に低下する。食餌誘発性肥満マウスや遺伝性肥満マウスにアドロピンを全身投与あるいは過剰発現させると脂肪肝やインスリン抵抗性が改善する⁶⁾。アドロピン遺伝子改変マウスの骨格筋を用いた検討では、アドロピンが骨格筋エネルギー基質代謝を脂肪酸代謝から糖代謝へとシフトさせることが明らかとなった⁷⁾。さらに、インスリン感受性に強

く関連する血管内機能障害に関してもアドロピンの添加は有効であった。これらの知見はアドロピンがエネルギー恒常性維持を目的として、骨格筋のエネルギー代謝基質を制御する可能性を示唆する。そこで我々は、加齢や心不全の血中および骨格筋組織でアドロピンの発現が低下し、骨格筋エネルギー代謝恒常性の破綻から、サルコペニアさらには運動能力の低下をもたらすと仮説をたてた。

これらを検証するために、サルコペニアを呈する代表的な疾患である心不全に着目し、まず心不全患者と健常群の血液検体を用いてアドロピン濃度を比較検討した。さらに動物実験では心筋梗塞後心不全モデル動物を作製し、骨格筋エネルギー代謝とアドロピンの発現との関連を検討した。

1. 研究方法

1. 1 臨床研究

北海道大学病院通院中の慢性心不全患者 25 名、対照群として年齢をマッチさせた基礎心疾患を有しない健常者 15 名を対象とした。心不全の診断はフラミンガム基準に従い、全例心肺運動負荷試験および心臓超音波検査を行った。心肺運動負荷試験の後 3 か月以内に血液採取を行い、使用するまで -80℃ で凍結保存した。本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2013 年 10 月修正）」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施した。本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認され実施した。

1. 1. 1 心臓超音波検査

経胸壁心臓超音波検査を行い、心尖部より観察して得られた四腔及び二腔走査にて修正シンプソン法を用いて左室駆出率を算出した。

1. 1. 2 心肺運動負荷試験

座位自転車エルゴメーター（Aerobike 75XLII, CombiWellness, Tokyo, Japan）を用いて、3 分間

の warm-up の後に心不全患者では毎分 10-15W、健常対照者では毎分 25W で症候限界まで負荷を加えた。被験者は下肢疲労と呼吸困難のいずれかもしくは両方により運動を中止した。酸素消費量は安静時から運動中を通して 280E Aero-monitor (AeromonitorAE-300S, Minato Medical Science, Osaka, Japan) を用いて測定した。最高酸素摂取量 (peak VO_2) は運動中に得られた最大の酸素摂取量と定義し、嫌気代謝閾値 (AT) は V スロープ法により求めた。分時換気量と二酸化炭素産生量を最小二乗直線回帰により VE/VCO_2 スロープを求め ($y = mx + b$; $m = \text{slope}$)、評価した。

1. 1. 3 血中アドロピンの測定

1. 1 にて凍結保存した血清検体を用いて、市販のアドロピン ELISA キット (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) により血中アドロピン濃度を測定した。測定は異なる検者で同一サンプルにつき 2 回測定した。450nm の光学濃度を分光光度計にて測定し、logit 変換により求めた検量線により濃度に変換して算出した。

1. 2 動物実験

全ての動物実験ならびに実験に用いたマウスの飼育保管および実験計画は北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会にて承認され、「北海道大学動物実験に関する規程」に従って実施した。

1. 2. 1 実験プロトコール

心不全モデル動物として 10 ~ 12 週齢 C57BL/6J マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞 (myocardial infarction, MI 群, $n=10$) を作成した。また対照として冠動脈を結紮しない偽手術 (Sham 群, $n=10$) を作成した。これらのマウスを手術後 4 週間飼育し、トレッドミル、心エコーを行った。トレッドミルから 2 日以上あけて臓器を採取した。臓器採取の際はトリプロモエタノール 250 mg/kg 体重を腹腔内注射して十分な麻酔深度を得た後に確実に安楽死させ骨格筋組織を迅速に摘出

した。湿重量を測定した後、骨格筋ミトコンドリアを分離し、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置 (OROBOROS) にて各種エネルギー代謝基質におけるミトコンドリア呼吸能を測定した。また、骨格筋組織の抽出液から上述の ELISA kit を用いてアドロピン濃度を測定した。

