

肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットの骨格筋についての病態生理学的解析

2018 年

剣持佑介

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

略 語

cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid : 相補的デオキシリボ核酸)
CRP (C-reactive protein : C 反応性蛋白)
CT (Computed Tomography)
DXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometry : 二重エネルギーX 線吸収測定法)
EWGSOP (The European Working Group on Sarcopenia in Older People)
GA (Glutaraldehyde : グルタルアルデヒド)
GK (Goto-Kakizaki) ラット
GLUT (Glucose transporter)
HE (Hematoxylin eosin) 染色
IGF-1 (Insulin like growth factor 1)
IL (Interleukin)
IMCL (Intramyocellular lipid : 筋細胞内脂肪)
IRS (Insulin Receptor Substrate)
MnSOD (manganese-dependent superoxide dismutase)
mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1)
Murf-1 (muscle RING finger 1)
NADH-TR (nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase)
OLETF (Otsuka long-evans tokushima fatty) ラット
PB (Phosphate buffer : リン酸緩衝液)
PFA (Paraformaldehyde : パラホルムアルデヒド)
PCR (Polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)
QOL (Quality of life)
RNA (Ribonucleic acid : リボ核酸)
PAT (Perilipin-Adipophilin-TIP)
ROS (Reactive oxygen species : 活性酸素種)
SD (Sprague-Dawley) ラット
SDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty ラット
TC (Total cholesterol : 総コレステロール)
TG (Triglyceride : トリグリセリド)
TNF (Tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) - α
ZDF (Zucker diabetic fatty) ラット
ZF (Zucker fatty) ラット

目 次

第1章 緒 論	4
第2章 SDT fatty ラットの骨格筋についての病態生理学的解析	12
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第3章 総 括	59
謝辞	61
引用文献	62
SUMMARY	69

第1章 緒 論

超高齢化社会を迎えた日本において、65 歳以上の高齢者は総人口の 1/4 以上を占め、75 歳以上の後期高齢者の割合も 1/8 以上を占めるに至っている（図 1-1）。さらに 2050 年には後期高齢者の割合も 1/4 に到達することが予測されている。この人口の高齢化により日本の疾病構造が変化し、今までは注目されてこなかった疾病や病態が注目されてきている。高齢者の QOL を損なう大きな原因として注目されているのが、骨格筋量の減少に伴う筋力低下「サルコペニア」である。

サルコペニアとは、加齢により筋肉（sarco）が減少（penia）することを意味する造語で、加齢性筋肉減少症ともいわれる。30 歳台から骨格筋量は年に約 1%の割合で減少し始め、それが 50 歳から 60 歳では 1.5～2%、それ以降では 3%の割合で減少率が加齢性に高くなっていく（von Haehling et al., 2010）。筋量低下の有病率は、国・人種の違いや明確なクライテリアが定まっていないことなどから単純比較は難しいものの、米国では 60 歳以上の約 10%を占め、80 歳を超えるとそれがおよそ 50%に増加するといわれる（Morley, 2012）。日本では、地域住民を対象とした研究において、65 歳以上で 5.3%を占めると報告されている（下方と安藤, 2012）。全世界の患者数は現時点で 5000 万人以上と推定されており、2050 年には 2 億人を超えると予想されている（United Nations, 2013）。今後、後期高齢者人口が増えることによりサルコペニアを伴う人数はさらに増えることが予測される。サルコペニアは、認知症と並んで要介護の主要因のひとつである。超高齢社会では、医療の対象となる年齢層も上昇し、健康問題も生活習慣病だけではなく、寝たきり予防、健康寿命の延長、介護予防などの重要度が増してくる。高齢者のサルコペニアは転倒骨折やフレイル（体の予備力が低下し周囲環境に対して身体が脆弱となる状態）、さらには死亡のリスクが高くなると報告されている（Cawthon et al.,

2007)。サルコペニアを原因とする転倒骨折・フレイルによる寝たきり状態や要介護の高齢者が増えると、医療や介護における個人及び社会のコストも増加する。米国では、2000年におけるサルコペニアの直接的な費用は185億ドルで、これは医療費全体の1.5%にも相当するという (Janssen et al., 2004)。加齢性に進行するサルコペニアを10%減らすことができれば、約11億ドルもの医療費を削減することができると試算されている。したがって、超高齢社会においては医療経済の観点からもサルコペニアという加齢現象が無視できなくなっており、その対策は喫緊の課題と考えられる。そのような背景から、ここ10年でサルコペニアは研究対象として大きな注目を集めるようになり、関連する論文数は近年大幅に増加している (図1-2)。

加齢とともに筋力が低下し転びやすくなることは、以前よりよく知られた事実である。従来は、この事実は通常に加齢現象と捉えられ、特に大きな問題とは認識されていなかった。1989年にRosenbergがこの加齢性に骨格筋量の減少が起こる現象の重要性を主張し、「サルコペニア」という造語を提唱した (Rosenberg, 1989)。一般的に70歳までに20歳代に比較すると骨格筋面積は25~30%、筋力は30~40%減少し、50歳以降毎年1~2%程度筋肉量は減少するといわれている (葛谷, 2015)。70歳以降はその減少率が加速する (Kim and Choi., 2013)。加齢現象として骨格筋量の減少は誰でも起こるが、極端に筋肉量が減少し、筋力が低下するとサルコペニアと診断される。サルコペニアは多くの因子を背景に進行する複雑な病態の症候群である (Ali and Garcia., 2014)。主な成因として、栄養不足、筋タンパク質同化低下、筋衛星細胞の減少、酸化ストレス、炎症、ホルモン量低下、筋肉血流低下、などが報告されているが (Pani et al., 2016) (表1-1)、どの要因がサルコペニアに主に寄与しているのかは十分に解明されていない。また、サルコペニアの治療としては現在のところ運動療法や食事療法などが介入法として用いられているが、満足な有効性が認められる治療法は存在しない。

2010年の欧州関連学会ワーキンググループ (EWGSOP) で、サルコペニアは加齢以外

の要因のない場合は原発性サルコペニア、廃用、疾病、低栄養などの明らかな要因がある二次性サルコペニアに分類された (Cruz-Jentoft et al., 2010) (表 1-2)。近年、手術後を含む安静によるサルコペニアや、各種疾病に伴う二次性サルコペニアに注目が集まっている。基礎疾患に付随した筋肉量減少を伴う二次性サルコペニアでは、加齢以上に筋肉量の減少が認められ、さらに筋肉量の低下そのものが原疾患の増悪を引き起こすといわれる。ひとつとして、糖尿病患者は、サルコペニアをおこしやすいことが知られる。骨格筋は、グルコース消費の 7 割以上を担う組織であり、骨格筋におけるインスリン抵抗性は 2 型糖尿病や脂質代謝異常の増悪要因となる。また、加齢と肥満の合併はサルコペニアを増悪させることなどが報告されている。しかしながら、それらのメカニズムについては多くの因子が複雑に存在していることなどから未解明な部分が多い (図 1-3)。

サルコペニア研究において、適切な動物モデルが少ないことが、病態の解明を難しくしている。加齢性の筋萎縮の自然発生モデルは発症まで期間を要することから特に薬剤開発のために使用するの是一般的とはいえない。例えば、正常ラットであれば 20 カ月以上の飼育期間が必要であり (Cleasby et al., 2016)、研究に多くの時間を要する。さらに正常ラットでは加齢に伴い悪性腫瘍を初めとする多くの自然発生病変を併発しデータ解析上のノイズが増えてしまうため、研究のハードルがより高くなると考えられる。そこで近年では、老化促進マウスとして SAMP8 マウス、ミトコンドリア Polg DNA ポリメラーゼ D257A 変異マウス、Klotho 変異マウス及び Zmpste24 (亜鉛メタロプロテアーゼ) ノックアウトマウスなどのモデル動物が作出されてきているものの (葛谷, 2014)、いまだ決定的なサルコペニアのモデルは存在しないといわれている。そのような中で、糖尿病や肥満など生活習慣病に関連するサルコペニアは、加齢性のサルコペニアと共通の成因を持つと考えられることから (Sugimoto, 2014)、これらの病態モデルの研究を通じて、その病態に関連したサルコペニアのみならず加齢性のサルコペニアの

メカニズムの解明が進むことが期待されている。糖尿病モデルを用いた骨格筋の研究は、STZ による薬剤誘発性の 1 型糖尿病や GK ラットや ZF ラットなど自然発生性 2 型糖尿病モデル、ob/ob マウスなどの肥満遺伝子を導入した肥満 2 型糖尿病モデルを用いた研究の報告があるものの (Aughstee et al., 2006; Kemp et al., 2009; Sitnick et al., 2009)、近年のサルコペニアへの注目が高まる中で、包括的に糖尿病モデル動物の骨格筋の病態を研究した報告は限定的である。

SDT fatty ラットは、ZF ラットの肥満遺伝子であるレプチン受容体変異を非肥満 2 型糖尿病モデル SDT ラットの遺伝的背景に導入した肥満 2 型糖尿病モデルである (Masuyama et al., 2005) (図 1-4)。離乳直後より過食、肥満を示し、6 週齢前後の早期より高血糖を呈して 12 週齢以降で顕著な高血糖 (血中グルコース濃度約 800 mg/dl) が持続する (Matsui et al., 2008)。早期かつ重篤な糖脂質代謝異常に伴い、SDT fatty ラットでは腎臓や神経における合併症を併発する (Katsuda et al., 2014; Kemmochi et al., 2013; Maekawa et al., 2017)。しかしながら、現在まで SDT fatty ラットの骨格筋の病態についての報告はない。

本博士論文では、肥満 2 型糖尿病モデルである SDT fatty ラットの骨格筋を病態生理学的に解析し、糖脂質代謝異常に関連した骨格筋の病態及び糖尿病に関連したサルコペニアモデルとしての有用性を検討した。

