

サルコペニアの予防・改善を目的とした筋力トレーニング の効果を事前に予知可能にする遺伝子多型の同定

東海大学 町田 修一
(共同研究者) 聖マリアンナ医科大学 黒坂 光寿

Identification of a Genetic Polymorphism that Can Predict the Effects of Resistance Exercise Training for the Prevention or Improvement of Sarcopenia

by

Shuichi Machida

*Department of Physical Recreation,
School of Physical Education, Tokai University*

Mitsutoshi Kurosaka

*Department of Physiology,
St. Marianna University School of Medicine*

ABSTRACT

It is well known that resistance exercise training is effective in preventing and improving age-related sarcopenia. This study aimed to clarify the relationship between the effects of resistance exercise training and genetic polymorphisms involved in muscle mass in elderly Japanese subjects in order to search for a genetic polymorphism that could be used to predict the effects of muscle training for the prevention or improvement of sarcopenia in advance.

The subjects were 14 elderly Japanese subjects (mean age: 70.3 years) with relatively low skeletal muscle mass. An intervention program consisting of six months of resistance exercise training was implemented and skeletal muscle mass prior to and

after muscle training was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), with the results forming an index for training effects. The relationship between the rate of change of skeletal muscle mass caused by muscle training and the genetic polymorphisms alpha-actinin 3 (ACTN3), the angiotensin converting enzyme (ACE) and the insulin-like growth factor 2 (IGF-2) involved in skeletal muscle mass were examined. Results revealed that a genetic polymorphism which could be used to predict the effects of muscle training in advance might exist. In the future, sample sizes need to be increased and more detailed investigations need to be conducted.

要 旨

加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）の予防改善には筋力トレーニングが有効であることはよく知られている。本研究では、サルコペニアの予防改善のための筋力トレーニングの効果を事前に予測できる遺伝子多型を探索するために、日本人高齢者を対象とした筋力トレーニングの効果と筋肉量に關与する遺伝子多型の關連性を明らかにすることを目的とした。

被験者は骨格筋量が相対的に低い14名の日本人高齢者（平均年齢70歳）であった。6ヶ月間の筋力トレーニングによる介入プログラムを実施し、トレーニング前後の骨格筋量をDXA法により測定し、トレーニング効果の指標とした。筋力トレーニングによる骨格筋量の増減率と骨格筋量に關与する α アクチニン3遺伝子(ACTN3)、アンジオテンシン変換酵素(ACE)およびインスリン様成長因子2(IGF-2)の遺伝子多型の關連性について検討した結果、筋力トレーニングの効果を事前に予測できる遺伝子多型が存在する可能性が考えられた。今後は、サンプル数を増やし詳細な検討が求められる。

緒 言

加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症（サルコ

ペニア）の発症機序の詳細については十分に解明されていない。サルコペニアはADL（日常生活動作）やQOL（生活の質）の低下に加えて、基礎代謝の低下から生活習慣病に罹りやすくなるおそれがある。そのため、加齢に伴うサルコペニア発症のメカニズムを解明し、その改善および予防のための対策を講じることは今後益々重要になると思われる。

サルコペニアの予防改善には筋力トレーニングが有効であることはよく知られている。しかしながら、トレーニングに対する骨格筋の応答には個体差がある。近年、ヒトのスポーツパフォーマンスや骨格筋量を規定する遺伝子が多数報告され、競技能力や運動トレーニングの効果に見られる個人差を説明する要因の一つとして遺伝子多型（ポリモルフィズム）が注目されている²⁾。サルコペニア発症に關連する遺伝子多型については、Walshら¹⁸⁾がアクチニン結合蛋白である α アクチニン3遺伝子(ACTN3)多型について報告している。また、若年者を対象として、アンジオテンシン変換酵素(ACE)やインスリン様成長因子2(IGF-2)等のいくつかの遺伝多型が骨格筋量、および筋力に対するトレーニング効果に關連するとして同定されている^{5,6,8,13)}。しかし、これまでの遺伝子多型の報告については、主に欧米人が対象であり、日本人を含むアジア人を対象とした研究は少ない。