1. 2. 2 心臓超音波検査

手術後 4 週間飼育した MI 群ならびに Sham 群のマウスに対して超音波検査 (Aplio300; Toshiba Medical System, Otawara, Japan) を行った。心臓超音波検査は 2D 胸骨傍短軸像の乳頭筋レベルで観察し、最適な像が描出されるレベルで M モード法へ切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室内径、壁厚、左室内径短縮率を計測した。

1. 2. 3 運動能力テスト

運動能力は小動物用トレッドミル (Oxymax 2; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) を用いた漸増負荷運動での持久能力とミキシングチャンバー法を用いた呼気ガス分析により評価した。トレッドミル上にマウスを置き、傾斜角度を 0 度として 10 分間の安静に引き続き、速度 6m/分 でウォーミングアップを開始した。10 分後に傾斜角度 10 度して 2 分毎に 2m/分速度を漸増させた。漸増運動負荷中はマウスが最大努力となるようにトレッドミル後方に位置する電気刺激板で電気刺激を与えた。最大電気刺激においても 10 秒以上電気刺激板から動かなくなった時点をマウスが「最大努力」に至ったと定義して測定を終了した。呼気ガス分析ではトレッドミル装置が置かれた密閉容器へ定流量 (1 L/分) の空気で灌流し、空気中の酸素および二酸化炭素濃度を 10 秒毎に測定して分析を行った。持久能力の指標として走行時間と速度の積から走行距離を算出した。呼気ガス分析の指標として最大酸素摂取量 (peak VO_2)、さらに二酸化炭素産生量と酸素摂取量の比から呼吸交換比 (Respiratory exchange ratio, RER) を

求めた。垂直方向の仕事量を体重 × 重力加速度 × 垂直方向の走行距離にて算出した。

1. 2. 4 統計解析

統計処理は統計解析ソフトウェア Dr. SPSS II を用いて行った。各計測値は平均値 ± 標準誤差あるいは標準偏差で表した。2 群間の平均値の差の検定は student t テストを用いて行なった。アドロピンとの相関解析はスピアマンの順位検定によって行い、相関係数 (r) を算出した。危険率 0.05 未満を有意と判定した。

2. 研究結果

2. 1 患者背景

表 1 に心不全患者ならびに健常対照群の患者特性を示す。心不全患者の平均年齢は 51 ± 6 歳で健常群と同等であった。基礎心疾患は拡張型心筋症、虚血性心疾患、高血圧性心臓病がそれぞれ 6 名 (24%) と最も多かった。心エコー検査では心不全患者群で左室拡大 (LVEDD 61.6 ± 15 mm) と左室収縮能の低下 (LVEF 39.1 ± 14.2 %) を認めた。心不全患者では運動耐容能の指標である

表 1 患者背景

	全対象者	対照群	心不全群	P 値
対象者数	40	15	25	
年齢, 歳	54 ± 14	51 ± 6	56 ± 16	0.27
男性, n (%)	37 (92.5)	15 (100)	22 (88.0)	0.28
BMI, kg/m ²	23.8 ± 3.7	22.9 ± 3.0	24.3 ± 4.0	0.23
基礎心疾患, n (%)				
拡張型心筋症			6 (24.0)	
拡張相肥大型心筋症			2 (8.0)	
虚血性心疾患			6 (24.0)	
高血圧性心疾患			6 (24.0)	
弁膜疾患			5 (20.0)	
その他			5 (20.0)	
NYHA 分類 (I/II/III)			1/19/5	
既往歴, n (%)				
高血圧	13 (32.5)	1 (6.7)	12 (48.0)	0.01
糖尿病	5 (12.5)	0 (0.0)	5 (20.0)	0.13
脂質異常症	15 (37.5)	0 (0.0)	15 (60.0)	<0.01
心エコー所見				
LVEDD, mm	55.8 ± 14.1	46.1 ± 3.6	61.6 ± 15.0	<0.01
LVEF, %	47.1 ± 15.6	60.4 ± 5.6	39.1 ± 14.2	<0.01
血液生化学所見				
ヘモグロビン, g/dL	14.2 ± 1.5	15.3 ± 0.6	13.5 ± 1.5	<0.01
アルブミン, g/dL	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.4	0.12
クレアチニン, mg/dL	0.96 ± 0.28	0.80 ± 0.09	1.06 ± 0.31	<0.01
総コレステロール, mg/dL	187 ± 37	202 ± 9	176 ± 8	0.03
トリグリセリド, mg/dL	143 ± 149	138 ± 161	146 ± 144	0.86
HDL コレステロール, mg/dL	60 ± 19	66 ± 17	56 ± 20	0.13
LDL コレステロール, mg/dL	113 ± 29	124 ± 23	107 ± 31	0.06
空腹時血糖, mg/dL	104 ± 20	101 ± 10	106 ± 24	0.40
HbA1c, %	5.7 ± 0.6	5.4 ± 0.2	5.9 ± 0.7	<0.01
血漿 BNP, pg/mL	21.7 (7.9-192.2)	9.1 (7.3-11.0)	145.9 (6.8-281.5)	<0.01
血清アドロピン, ng/mL	1.51 ± 0.12	1.64 ± 0.07	1.44 ± 0.09	<0.01
CPX 所見				
Peak VO ₂ , mL/kg/min	23.3 ± 8.7	31.3 ± 5.8	17.8 ± 5.4	<0.01
AT, mL/kg/min	12.2 ± 4.0	15.6 ± 3.9	10.0 ± 2.0	<0.01
VE/VCO ₂ 比	30.9 ± 7.3	27.4 ± 4.2	33.4 ± 8.1	<0.01
Peak RER	1.21 ± 0.19	1.27 ± 0.08	1.17 ± 0.23	0.13