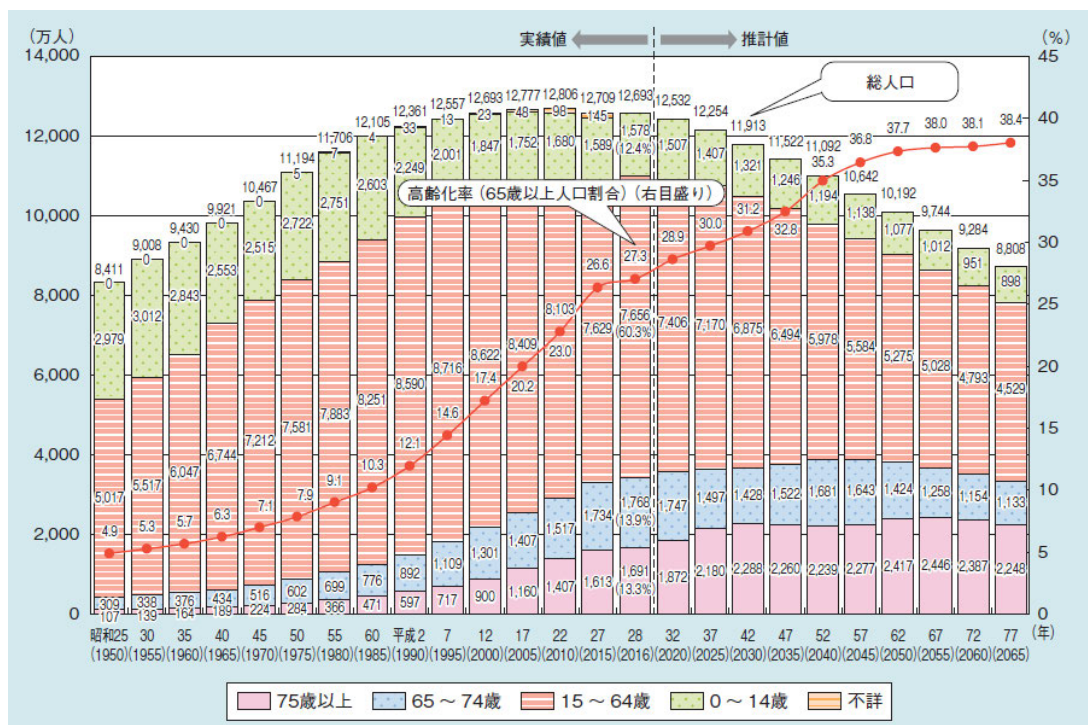


図 1-1 日本における高齢化の推移と将来予測（内閣府平成 29 年版高齢社会白書より引用）

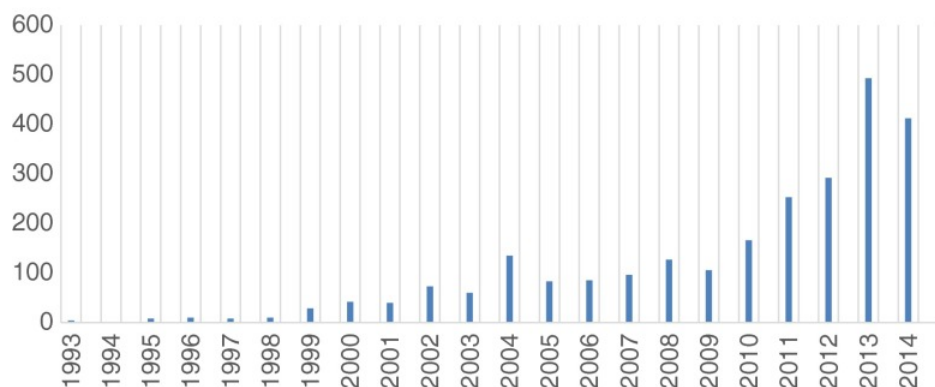


図 1-2 PubMed におけるサルコペニア関連の論文数（1993～2014）

この 10 年でサルコペニアに関する研究論文数が急激に増えている（Morley et al., 2014 より引用）。

表 1-1 サルコペニアの成因候補（葛谷，2015 より引用）

身体活動度の低下
栄養（たんぱく質）不足
筋たんぱく質同化抵抗性
骨格筋幹細胞（衛星細胞）の減少・活性化不全
神経・筋接合不全
酸化ストレス
炎症（TNF- α ，IL-6 \uparrow ）
ホルモン（GH，IGF-1，DHEA） \downarrow
インスリン抵抗性
ミトコンドリア機能低下
apoptosis
ビタミンD \downarrow ，副甲状腺ホルモン \uparrow
筋肉血流 \downarrow
未知の液性因子

表 1-2 EWGSOP によるサルコペニアの分類

原発性サルコペニア		
年齢が関与したサルコペニア	年齢以外明らかな原因なし	
二次性サルコペニア		
活動量に関連したサルコペニア	ベッド上安静，不活発な生活習慣 体調不良，無重力状態	
疾病が関与するサルコペニア	進行した臓器不全（心臓，肺，肝臓，腎臓，脳） 炎症性疾患，悪性腫瘍，内分泌疾患	
栄養に関連するサルコペニア	摂食不良，吸収不良，食思不振	

原因が加齢性（原発性）か、それ以外（2 次性）かによりサルコペニアは大きく 2 つに分類されている（Cruz-Jentoft et al., 2010；葛谷，2016 より引用）。

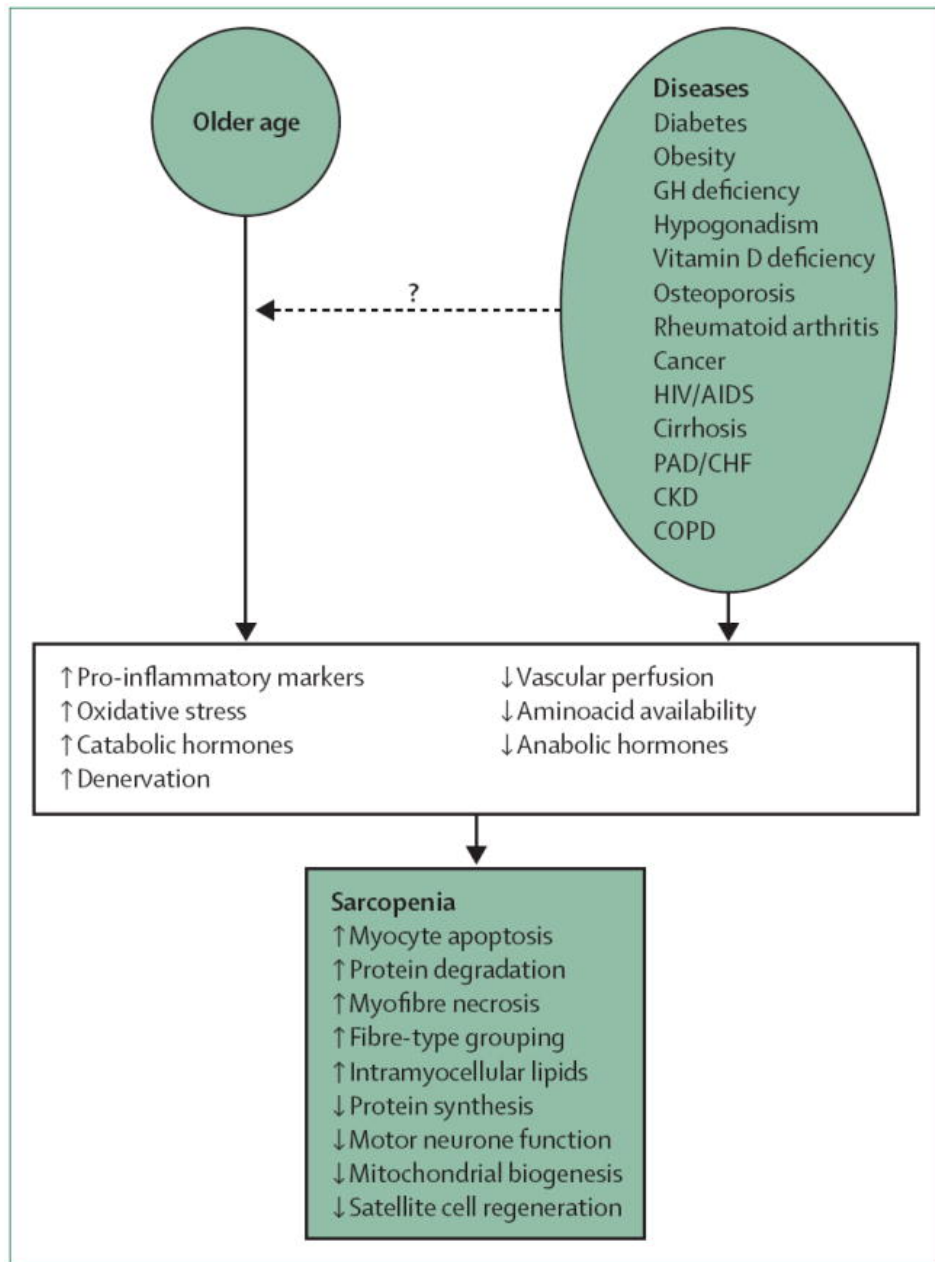


図 1-3 加齢によるサルコペニアに影響を与える疾病と想定メカニズム

加齢及び疾患に関連したサルコペニアは共通のメカニズムが想定されるが、疾患が加齢性変化にどのように影響するかの詳細は不明点が多い (Kalyani et al., 2014 より引用)。