国際 HapMap プロジェクト (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) により、遺伝子多型の頻度や遺伝子組み換え部位が人種で異なることが明らかになっており、遺伝子多型の影響が人種間で異なる可能性がある。また、これまでの先行研究では、1つの遺伝子多型について報告されているが、遺伝子多型が単独で骨格筋量を規定しているだけでなく、いくつかの遺伝子多型の相互作用や環境要因との交互作用により、高齢者の骨格筋量やトレーニング効果に影響を及ぼしていることが考慮される必要がある¹²⁾。そのため、サルコペニアの予防・改善を目的とした運動トレーニングの効果と遺伝子多型の関連性についての知見は、実際に日本人、特に骨格筋量が低い高齢者を対象として明らかにしていく必要がある。

そこで本研究では、サルコペニアの予防改善のための筋力トレーニングの効果を事前に予測できる遺伝子多型を探索するために、相対的に骨格筋量が低い日本人高齢者を対象とした筋力トレーニングの効果と筋肉量に關与する遺伝子多型の関連性を明らかにすることを目的とした。

1. 方法

1.1 被験者

被験者は健康上特に問題が認められない、自立可能な65歳以上の男性3名と女性11名の合計14名とした。被験者の特徴について表1に示した。被験者の参加条件として、非肥満者【体格指数 (BMI) が25 (kg/m²) 以下】で、骨格筋量が日本人高齢者 (年齢70-79歳) の平均値以下

表1 被験者の特性

被験者数	14名 (男性:3名,女性11名)
年齢 (歳)	70.3 ± 4.2
身長 (cm)	156.1 ± 7.8
体重 (kg)	53.2 ± 7.7
BMI (kg/m ²)	21.7 ± 1.8

平均値 ± 標準偏差

の者とした⁷⁾。被験者の骨格筋量は筋力トレーニングの前後で二重エネルギー X 線吸収測定法 (DXA) 法により測定された。本研究は、東海大学湘南キャンパスの倫理委員会の承認を得ており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行った (承認番号:11044)。被験者には口頭にて十分な説明を行った上で、書面にてインフォームドコンセントを得た。

1.2 筋力トレーニング

筋力トレーニングは、筋力トレーニングマシンを用いて、①レッグプレス、②レッグエクステンション、③レッグフレクション、④チェストプレス、⑤ラットプルダウン、⑥アドミナルクランチ、⑦バックエクステンションの7種目を、最終的には最大挙上重量 (1RM) の約70%の負荷で1セット8-10回を3セット、週3回を6ヶ月間行った。1RMの測定および負荷強度の見直しは4週間毎に行われ、トレーニング効果および適正なトレーニング量が確認された。

1.3 遺伝子多型の解析

DNAの抽出は、Colinら⁴⁾の方法に従って行った。具体的には、被験者から唾液を回収し、RNeasy Protect Saliva Mini (Qiagen社製)を用いて総DNAを抽出した。骨格筋量を規定する遺伝子多型として、 α アクチニン3遺伝子 (ACTN3)⁴⁾、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)¹⁾およびインスリン様成長因子2 (IGF-2)³⁾を検討した (表2)。各遺伝子多型については、上記先行研究の条件に基づき、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)法によりDNAを増幅し、適切な制限酵素によりDNAの断片化を試み、1%もしくは2%のアガロースゲルを用いて電気泳動法によりDNAを分離し、エチジウムブロマイドで染色し、UV照射によって特異的DNAバンドを検出した (図1)。

表2 遺伝子多型における PCR 条件と制限酵素

遺伝子多型	Forward Primer	Reverse Primer	アニーリング温度	制限酵素 / 酵素温度
ACTN3	5'-CTGGGCTGGAAGACAGGAG	5'-AGGGTGATGTAGGGATTGGTG	59.0°C	DdeI/37°C
ACE	5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT	5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC	56.0°C	なし
IGF-2	5'-CTTGGACTTTGAGTCAAATTGG	5'-CCTCCTTGGTCTTACTGGG	55.0°C	ApaI/25°C