peak VO₂, AT は健常対照群より有意に低く, 息切れの重症度を示す換気応答 (VE/VCO₂ スロープ) は有意に高値であった. また, 心不全患者では高血圧, 脂質異常, 貧血, 腎機能障害の合併が健常対照群と比較して高率であり, 血漿 BNP 値は 146 pg/mL と健常群と高値であった.

血清アドロピン値は心不全患者で 1.44 ± 0.09 (ng/mL) と健常対照群 (1.64 ± 0.07, ng/mL) と比較して有意に低値であった.

2. 2 血清アドロピンと運動能力との相関

血清アドロピンと運動能力の各指標との相関を以下に示す. 血清アドロピンは運動耐容能の指標である peak VO₂ および AT と有意な正の相関を示した (r=0.65, 0.59). 一方で血清アドロピンは息切れの指標である VE/VCO₂ と有意な負の相関を示した (r=-0.61) (図 1).

2. 3 梗塞後心不全モデル動物における心機能

MI 群と Sham 群の代表的な心臓超音波画像を示す (図 2). MI 群では Sham 群と比較し左室拡張末期径 (LVEDD) の拡大と左室収縮能の低下を認めた. 小動物用トレッドミルの結果を次に示す (図 3). MI 群では Sham 群と比較し有意に運動時間, 運動距離, その結果として仕事量が低下しており, 運動能力の指標である peak VO₂ は低値であった. 一方, 両群でガス交換比に有意差を認めず, これらの運動能力の差は疲労負荷の違いによるものではないことが示された.

2. 4 骨格筋脂肪酸代謝とミトコンドリア呼吸能

Sham 群と MI 群からの骨格筋組織を用いたミトコンドリア呼吸能の代表的な図を示す (図 4). 脂肪酸の基質下での複合体 I (CI), 複合体 I+II (CI+II) と複合体 II (CII) に関連した酸化的リン酸化能 (OXPHOS) が Sham 群と比較して MI

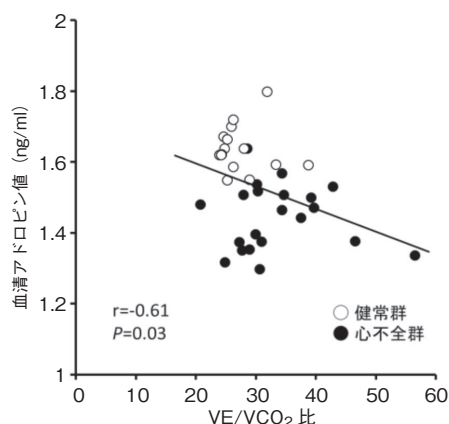
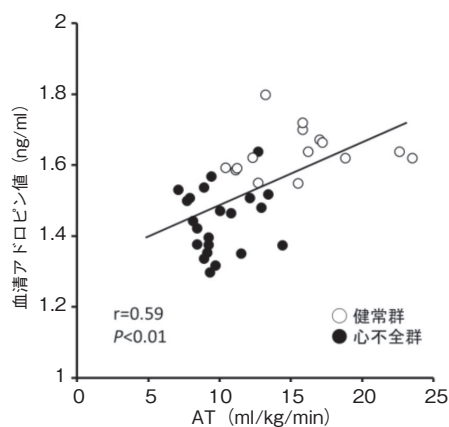
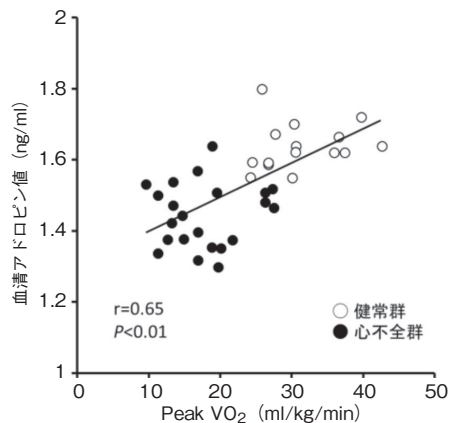