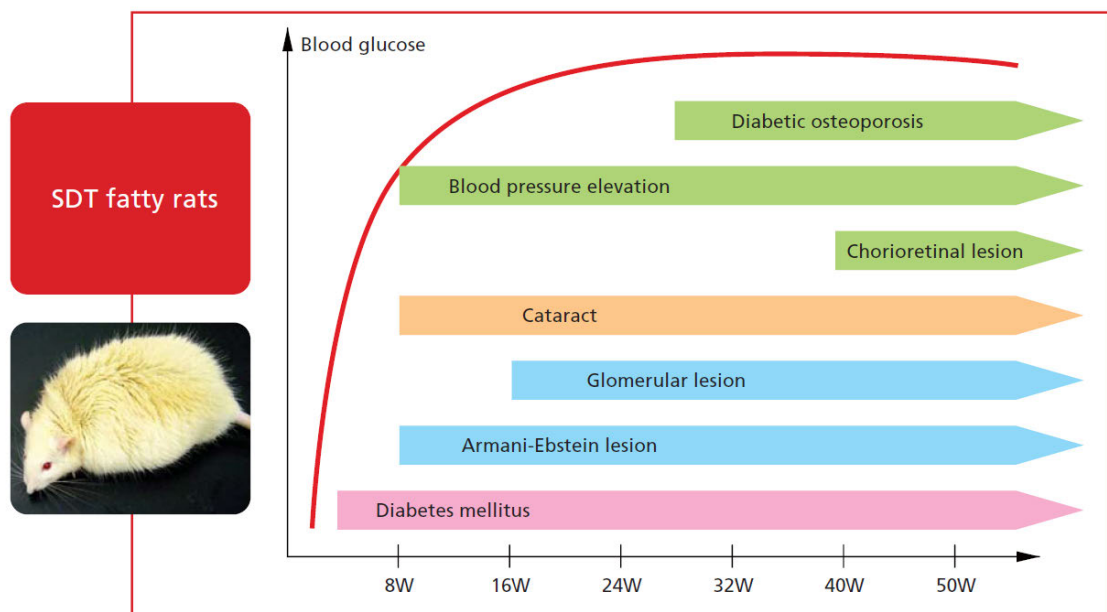


図 1-4 SDT fatty ラットの特徵

SDT fatty ラットは若週齡より自然發生性に糖尿病を發症し、さまざまな糖尿病合併症が短期間で認められる肥満 2 型糖尿病モデルである（日本クレア HP より）。

第2章 SBT fatty ラットの骨格筋についての病態生理学的解析

第1節 緒 言

サルコペニアは1989年にRosenbergにより名づけられた造語であり、加齢による骨格筋量の減少を意味する（Rosenberg, 1989）。しかし、加齢以外の要因により筋萎縮を伴う場合にもこの用語が使用されるケースが増えてきており、明確な定義が求められていたが、2010年にEWGSOPが加齢によるサルコペニアを原発性と呼び、それ以外の要因によるサルコペニアを2次性サルコペニアとして区別した（Cruz-Jentoft et al., 2010）。二次性サルコペニアには、不使用によるもの、何らかの疾病によるもの（悪性腫瘍、代謝異常、臓器不全など）、栄養障害によるものに細分化される。

サルコペニアの研究、特に原発性サルコペニアの研究で難しいのは、筋肉の萎縮や機能の低下が加齢現象の過程で出現することである。ヒトにおけるサルコペニアは30年以上かけて徐々に進行する。正常の動物を使用して実験を行う場合、げっ歯類で約2年、霊長類では20年以上の観察が必要となり、研究期間は長くなる。また、高齢動物が必ずしもヒトのサルコペニアの表現型を示さないという問題もある。高齢ラットの場合、筋萎縮が認められる前に悪性腫瘍などで死亡してしまうことも多い。そのため、加齢した正常動物の替わりに、老化促進マウスや遺伝子操作マウスなどさまざまなモデルが作出されてきているものの、いまのところ決定的な動物モデルは存在しないといわれる（葛谷, 2014）。

そのような中で、糖尿病、肥満、高血圧などの生活習慣病のモデル動物がサルコペニア研究に応用できると提唱する報告がある（Sugimoto, 2014）。糖尿病や肥満に関するサルコペニアは、EWGSOPの定義上は2次性サルコペニアに分類されるが、インスリン抵抗性を主としてその成因は原発性サルコペニアと共通している部分がある。そもそも加齢によるサ

サルコペニアの原因が十分には解明されているわけではなく、二次性の要因が複数関与して起こっている可能性も否定できない。サルコペニアの主要因として、加齢に伴う身体活動の低下、栄養常態の悪化、内分泌系の変化、などさまざまな因子が複合的に関与しているといわれる（図 2-1）。それらにより、筋タンパクの合成系と分解系の不均衡が誘導され筋萎縮が生じるが、同時に筋代謝能の低下、ミトコンドリア機能の低下、低レベルの慢性炎症なども筋量低下や筋力低下に関与すると考えられている。これらには肥満や糖尿病といった生活習慣病によって修飾される因子も含まれており、各種疾患がサルコペニアの発症を早め、また進行を速くすると考えられる（図 2-2）。実際に、糖尿病患者では筋量の減少や筋力の低下を起こしやすいことが知られ、糖尿病モデル動物においても、骨格筋に萎縮性の変化が認められることが報告されている。したがって、糖尿病に関連したサルコペニアを研究することで、原疾患と筋萎縮との関連のみならず、加齢による筋萎縮についても解明が深まることが期待される。

本研究では、肥満 2 型糖尿病モデルの SDT fatty ラットを用いて、骨格筋の病態生理学的解析を実施した。

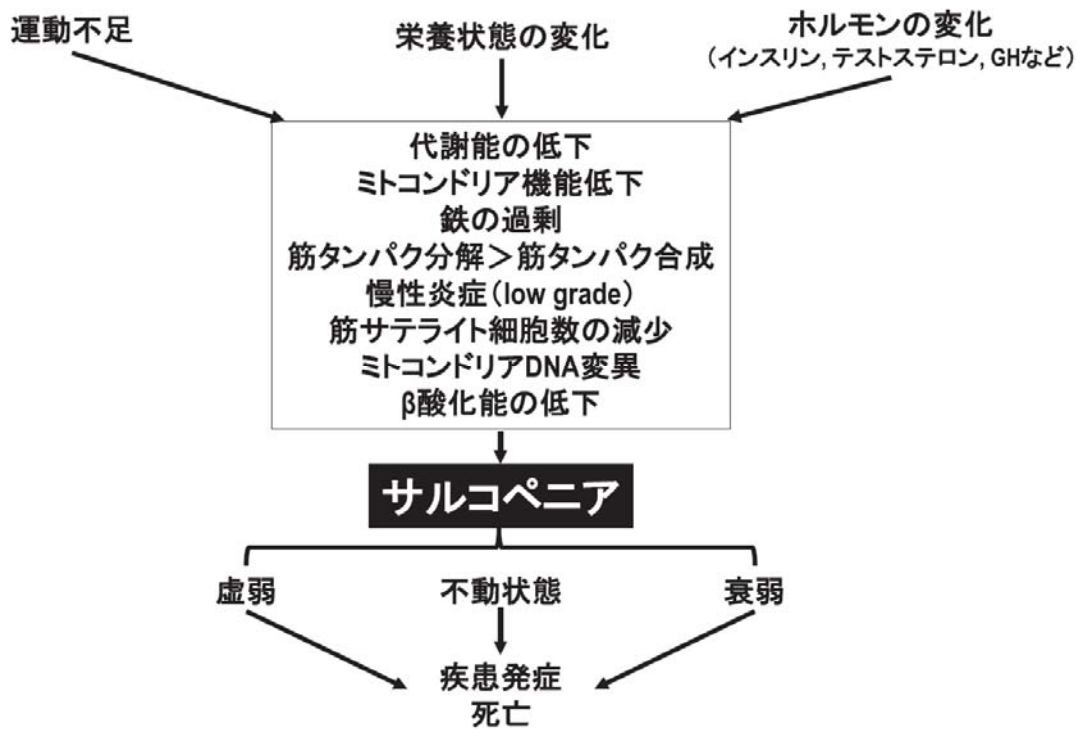


図 2-1 サルコペニアの成因と病態発症のメカニズム
(Arnold et al., 2011; 杉本, 2013 より引用)

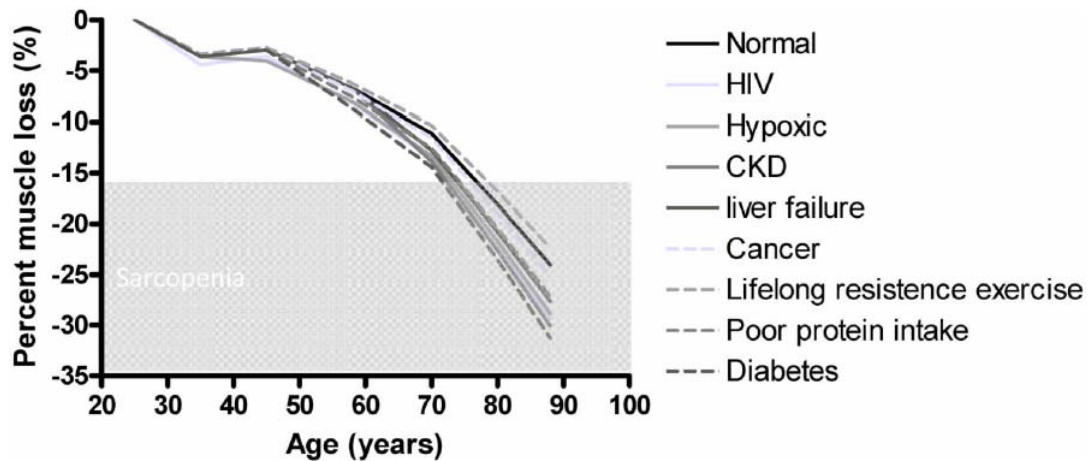


図 2-2 各種疾患による筋量の減少（サルコペニア）の進行・程度を増悪
健常人（Normal）の筋量と比較した場合の各疾患によるサルコペニアの進行の程度は、HIV：22%増加、低酸素状態：20%増加、慢性腎臓病 25%増加、肝臓疾患：15%増加、低タンパク摂取：13%増加、糖尿病：30%増加であり、一方で運動を続けた場合は 7%低下（サルコペニアの進行を抑制）する（Buford et al., 2010 より引用）。

第2節 材料および方法

動物

実験には雄性 SDT fatty ラットを用いた。正常対照として SD ラットを用いた。動物は CLEA Japan より購入した。動物数は SDT fatty ラットが計 30 匹 (n=6/群/週齢)、SD ラットが計 25 匹 (n=5/群/週齢) で、8、16、24、32 及び 40 週齢において、各群を解剖した。ここで SD ラットの正常対照としての妥当性を下記に述べる。SD 系ラットの中で多飲、多食、多尿、尿糖を呈する個体から系統確立されたのが SDT ラットで、さらに SDT ラットの遺伝的背景に肥満遺伝子 (レプチン受容体変異 $Lepr^{fa}$) を導入したのが SDT fatty ラットとなる。したがって、SDT fatty ラットの正常対照として SD ラットを使用することは妥当であると考えられる。過去の SDT fatty ラットの報告においても、SD ラットは正常対照動物として使用されている (Maekawa et al., 2017)。動物は個別飼育により紫外線照射された水道水及び通常飼料 (CRF-1 ; 日本チャールズリーバー) を自由摂取させ、12 時間の明暗周期 (明期 : 8~20 時、暗期 : 20~8 時)、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。本試験の動物実験計画は、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所内の動物実験ガイドラインに準拠しており、動物実験倫理委員会の承認を得た。