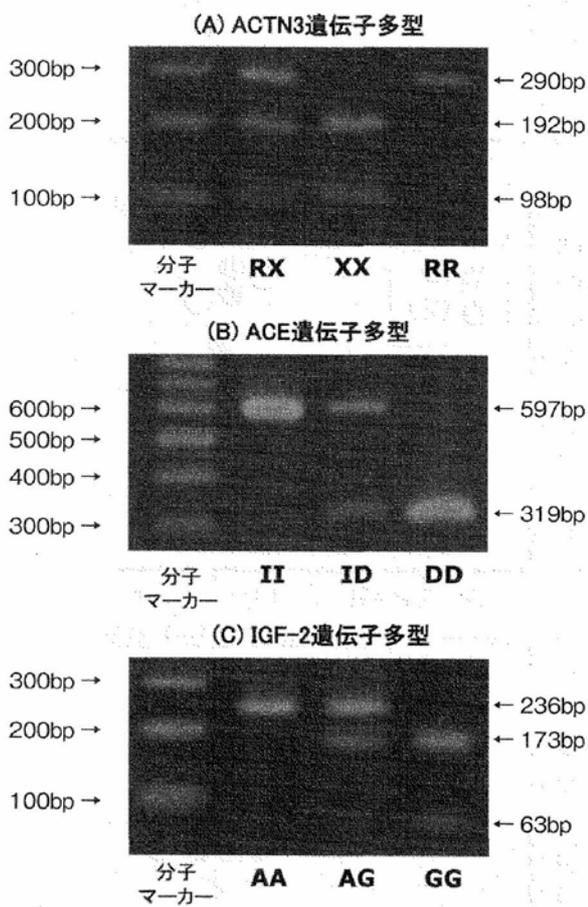


図1 ACTN3, ACEおよびIGF-2遺伝子多型の分離

2. 結果

ACTN3, ACE および IGF-2 遺伝子多型および対立遺伝子 (アリル) の頻度を図2と図3に示した。ACTN3 遺伝子多型は RR 型 5 名 (36%), RX 型 7 名 (50%) XX 型 2 名 (14%) であった。また, ACE 遺伝子多型は II 型 5 名 (36%), ID 型 7 名 (50%) DD 型 2 名 (14%) であった。さらに IGF-2 遺伝子多型は, AA 型 4 名 (29%), AG 型 7 名 (50%) GG 型 3 名 (21%) であった。