図 1 血清アドロピン値と各運動耐容能指標との関連

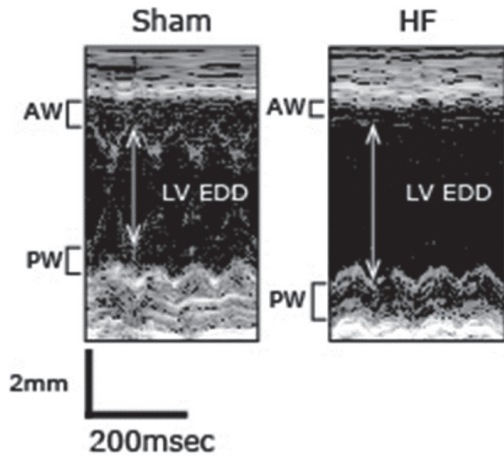


図2 心臓超音波検査画像

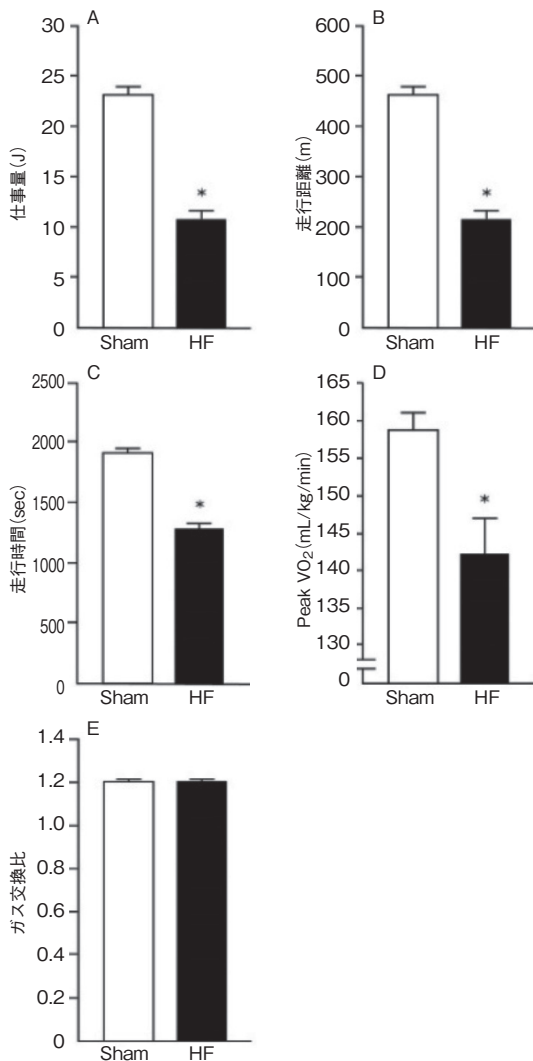


図3 実験動物の運動耐容能関連指標

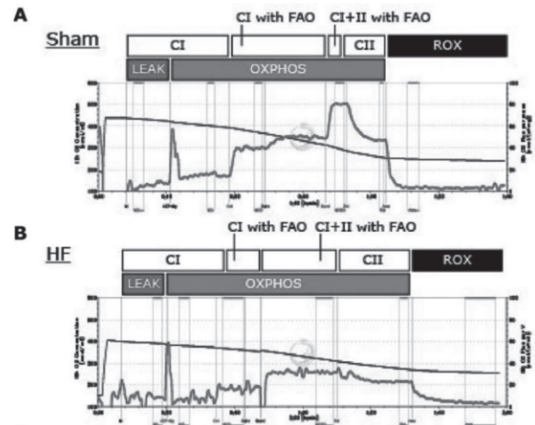


図4 高感度ミトコンドリア呼吸能検査代表図

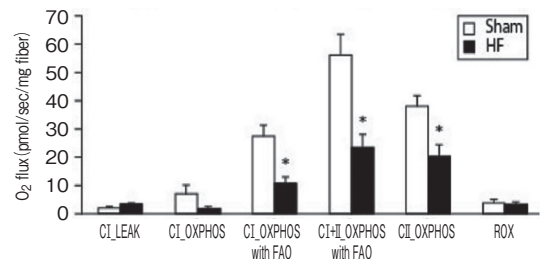


図5 各代謝基質下のミトコンドリア呼吸能

群で有意に低値であった (図5)。

3. 考察

本研究では、サルコペニアにおけるアドロピンの果たす役割を明らかにするために、サルコペニアを呈する代表疾患である心不全に着目し、臨床研究と動物実験の双方でアドロピンと運動能力、骨格筋エネルギー代謝との関連を検討した。我々は心不全患者において健常者と比較し血中アドロピンが有意に低値であることを見出した。しかし、この結果は慢性心不全患者で血清アドロピン値が上昇し、重症度と相関する Lian らの報告と完全に異なっている⁸⁾。血中アドロピンは空腹と食後で値が変動し、運動前後によっても影響を受けることから、血液採取前の絶食時間や採取前の運動の有無が研究間で異なっていた可能性が示唆される。興味深いことに我々は、血中アドロピンが運

動耐容能の指標である peak VO₂ や AT と有意な正の相関を示すことを初めて明らかにした。アドロピンは肝臓だけでなく骨格筋からの分泌されることが知られる。事実、藤江らは8週間の有酸素運動により血中のアドロピン値が増加することを報告した⁹⁾。したがってこれらの研究結果は、骨格筋におけるアドロピンの発現が直接的に骨格筋機能さらには運動耐容能を制御する可能性を示唆している。骨格筋におけるアドロピンの役割を明らかにするために、梗塞後心不全マウスを用いた検討を行った。梗塞後心不全マウスでは確かに偽手術群と比較し運動能力を示す各種指標が低下し骨格筋萎縮を呈した。またこれらの変化は骨格筋ミトコンドリア呼吸能の低下と関連していた。現在、骨格筋におけるアドロピンの発現と骨格筋ミトコンドリアのエネルギー代謝（呼吸能）ならびに運動能力との関連をさらに検討している。

4. 結 論

サルコペニアの代表疾患である心不全患者では血中のアドロピンが低下し、その量は運動耐容能と正に関連した。骨格筋におけるアドロピンは心不全患者のサルコペニア、運動耐容能低下の新たな制御因子であることを示唆している。今後、血中アドロピンを指標とした運動療法がサルコペニアの予防・治療に有効であるかどうか、さらなる検証が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を承りました石本記念デサントスポーツ科学振興財団に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Cruz-Jentoft, A.J., et al., Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People, *Age Ageing* **39**, 412-423(2010)
- 2) Toth, M.J., et al., Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function, *J. Appl. Physiol.*, **110**, 892-900(2011)
- 3) Fukushima, A., et al., (Pro) renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **307**, E503-514(2014)
- 4) Kadoguchi, T., et al., Angiotensin II can directly induce mitochondrial dysfunction, decrease oxidative fibre number and induce atrophy in mouse hindlimb skeletal muscle, *Exp. Physiol.*, **100**, 312-322(2015)
- 5) Kumar, K.G., et al., Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism, *Cell. Metab.*, **8**, 468-481(2008)
- 6) Gao, S., et al., Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance, *Molecular metabolism*, **4**, 310-324(2015)
- 7) Gao, S., et al., Regulation of substrate oxidation preferences in muscle by the peptide hormone adropin, *Diabetes*, **63**, 3242-3252(2014)
- 8) Lian, W., Gu, X., Qin, Y. & Zheng, X., Elevated plasma levels of adropin in heart failure patients, *Intern. Med.*, **50**, 1523-1527(2011)
- 9) Fujie, S., et al., Aerobic exercise training-induced changes in serum adropin level are associated with reduced arterial stiffness in middle-aged and older adults, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **309**, H1642-1647(2015)