体重及び血液生化学的パラメータ

SDT fatty ラットの体重及び血液生化学的パラメータを 8 週齢から 40 週齢まで 4 週間隔で測定した。測定は各週齢群 (n=5-6) の動物を対象とした。血液生化学パラメータは、血清グルコース、血清 TG、血清 TC、血清インスリン、血漿 IGF-1 濃度について測定した。採血は、非絶食下の動物の尾静脈から行った。血清グルコース、血清 TG、血清 TC 濃度測定は commercial kits (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用

いて自動分析装置（Hitachi 7180；日立製作所）で実施した。血清インスリン濃度測定には、rat insulin ELISA kit（Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan）を使用した。血漿中 IGF-1 濃度測定には、rat insulin ELISA kit Quantikine® ELISA（Mouse/Rat IGF-I: Bio-Techne Ltd., UK）を使用した。

骨格筋の採材、重量測定及び病理学的検査

骨格筋を、8、16、24、32 及び 40 週齢の動物を解剖して採取した。動物にはイソフルランを吸引させて安楽殺した。解剖時、後肢からヒラメ筋（soleus）及び長趾伸筋（extensor digitorum longus）を採取して、重量を測定した。骨格筋は、代謝様式の違いによる特殊染色性の違いから大きく I 型筋と II 型筋に分類される（表 2-3）。ヒラメ筋はタイプ I 線維優勢筋（赤筋、遅筋）として、長趾伸筋はタイプ II 線維優勢筋（白筋、速筋）として選択した。これらの筋肉は、げっ歯類を用いた骨格筋の研究で I 及び II 型筋を代表する筋肉として多く報告されている。骨格筋は、病理学的検査のため液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結し、酵素組織化学染色に使用するまで-80℃で保存した。また HE 染色及び免疫組織化学的染色用に 4% PFA 固定、電子顕微鏡学的検査用に 1.25% GA 2% PFA 固定も実施した。さらに凍結骨格筋組織の一部を遺伝子発現解析のために用いた。

表 2-3 骨格筋の筋線維の分類（組織生化学的染色による分類）

（理学療法科学学会. 2011. 臨床運動学 第 6 版より引用）

		赤筋	中間	白筋
筋線維のタイプ		type I 遅筋 SO S	type IIa 速筋 FOG FR	type IIb 速筋 FG FF
特徴	局在	深部		表在
	毛細管	密	密	粗
	色調	赤	赤	白
	筋線維径	小	中間	大
	ミトコンドリア量	多	多	少
	ミオグロビン量	高	高	低
	グリコーゲン含有量	低	中間	高
	解糖系酵素活性	低	中間	高
	ATPの供給	酸化的リン酸化	酸化的リン酸化	解糖
	ミオシンATPase活性	低	高	高
	疲労	遅	中間	速
	収縮速度	遅	速	速
	筋張力	小	中間	大
	筋線維径	小	中	大

NADH-TR 酵素組織化学染色を用いた骨格筋の形態学的解析

骨格筋の凍結サンプルは NADH-TR assay に使用した。NADH-TR はミトコンドリアの酵素で、電子を可溶性テトラゾリウム塩へ移動し、不可溶のホルマザン物質に変換する。NADH-TR 反応により、筋線維内の基質が染色され、その染色性の違いにより簡易的な筋線維のタイプ分類が可能となる。タイプ分類のための組織標本は、骨格筋の横断面を用いて評価した。NADH-TR 染色では、ミトコンドリアやライソゾームが豊富な I 型筋の細胞質は暗調に、それら細胞内小器官に比較的乏しい II 型筋の細胞質は明調に染色される。II 型筋は酸化的代謝活性の程度で IIa 型と IIb 型に細分化され、IIa 型は I と II の中間的な性質を有し染色性も中間的である。本研究ではより代表的な II 型筋として IIb 線維について解析した。SDT fatty ラットの各筋線維タイプの横断面積（動物あたり 50 線維）を測定し、SD ラットと比較した。この形態計測解析のために、組織写真を

Cellsens standard imaging software (オリンパス) を用いて 400 倍で撮影し筋線維横断面積を測定した。

抗 Adipophilin 抗体を用いた免疫組織化学 (脂肪滴の同定)

IMCL を検出するために、脂肪膜タンパクのひとつである Adipophilin/Plin2 の免疫組織化学染色を実施した。一次抗体には、モルモットポリクローナル抗 Adipophilin/Plin 2 抗体 (BP5012, Acris Antibodies Inc.) を使用した。パラフィン包埋ブロックから薄切した 4 μ m 厚の組織片を Hist VT One (10 倍希釈、pH 7.0) (Nacalai Tesque, Inc.) に浸漬し、抗原賦活化のため 170W で 10 分間 microwave を用いて加熱した。洗浄には 0.01M PBS を使用した。一次抗体は 1%BSA を含む 0.01M PBS で 100 倍希釈し、二次抗体には HRP 標識した Goat Anti-Guinea Pig IgG (Jackson ImmunoResearch, Inc.) を用いた。免疫反応は DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 処置により可視化した。陰性対照として PBS 希釈した 1% BSA を使用した。

透過型電子顕微鏡による骨格筋の超微形態学的検査

骨格筋組織の超微形態観察のため、透過型電子顕微鏡による検査を実施した。1.25% GA 2% PFA 0.1M PB で前固定したヒラメ筋及び長趾伸筋を 2%オスミウム酸で後固定し、アルコール系列で脱水した後に Queto1 に包埋した。樹脂包埋標本から厚切標本を作製し、トルイジンブルー染色を実施し、超薄切片を作製するための部位を特定した。厚切標本及び薄切標本は筋線維の縦断面が得られるように作製した。超薄切片は酢酸ウラニル及び酢酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7700, 日立ハイテクノロジーズ) を用いて写真撮影し、超微形態観察を実施した。

リアルタイム定量 PCR による骨格筋の Murf-1 および Atrogin-1 の mRNA 発現量解析

Total RNA を抽出は GenElute™ Mammalian Total RNA キット (Sigma, USA) を用いて行った。MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) および Oligo(dT) (12-18) primer を添加した後、Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて cDNA を調製した。Real time PCR は、25 μ l reaction mixture を用いて ABI PRISM 7700 sequence Detector (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて行った (95°C で 10 分の後、95°C で 15 秒と 60°C で 60 秒を 40 サイクル) 25 度 10 分間、37 度 1 時間、及び 95°C で 5 分間)。反応液は、cDNA サンプル 100 ng、3.5 mM MgCl₂、0.3 μ M primer、0.1 μ M Fluorescent probe および 1.25 U AmpliTaq Gold (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を加えて調製した。遺伝子発現変動の解析に関して、Atrogin-1 (ID: Rn00590197_m1)、Murf-1 (ID: Rn00591730_m1) 及び β -actin (ID: 4352341E) の primer 及び probe は、Primer Express software (PE Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) を用いて設計した。内部標準には β -actin を用いた。

前肢握力測定 (筋力の検査)

前肢握力測定は実験動物の骨格筋の機能的評価 (筋力) のために一般的に使用される方法である (Meyer et al., 1979)。握力測定には、Grip Strength Meter (GPM-100B; Melquest, Toyama, Japan) を用いた。本検討は、主試験群とは別の動物 (SDT fatty ラット及び SD ラット、n=5-6/group/age) を用いて追加で測定を実施した。なお、動物福祉の観点から使用動物数を減らすために、測定する週齢を 8、24 および 40 週齢の 3 時点に絞った。

統計学的解析

各検査項目のパラメータは群の平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。統計学的解析は、

正常対照動物(SD ラット)と対照群(SDT fatty ラット)において、F 検定により等分散性の確認を行った後、等分散の場合は Student の t 検定により、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により実施した。P 値 <0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

第3節 結 果

体重及び生化学的パラメータ

SD ラットの体重は 40 週齢まで加齢に伴い増加した。一方 SDT fatty ラットの体重は 8 週齢で SD ラットと比較して+23%を示したが、16 週齢以降は SD ラットよりも低値で推移した（図 2-3）。SDT fatty ラットは離乳後から、過食による肥満を呈して体重が増加するが、今回の試験と同様に 16 週齢以降に正常対照よりも体重が低値になることが報告されており（Matsui et al., 2008）、それぞれインスリン分泌過剰と分泌不全に関連する変化と考えられている。本試験で 40 週齢の SDT fatty ラットの平均体重は SD ラットの約半分であった。SDT fatty ラットの血清グルコース、TG、TC レベルは 8 週齢時に有意に高値を示した（図 2-4、 2-5、 2-6）。血清インスリンレベルは 8 週齢で高値を示した後、16 週齢で急激に低下し以降低値で推移した（図 2-7）。血漿中 IGF-1 レベルは、16 週齢まで SD ラットと同等であったが、24 週齢から SD ラットと比較して有意に低値を示した（図 2-8）。IGF-1 値を経時的にみると、SD ラットでは 8 週齢以降ほぼ横ばいで推移するのに対し、SDT fatty ラットでは、8 から 24 週齢まで約 50%も低下し、40 週齢までではさらに約 75%低下した。なお、本研究では摂餌データは取得していないが、本ラットは離乳直後から過食により糖脂質代謝異常を誘導及び増悪するモデルであり、6 週齢で対照群に比較して約 2 倍の摂餌量を示し、それ以降 30 週齢を過ぎるまでその傾向が推移することが過去に報告されている（Matsui et al., 2008）。同様の傾向は本試験でも確認された。

骨格筋重量（筋量の評価）

SDT fatty ラットは、SD ラットに比較して、16 週齢から骨格筋重量（ヒラメ筋及び長趾伸筋）の低値を示した（図 2-9、2-10）。その傾向はヒラメ筋（I 型筋）より長趾伸