図4に6ヶ月間の筋力トレーニングによる骨格筋量の増減率と各遺伝子多型の分布について

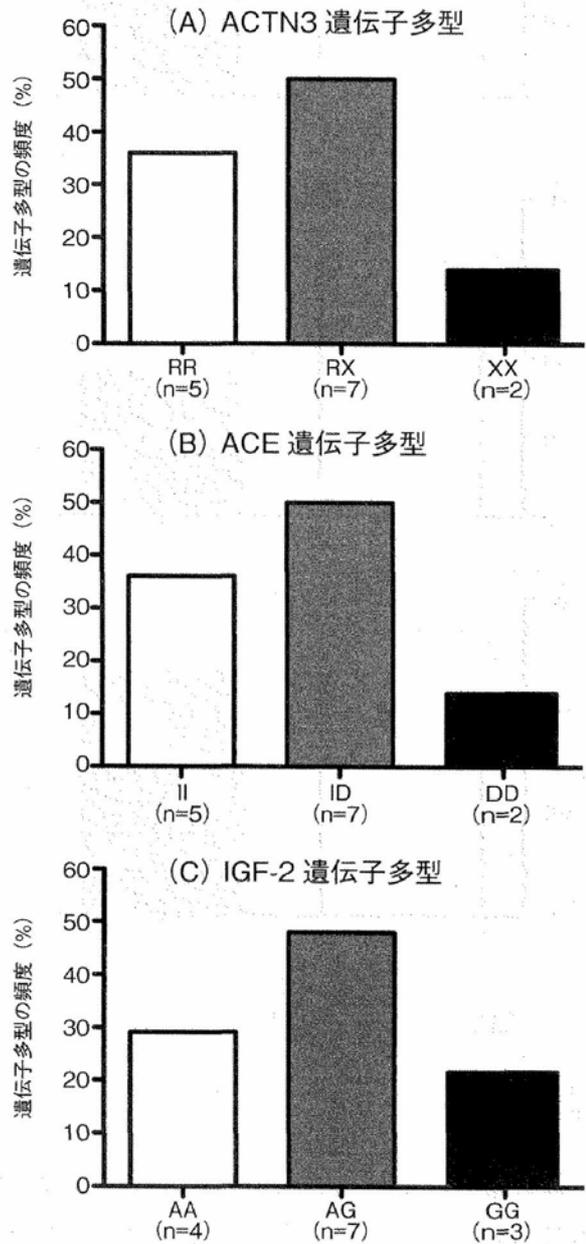


図2 ACTN3, ACEおよびIGF-2遺伝子多型の頻度 (A) ACTN3 遺伝子多型の頻度, (B) ACE 遺伝子多型の頻度, (C) IGF-2 遺伝子多型の頻度

示した。ACTN3 遺伝子多型の分布は, 骨格筋量が増加した群と増加が認められなかった群の間で類似していた。ACE 遺伝子多型では, 骨格筋量が増加した群では欠損型 (DD 型) が観察されたが, 増加が認められなかった群の間では, 欠

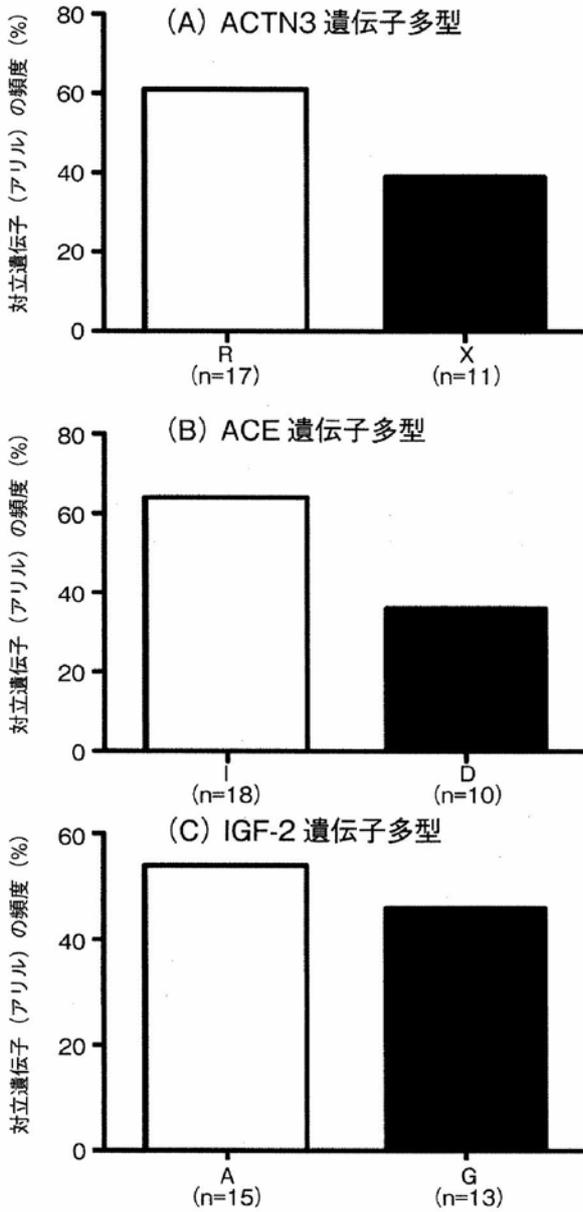


図3 ACTN3, ACEおよびIGF-2の対立遺伝子(アリル)の頻度

(A) ACTN3の対立遺伝子の頻度, (B) ACEの対立遺伝子の頻度, (C) IGF-2の対立遺伝子の頻度

損型は観察されなかった。同様に、IGF-2 遺伝子多型においても骨格筋量が増加した群では欠損型 (GG 型) が観察されたが、増加が認められなかった群では欠損型は観察されなかった。

3. 考 察

本研究では、相対的に骨格筋量の少ない日本人高齢者を対象に6ヶ月間の筋力トレーニングによる介入プログラムを実施し、そのトレーニング効果と骨格筋量を規定すると報告されている

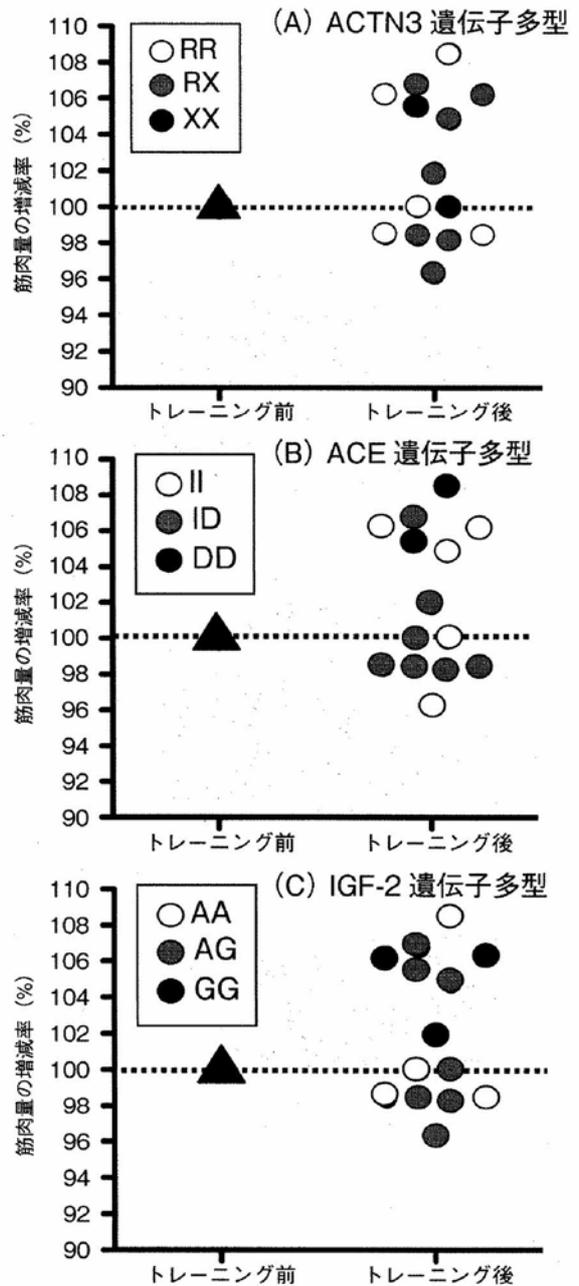


図4 筋力トレーニングによる骨格筋量の増減率と ACTN3, ACE および IGF-2 遺伝子多型の分布との関係 (A) ACTN3 遺伝子多型, (B) ACE 遺伝子多型, (C) IGF-2 遺伝子多型

遺伝子多型の関連性について検討した。その結果、筋力トレーニングの効果(筋量の増減)といくつかの遺伝子多型との間に関連性がある可能性が明らかとなった。

これまで、瞬発系/パワー系競技能力や骨格筋量に関連するいくつかの遺伝子多型が報告されている。その中でも ACTN3 遺伝子多型について多くの研究がなされている^{15, 18, 21, 22)}。Yang ら²¹⁾は、オーストラリアのトップアスリートおよび