筋(II型筋)で顕著であった。16週齢のSDT fatty ラットの骨格筋重量は、対SD ラットで、ヒラメ筋で $-39.4\%/-29.7\%$ (絶対重量/体重あたりの相対重量)、長趾伸筋で $-57.5\%/-50.6\%$ であった。8週齢から40週齢までの骨格筋重量の増加率を両ラットで比較すると、SD ラットのヒラメ筋及び長趾伸筋ではいずれも1.9倍と倍増しているのに対し、SDT fatty ラットでは40週齢までほぼ横ばいであり、加齢による骨格筋の重量増加の程度が正常対照に比べて極めて低いことが明らかとなった。

骨格筋の病理組織検査及び筋線維横断面積の計測

骨格筋の病理組織検査においては、未固定凍結標本あるいはホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、それぞれ一般的な病理観察のためのHE染色、筋線維横断面積(cross sectional area of fibers)測定のためのミトコンドリア電子伝達系酵素NADH-TRについての酵素組織化学染色を実施した。8週齢時の両ラットの骨格筋には病理組織学的に大きな差は認められなかった。SDT fatty ラットの筋線維あたりの横断面積は16週齢から両筋肉とも正常対照より約30%も低下していた(ただし16週齢では有意差なし)。24週齢から両筋肉で統計学的に有意な筋線維面積の低値が認められた(図2-12、2-14)。ヒラメ筋(主としてI型線維から構成される)の8、16、24、32及び40週齢の平均筋線維横断面積は、対SD ラットで、それぞれ -8.9% 、 -30.0% 、 -29.4% 、 -15.2% 及び -37.2% であった。同様に、長趾伸筋(II型筋優位)のIIb型筋線維では、各週齢で -15.4% 、 -34.6% 、 -42.3% 、 -48.2% 及び -55.3% であり、一方で長趾伸筋のI型筋ではSD ラットと明らかな差は認められなかった。SD ラットは8週齢から40週齢まで加齢性に筋線維の面積が増加したのに対し、SDT fatty ラットは加齢に伴う筋線維面積の増加の程度が小さく、その程度はII型筋線維がI型筋線維に比べて大きかった。これは加齢性の筋萎縮が白筋優位に進行するという文献報告に一致していた。

IMCL の蓄積及びミトコンドリアの形態異常

HE 染色による病理組織標本の観察により、8 週齢以降の SDT fatty ラットのヒラメ筋及び長趾伸筋で筋線維細胞内の微小な空胞の増加が認められた。この空胞は各週齢の SD ラットでも認められたが、SDT fatty ラットではその数が増加していた。この空胞は、脂肪膜タンパク adipophilin についての免疫染色で陽性を示した (図 2-16)。したがって、筋線維細胞内の空胞は中性脂肪であることが明らかとなった。さらに、透過型電子顕微鏡による筋線維の縦断面の超微形態観察により、同空胞は低電子密度の均質な染色態度を示し (図 2-17)、電顕的にも脂肪滴であることが確認された。筋線維内脂肪滴は、特に筋原線維間に多く分布し、多くがミトコンドリアに隣接していた。一部のミトコンドリアでは、内部構造の崩壊した異常な形態を示すものも認められた (図 2-17)。

筋タンパク分解系の遺伝子発現解析

骨格筋蛋白の分解系の指標として、骨格筋内の Murf-1 及び Atrogin-1 の mRNA 量測定を実施した。筋重量及び病理解析で変化が比較的大きかった長趾伸筋を測定の対象とした。分解系の亢進が生じている場合には、両マーカーの遺伝子発現は正常対照に比較して増加していると予測された。しかしながら、いずれの週齢の SDT fatty ラットにおいても Murf-1 及び Atrogin-1 の mRNA 発現レベルの増加は認められなかった (図 2-18、2-19)。反対に、24 週齢の SDT fatty ラットにおける長趾伸筋の Murf-1 の mRNA レベルは、SD ラットに比較して低値を示した。

筋力測定 (前肢握力試験)

骨格筋の機能的解析として、8、24 及び 40 週齢の動物を用いて小動物用握力測定装置を用いた前肢筋力 (握力) 測定を実施した。8 週齢における SDT fatty ラットの平均前肢握力スコアは、SD ラット及び SDT fatty ラットで差は認められなかった。24 週齢

及び 40 週齢では、SDT fatty ラットの握力スコアが有意な低値を示した（図 2-20）。SD ラットに比較して 24 週齢では－32%、40 週齢では－38%であった。SDT fatty ラットは 24 及び 40 週齢において、正常対照に比較して筋力の低下を示すことが明らかとなった。