び健康な一般白人の ACTN3 遺伝子多型を比較したところ、この多型は瞬発的運動能力に関連することを報告している。その他にも ACTN3 遺伝子多型と競技能力との関連については、いくつか検討がなされているが、これまでその多くが欧米人を対象としている。しかしながら、最近の研究では、ACTN3 遺伝子多型は、欧米人だけではなく、日本人の競技能力にも関連する可能性が示唆されている¹⁵⁾。さらに、ACTN3 遺伝子多型が中高齢者の骨格筋量と関連する可能性が示唆されている²²⁾。Walsh ら¹⁸⁾ は、約 60 歳の中高齢女性を対象に骨格筋量と ACTN3 遺伝子多型との関連を検討したところ、XX 型を有する人は RR 型を有する人と比較して全身の除脂肪体重や脚の除脂肪体重が有意に低いことを報告している。また、Zempo ら²²⁾ は、日本人の中高齢女性を対象として ACTN3 遺伝子多型と筋量の関係性を検討し、XX 型を有する人は RR 型もしくは RX 型を有する人と比較して大腿部筋横断面積が小さいことを示した。本研究では、介入前の時点で、相対的に骨格筋量の低い日本人高齢者を対象としており、ACTN3 遺伝子多型の頻度は、一般的に報告されているものと類似していた²²⁾。さらに、筋力トレーニングによって骨格筋量が増加した群と増加が認められなかった群において、R アリル（もしくは X アリル）を有する割合に違いはなかった。したがって、現時点においては、ACTN3 は骨格筋量や筋力に関連する可能性は高いと思われるが、ACTN3 遺伝子多型が骨格筋量の低い日本人高齢者の骨格筋量と関連性があるかどうかについては今後さらなる検討が必要であると思われる。

ACE は、アンギオテンシン I を活性型のアンギオテンシン II に変換する酵素であり、血管拡張など循環調節に重要な役割を果たしている。ヒト ACE 遺伝子は、第 17 染色体に存在し、287 塩基対の Alu エlement が挿入している野生型

(Insertion: I) または、欠損している D (Deletion) 型が存在している。ACE 遺伝子は、酸素供給なしに 8000m の登頂を行ったイギリス人の登山家における ACE 遺伝子多型が DD 型の発現頻度が認められず、II 型の発現頻度が高いことが報告されたことから、持久的能力と関連がある可能性が示唆されている^{10, 11, 19)}。最近の研究では、日本人トップレベルの陸上長距離選手の ACE 遺伝子が D アリルを有する者が II 型と比較して優れた成績を有していることが報告されている¹⁷⁾。したがって、ACE 遺伝子多型は、持久的能力に関連すること、また、日本人においても同様な関連性があることが推察される。一方で、ACE 遺伝子多型と筋力トレーニングに対する筋力や骨格筋量の応答も検討されている。60 歳以上の中高齢者において、ACE 遺伝子多型と筋力トレーニングに対する骨格筋量および筋力の応答性を検討した研究では、DD 型は II 型と比較して、運動トレーニングにより筋力が有意に向上するという結果が得られている⁶⁾。このことから ACE 遺伝子多型は、筋力のトレーニング効果に影響を及ぼしていると考えられるが、これまで骨格筋量に対するトレーニング効果と ACE 遺伝子多型との関連性は認められていないとされていた。しかしながら、興味深いことに、筋力トレーニングによって骨格筋量の増加が認められなかった群では、DD 型を有する者がいなかったことから、ACE 遺伝子多型は、筋力トレーニングにおける骨格筋量の増大と関連がある可能性が考えられた。

IGF は、骨格筋量の増加と密接に関わる因子として知られている。特に、IGF-1 については、多くの研究がなされその重要性が明らかとなっている。Kostek ら⁸⁾ は、52 歳から 83 歳までの 67 名の中高齢の男女を対象に 10 週間の脚の筋力トレーニングに対する骨格筋量の応答性と IGF-1 遺伝子プロモータのマイクロサテライト多型 (CA

リポート)との関連性を検討したところ, IGF-1 192 アレル (19 回の CA 繰り返し) を有する人が IGF-1 192 アレルを持たない人と比較して, トレーニング後の最大挙上重量や脚の骨格筋量が有意に増加したことを報告している. 近年, IGF-2 遺伝子多型についても骨格筋量との関連性が明らかにされている. Schragger ら¹⁶⁾ は, 50 歳代の男性及び女性の除脂肪量と IGF-2 遺伝子多型との関連性を検討したところ, 女性において AA 型が GG 型と比較して有意に低いことを明らかにしている. さらに, 女性の AA 型が GG 型と比較して脚のピークトルクが有意に低かったことも報告している. しかしながら, 男性においては, そのような関連性は観察されなかったと報告している. したがって, IGF-2 遺伝子多型は, 女性の筋量や筋力と密接に関連しているかもしれない. 興味深いことに, 筋力トレーニングによって骨格筋量の増加が認められなかった群では, GG 型を有する者がいなかったことから, IGF-2 遺伝子多型は, 筋力トレーニングにおける骨格筋量の増大と関連がある可能性が考えられた.

本研究では, サルコペニア候補遺伝子として, ACTN3, ACE および IGF-2 遺伝子多型の頻度および筋力トレーニングの効果との関連性を検討した. 今後は, 被験者数を多くし, 他の遺伝子領域に骨格筋量に関連する重要な多型が存在する可能性もあることから, ゲノムワイド関連解析 GWAS のような全ゲノム領域を対象とした遺伝子多型の網羅的解析が必要であると思われる^{9, 20)}. それら遺伝子多型の機能解析を行い, 遺伝子多型に基づいたサルコペニア予防・改善のための介入方法を確立していくことが求められる.

4. まとめ

本研究では, 日本人高齢者を対象として 6 ヶ月間の筋力トレーニングによる介入プログラムを実施し, そのトレーニングの効果と骨格筋量を

規定するとされている遺伝子多型の関連性について検討した. 今後は, 被験者数を多くし, 骨格筋における当該の候補遺伝子の機能について解明し, 日本人サルコペニア予防や改善のための方法の確立に繋げていきたいと考えている.

謝 辞

本研究課題に対して, 多大な助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます. また, 遺伝子多型の解析に多大な時間と労力を惜しみなく費やしてくれた東海大学大学院体育学研究科大学院生の位高駿夫君と東海大学体育学部生涯スポーツ学科卒業生の佐野友香さんに心から感謝申し上げます.

文 献

- 1) Amir O., Amir R., Yamin C., Attias E., Eynon N., Sagiv M., Sagiv M., Meckel Y., The ACE deletion allele is associated with Israeli elite endurance athletes. *Exp. Physiol.*, 92, 881-886(2007)
- 2) Bray M.S., Hagberg J.M., Pérusse L., Rankinen T., Roth S.M., Wolfarth B., Bouchard C., The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 41, 35-73(2009)
- 3) Chen J., Fang Q., Chen B., Zhou Y., Luo Y., Study on the imprinting status of Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) gene in villus during 6-20 gestational weeks. *Obstet. Gynecol. Int.*, 965905(2010)
- 4) Colin N. Moran, Nan Yang, Mark E.S. Bailey, Athanasios Tsiokanos, Athanasios Jamurtas, Daniel G MacArthur, Kathryn North, Yannis P Pitsiladis and Richard H Wilson. Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. *European Journal of Human Genetics*, 15, 88-93(2007)
- 5) Fuku N., Mori S., Murakami H., Gando Y., Zhou H., Ito H., Tanaka M., Miyachi M., Association of 29C>T polymorphism in the transforming growth factor- β 1 gene with lean body mass in community-