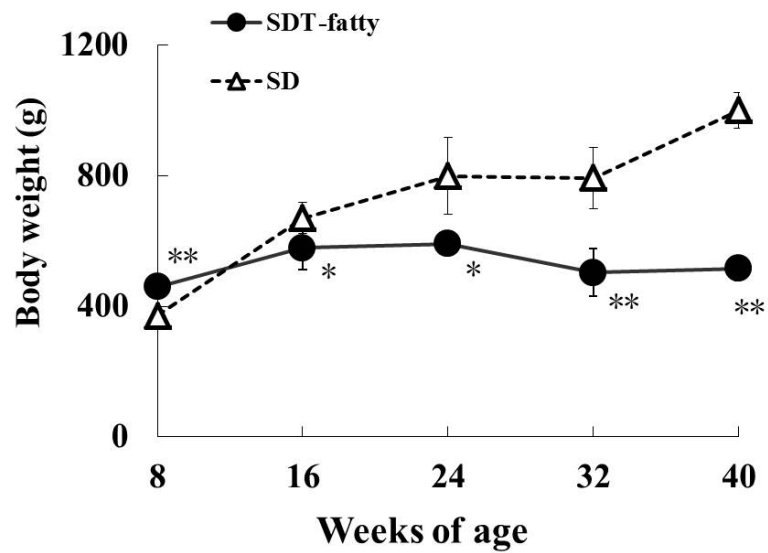


図 2-3 体重 (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

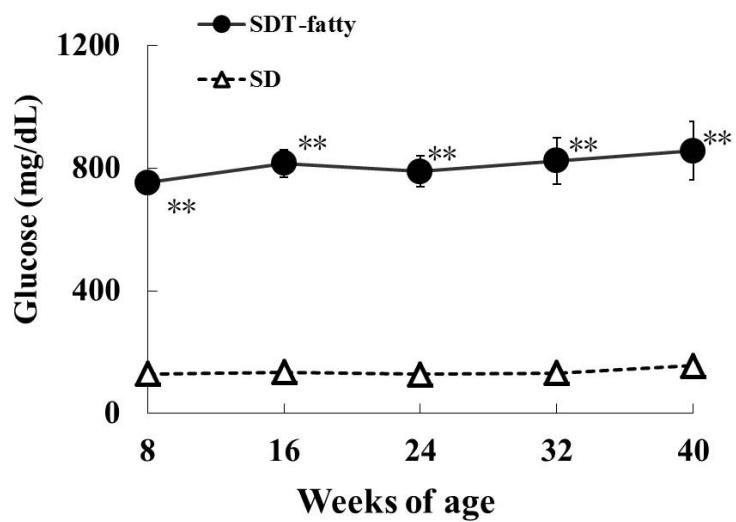


図 2-4 血清中グルコース (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

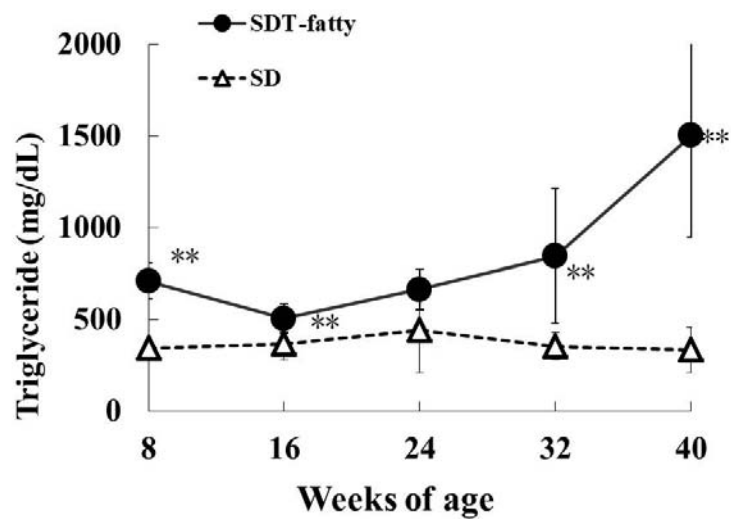


図 2-5 血清中 TG (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

**： $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

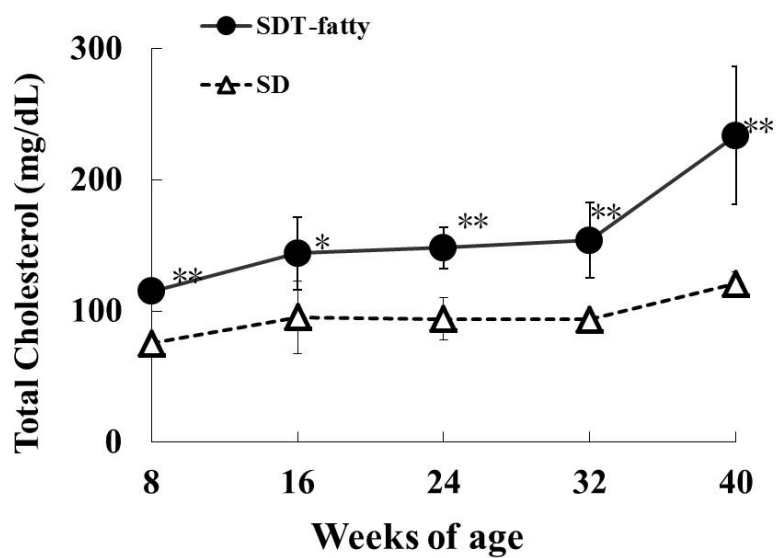


図 2-6 血清中 TC (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

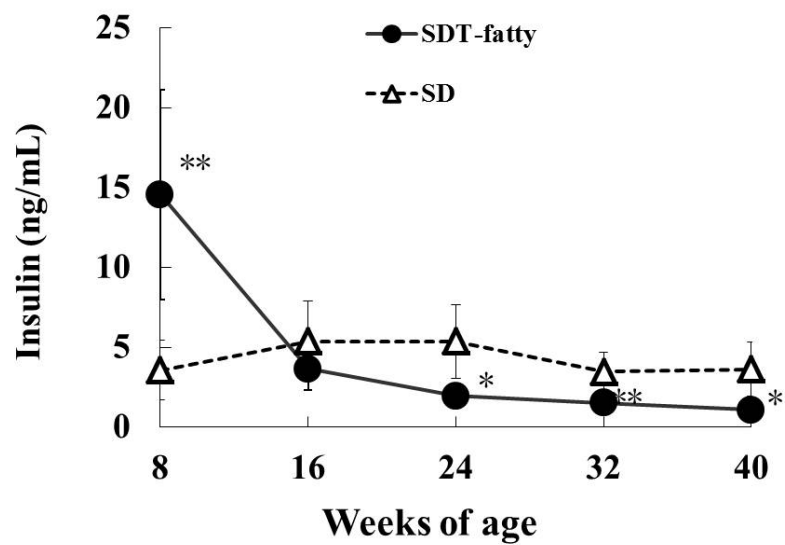


図 2-7 血清中インスリン (8、16、24、2 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

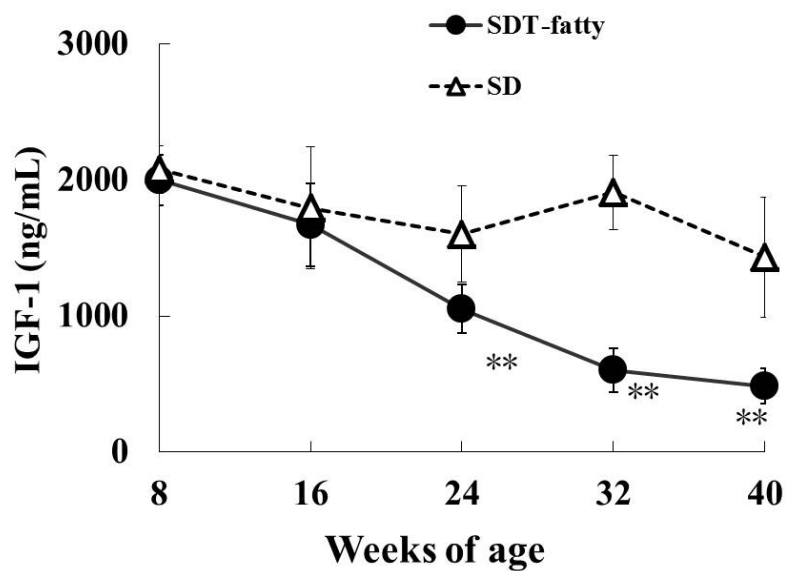


図 2-8 血漿中 IGF-1 (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

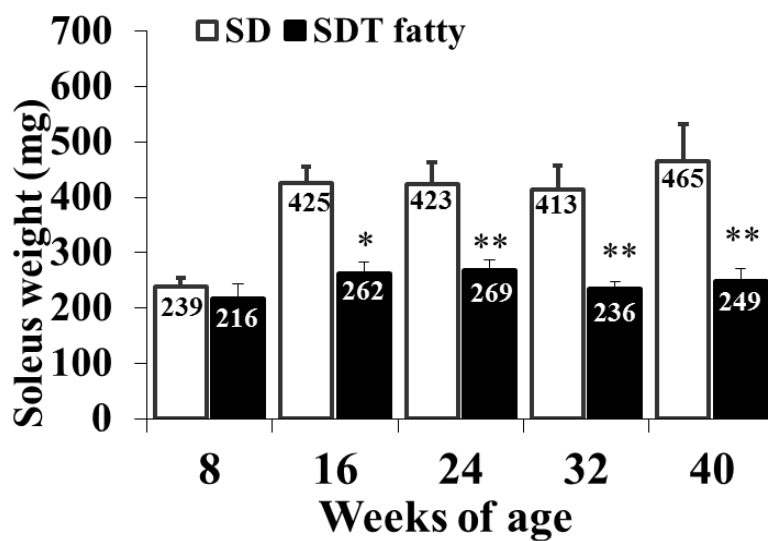


図 2-9 ヒラメ筋の重量 (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

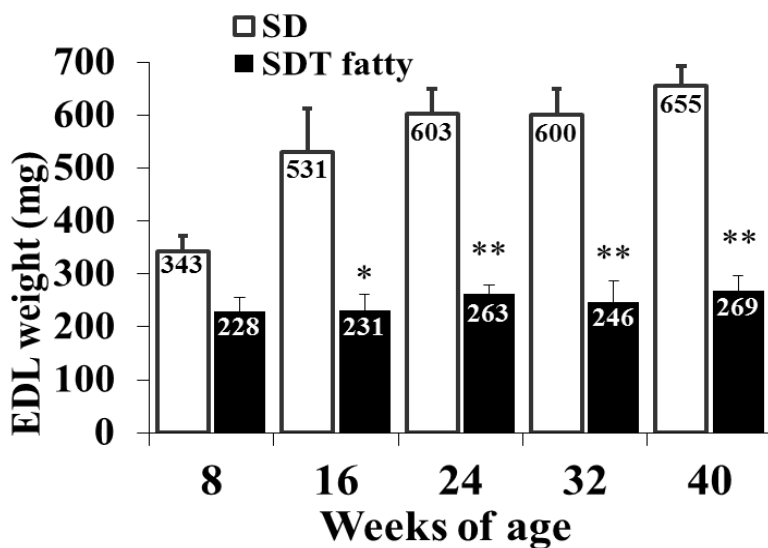


図 2-10 長趾伸筋の重量 (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

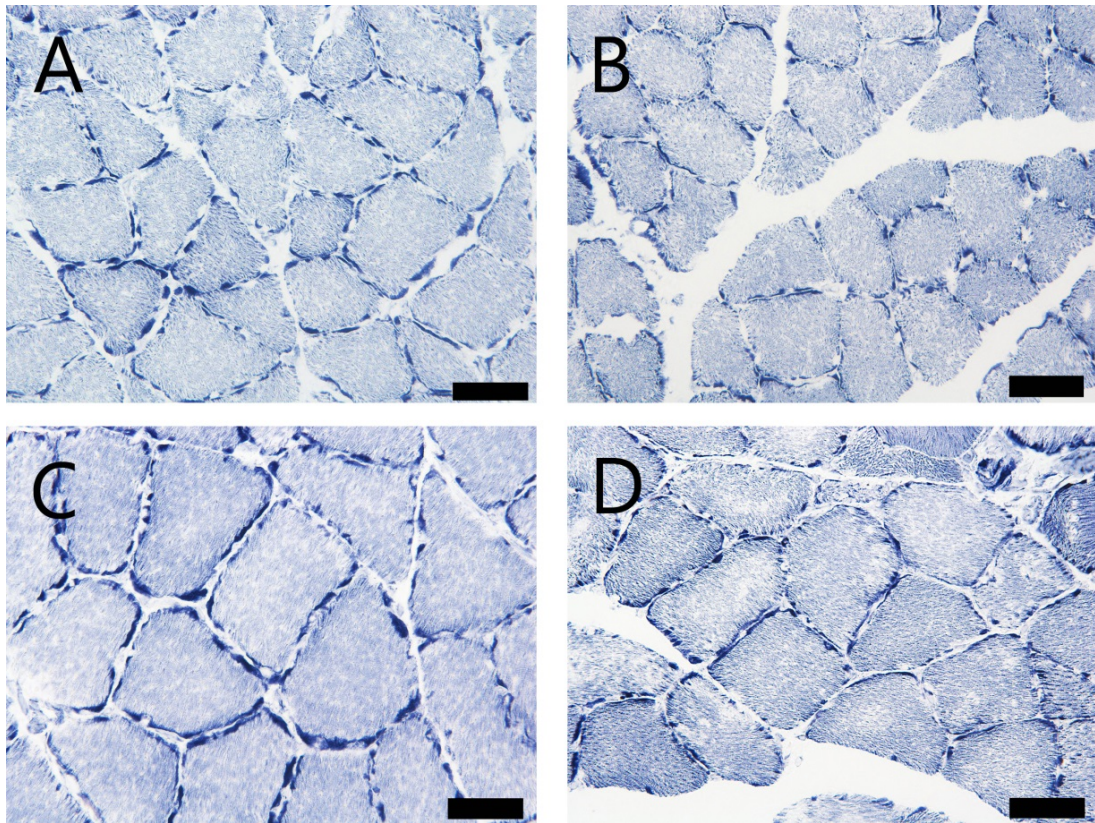


図 2-11 ヒラメ筋の病理組織写真（横断面）

A: 8 週齢の SD ラット、 B: 8 週齢の SDT fatty ラット、
C: 40 週齢の SD ラット、 D: 40 週齢の SDT fatty ラット。

Bar = 50 μ m。 NADH-TR 染色。

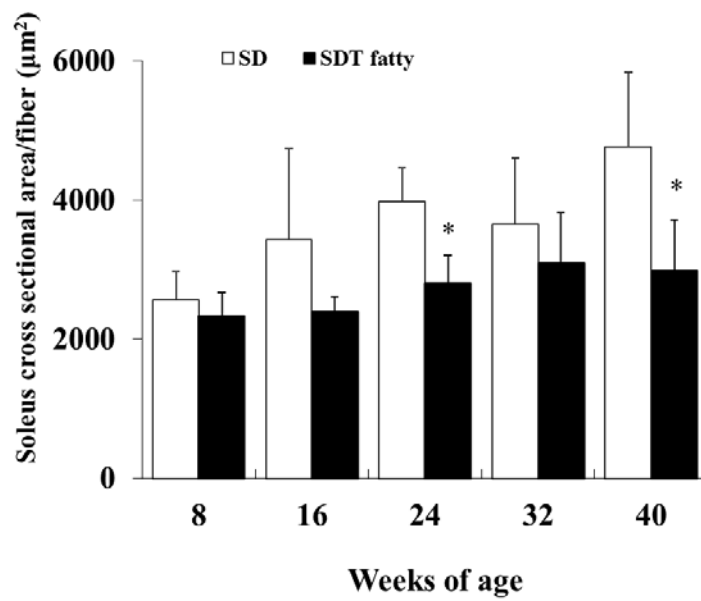


図 2-12 ヒラメ筋の筋線維あたりの平均横断面積（8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット）