- dwelling Japanese population. *Geriatr. Gerontol. Int.*, **12**, 292-297 (2012)
- 6) Giaccaglia V., Nicklas B., Kritchevsky S., Mychalecky J., Messier S., Bleecker E., Pahor M., Interaction between angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype and exercise training on knee extensor strength in older individuals. *Int. J. Sports Med.*, **29**, 40-44 (2008)
 - 7) 国立長寿医療センター研究所・疫学研究部 Monograph-The Fourth Wave (June, 2004-May, 2005) (<http://www.nils.go.jp/department/ep/monograph4th/monograph4th.htm>)
 - 8) Kostek M.C., Delmonico M.J., Reichel J.B., Roth S.M., Douglass L., Ferrell R.E., Hurley B.F., Muscle strength response to strength training is influenced by insulin-like growth factor 1 genotype in older adults. *J. Appl. Physiol.*, **98**, 2147-2154 (2005)
 - 9) Liu X.G., Tan L.J., Lei S.F., Liu Y.J., Shen H., Wang L., Yan H., Guo Y.F., Xiong D.H., Chen X.D., Pan F., Yang T.L., Zhang Y.P., Guo Y., Tang N.L., Zhu X.Z., Deng H.Y., Levy S., Recker R.R., Papiasian C.J., Deng H.W., Genome-wide association and replication studies identified TRHR as an important gene for lean body mass. *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 418-423 (2009)
 - 10) Montgomery H.E., Marshall R., Hemingway H., Myerson S., Clarkson P., Dollery C., Hayward M., Holliman D.E., Jubbs M., World M., Thomas E.L., Brynes A.E., Saeed N., Barnard M., Bell J.D., Prasad K., Rayson M., Talmud P.J., Humphries S.E., Human gene for physical performance. *Nature*, **393**, 221-222 (1998)
 - 11) Myerson S., Hemingway H., Budget R., Martin J., Humphries S., Montgomery H., Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *J. Appl. Physiol.*, **87**, 1313-1316 (1998)
 - 12) Ostrander E.A., Huson H.J., Ostrander G.K.: Genetics of athletic performance. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **10**, 407-429 (2009)
 - 13) Riechman S.E., Balasekaran G., Roth S.M., Ferrell R.E., Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *J. Appl. Physiol.*, **97**, 2214-2219 (2004)
 - 14) Roth S.M., Zmuda J.M., Cauley J.A., Shea P.R., Ferrell R.E., Vitamin D receptor genotype is associated with fat-free mass and sarcopenia in elderly men. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, 10-15 (2004)
 - 15) 齋藤太一, 福典之, 三上恵里, 川原貴, 田中宏暁, 樋口満, 田中雅嗣. ACTN3 遺伝子の R577X ナンセンスアレルはエリートレベルの日本人中長距離走選手において頻度が低い. *体力科学*, **60**, 443-451 (2011)
 - 16) Schrage M.A., Roth S.M., Ferrell R.E., Metter E.J., Russek-Cohen E., Lynch N.A., Lindle R.S., Hurley B.F., Insulin-like growth factor-2 genotype, fat-free mass, and muscle performance across the adult life span. *J. Appl. Physiol.*, **97**, 2176-2183 (2004)
 - 17) Tobina T., Michishita R., Yamasawa F., Zhang B., Sasaki H., Tanaka H., Saku K., Kiyonaga A., Association between the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endurance running speed in Japanese runners. *J. Physiol. Sci.*, **60**, 325-330 (2010)
 - 18) Walsh S., Liu D., Metter E.J., Ferrucci L., Roth S.M., ACTN3 genotype is associated with muscle phenotypes in women across the adult age span. *J. Appl. Physiol.*, **105**, 1486-1491 (2008)
 - 19) Woods D., Hickman M., Jamshidi Y., Brull D., Vassiliou V., Jones A., Humphries S., Montgomery H., Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism. *Hum. Genet.*, **108**, 230-232 (2001)
 - 20) Wu C., Miao X., Huang L., Che X., Jiang G., Yu D., Yang X., Cao G., Hu Z., Zhou Y., Zuo C., Wang C., Zhang X., Zhou Y., Yu X., Dai W., Li Z., Shen H., Liu L., Chen Y., Zhang S., Wang X., Zhai K., Chang J., Liu Y., Sun M., Cao W., Gao J., Ma Y., Zheng X., Cheung S.T., Jia Y., Xu J., Tan W., Zhao P., Wu T., Wang C., Lin D., Genome-wide association study identifies five loci associated with susceptibility to pancreatic cancer in Chinese populations. *Nat. Genet.*, **44**, 62-66 (2011)
 - 21) Yang N., MacArthur D.G., Gulbin J.P., Hahn A.G., Beggs A.H., Eastel S., North K., ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 627-631 (2003)
 - 22) Zempo H., Tanabe K., Murakami H., Iemitsu M., Maeda S., Kuno S., ACTN3 polymorphism affects thigh muscle area. *Int. J. Sports Med.*, **31**, 138-142 (2010)