*: $p < 0.05$ (SD ラットと比較) (t-test)

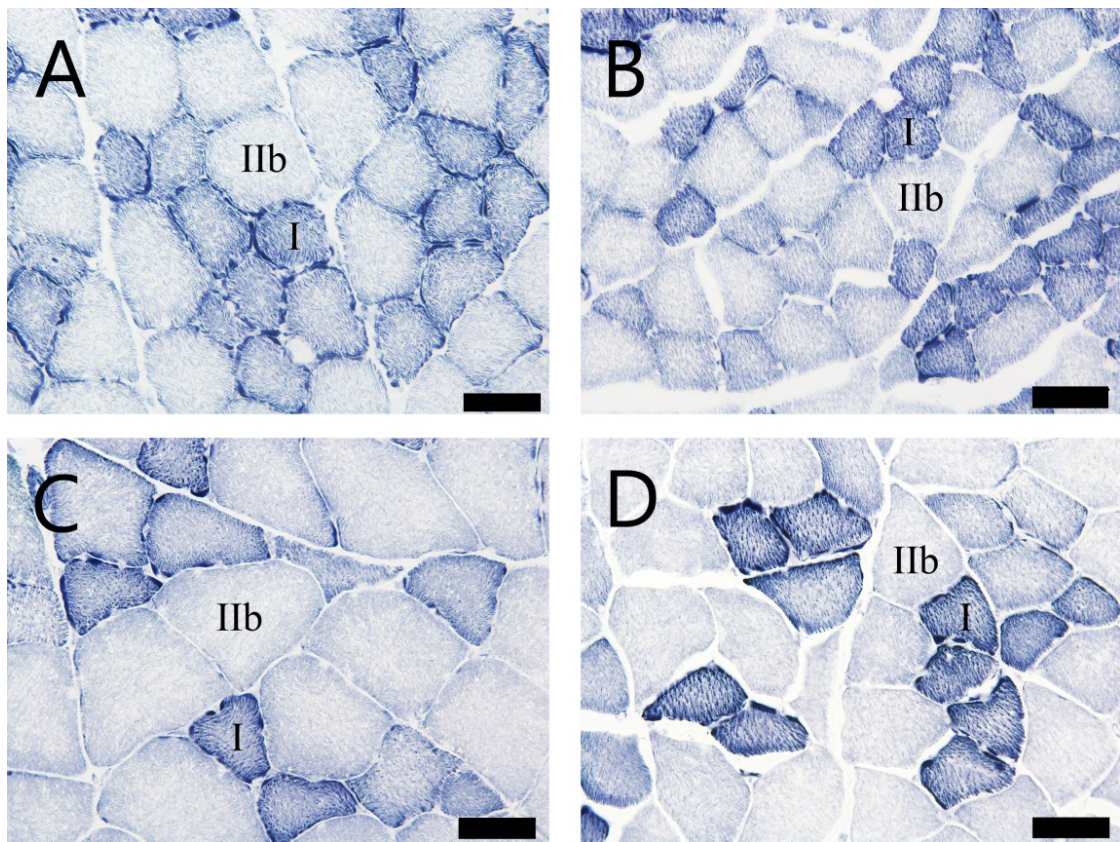


図 2-13 長趾伸筋の病理組織写真（横断面）

A: 8 週齢の SD ラット、 B: 8 週齢の SDT fatty ラット、
C: 40 週齢の SD ラット、 D: 40 週齢の SDT fatty ラット。

I = I 型筋線維、IIb = IIb 型筋線維。 Bar = 50 μ m。 NADH-TR 染色。

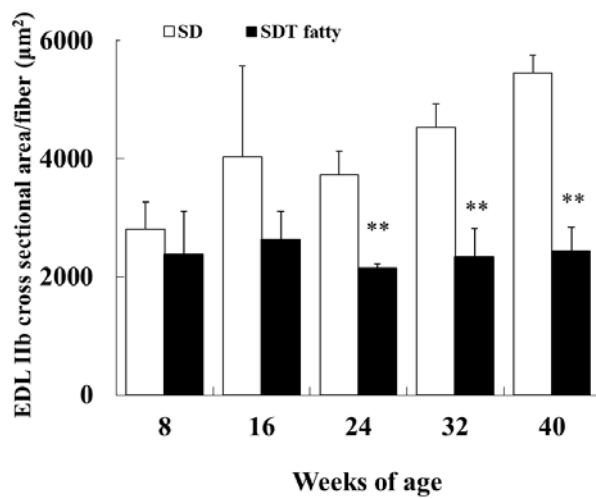


図 2-14 長趾伸筋の IIb 型筋線維あたりの平均横断面積（8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット）

**： $p < 0.01$ （SD ラットと比較）（t-test）

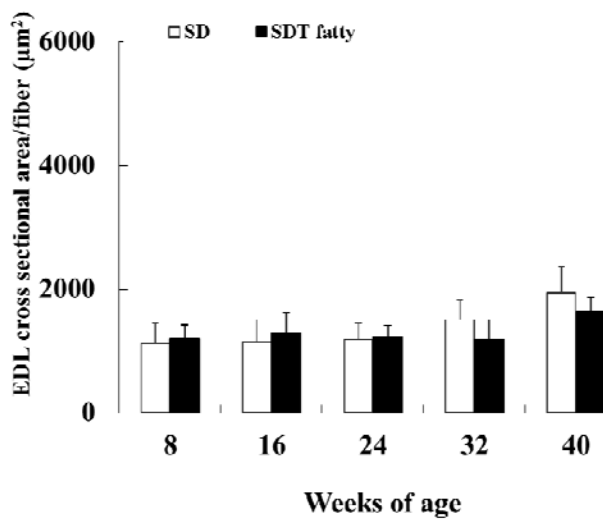


図 2-15 長趾伸筋の I 型筋線維あたりの平均横断面積（8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット）

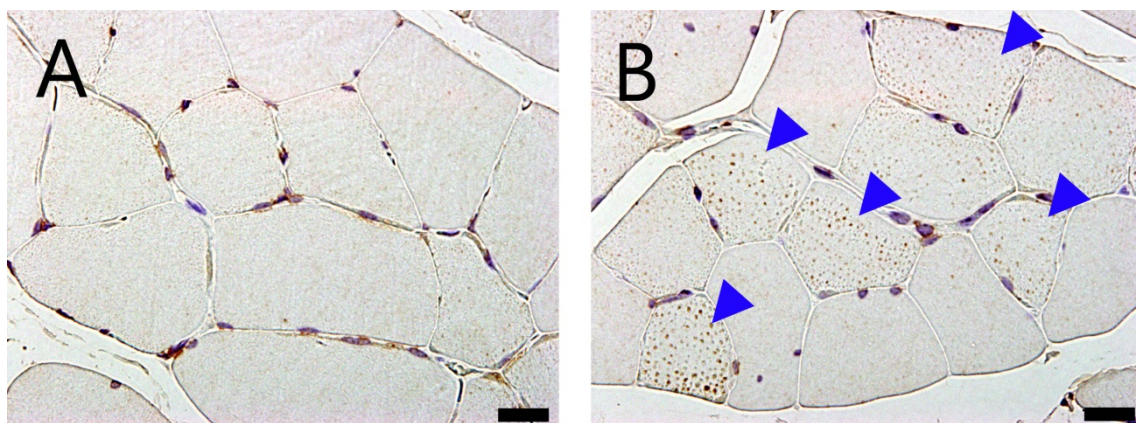


図 2-16 脂肪膜蛋白 Adipophilin についての長趾伸筋の免疫組織化学染色（40 週齢の SD ラット及び SDT fatty ラット）

A: SD ラット、 B:SDT fatty ラット。

SDT fatty ラットの長趾伸筋では筋線維内に微細な陽性顆粒の増加が認められた（矢頭）。

Bar = 20 μ m。免疫組織化学染色。

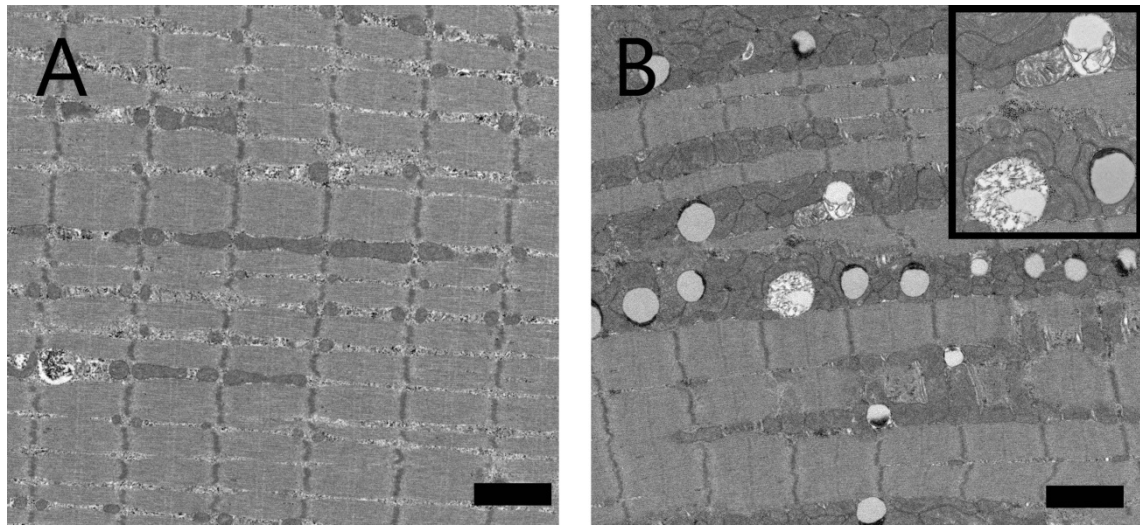


図 2-17 骨格筋の透過型電子顕微鏡像。40 週齢の SD ラット及び SDT fatty ラットの長趾伸筋（縦断面）。A: SD ラット、 B: SDT fatty ラット。 B の右上の拡大像では、脂肪滴及び内部構造の崩壊したミトコンドリアが認められる。 Bar = 2 μ m。

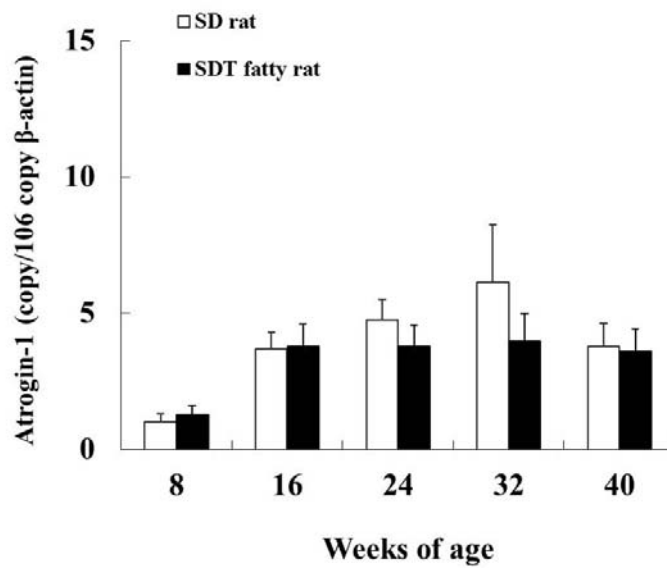


図 2-18 骨格筋（長趾伸筋）における Atrogin-1 の mRNA 発現解析（8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット）

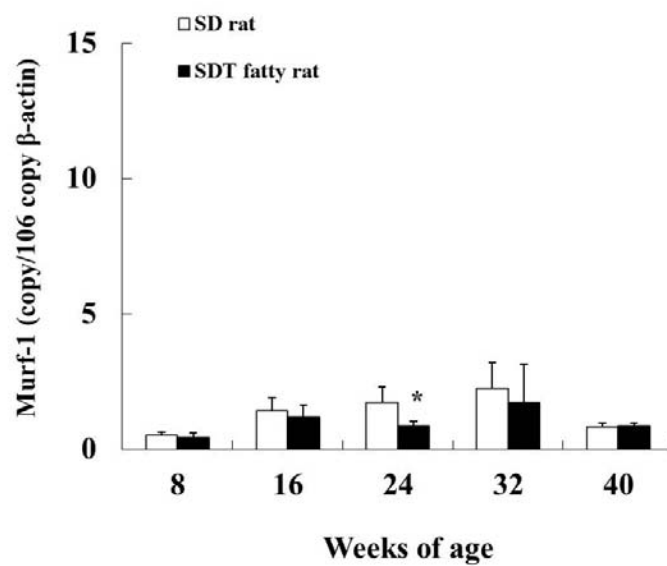


図 2-19 骨格筋（長趾伸筋）における Murf-1 の mRNA 発現解析（8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット）

*: $p < 0.05$ (SD ラットと比較) (t-test)

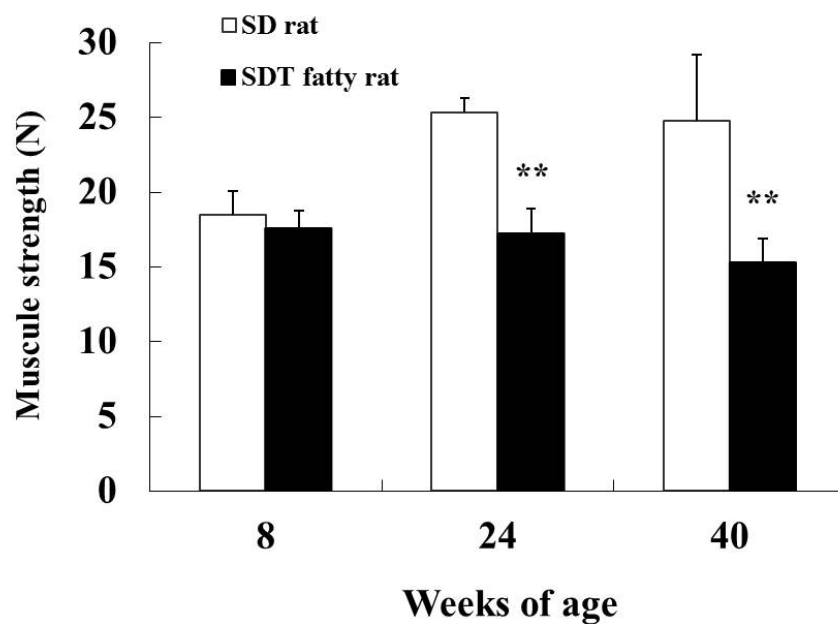


図 2-20 前肢握力測定による筋力の評価 (8、16、24、32 及び 40 週齢における SD ラット及び SDT fatty ラット)

**： $p < 0.01$ (SD ラットと比較) (t-test)

24 及び 40 週齢の SDT fatty ラットの握力は SD ラットに比較して有意に低値を示した。

第4節 考 察

サルコペニアは、進行性の骨格筋量の減少と筋力低下で定義される。サルコペニアは EWGSOP の定義により原発性か二次性かに分類される (Cruz-Jentoft et al., 2010)。原発性サルコペニアは、加齢以外の要因が明らかでない場合に用いる。二次性サルコペニアは加齢以外の何かしらの原因がある場合に用いられる。二次性サルコペニアは、①活動に関するもの（不活動、無重力など）、②疾病に関するもの（臓器不全、炎症、内分泌疾患など）、③栄養に関するもの（低栄養、低吸収、消化管疾患など）に細分化される (Cruz-Jentoft et al., 2010)。原発性サルコペニアは加齢により生じる不可避な現象であるが、一方で二次性サルコペニアは原因に対処することで制御したり進行を遅らせたりすることができると考えられる。

加齢性の現象を研究する場合、時間的な制約がその障害となる。人間におけるサルコペニアは 30-40 年かけて徐々に進行する。正常動物を用いた研究では、筋萎縮が自然発生するには長期間の飼育が必要で、サルコペニアの研究に相当な時間が必要となってしまう。例えば、自然発症で骨格筋萎縮を観察するにはラットやマウスで 20 ヶ月以上、霊長類であれば 20 年以上の年月を要する。約 30 ヶ月齢のラットが 10 ヶ月齢のラットに比較して、特定の筋肉において-30%の筋萎縮が認められたという報告がなされている (Holloszy et al., 1991)。高齢のラットでは自然発生性の多くの背景病変がみられ研究のノイズとなることも正常動物の研究の難しい点である。げっ歯類を用いた長期の毒性試験やがん原性試験などでは、加齢性に進行性腎症や悪性腫瘍の発現頻度が増加し、それに伴い動物が死亡する状況にしばしば遭遇する。解析のための十分な生存動物数を確保するためには大きな設備が必要となり、通常の実験施設では現実的な規模ではなくなる可能性がある。

二次性サルコペニアにおいては、多くの慢性疾患が筋量と筋力の低下を増悪・助長する場合がある。例えば、高齢の糖尿病患者の筋量及び筋力は健常者に比べ劣ることが知られる。加齢と糖尿病は、ともにヒトにおける機能的活動性低下のリスク因子であり、両者の筋肉の萎縮には共通のメカニズムがあると考えられている。そのため、二次性サルコペニアの病態生理を解明することは、二次性サルコペニアのみならず原発性サルコペニアを含めた筋萎縮のメカニズムのよりよい理解と治療標的の探索のために重要になると考えられる。

肥満 2 型糖尿病モデルである SDT fatty ラットは過食とインスリン抵抗性に関連して糖尿病や肥満を発症するモデルである。血糖値は 6 週齢付近から上昇し、以降 800 mg/dl という非常に高いレベルで推移する。TG 及び TC レベルは 4 週齢付近から増加を伴う。雄の SDT fatty ラットは 4 週齢から 8 週齢まで高インスリン血症を呈し、16 週齢以降はインスリンレベルが SDT ラット (lean ラット) と同レベルまで低下することが報告されている (Matsui et al., 2008)。本研究における生化学的パラメータの結果もこれら過去の報告の傾向と概ね一致していた。肥満により 8 週齢では体重が高値 (SD ラットに比較し+23%) であったのにも関わらず、骨格筋の重量は SD ラットに比較してヒラメ筋で-10%、長趾伸筋で-34%とこの時点で低値を示した (8 週齢では有意差なし)。さらに SDT fatty ラットでは、正常対照との比較における 16 週齢以降の筋重量の低値に一致して、筋線維あたりの横断面積の低値が組織学的に認められた。これに加えて、筋タンパク合成系の低下としては血漿中 IGF-1 レベルの低下、機能面についても筋力の低下が 24 週齢以降で確認された。以上のデータを踏まえると、糖尿病及び脂質代謝異常の進行に伴い SDT fatty ラットの 16~24 週齢の期間で骨格筋の量及び形態に関する萎縮性の変化と筋力の低下の傾向が捉えられた。

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝及び糖の取込みにおいて重要な役割を果たす。骨格筋はグルコースの消費に大きく関与しており、健常人では糖の 7 割以

上が骨格筋で利用されている。一方、糖尿病患者では、全身の糖の総利用量が健常者の約半分になり、それには骨格筋での利用率が低下したことが主に寄与しているという（亀井と小川，2015）（図 2-21）。つまり骨格筋はインスリンの主要な標的であり、血糖を利用する最大の器官といえる。したがって、骨格筋におけるインスリン抵抗性は全身の代謝異常に進展すると考えられる。さらに、2 型糖尿病に関連した代謝異常は、骨格筋量の減少により増悪する。そのため、サルコペニアは骨格筋のインスリン抵抗性に関連した現象だとも考えられる。ヒト及び動物の糖尿病における骨格筋の病態についての報告は数多くなされており、糖尿病に関連して筋肉は萎縮すると考えられている。糖尿病患者では、特に下肢の筋肉量や筋力が減りやすいといわれる。70 歳台の 1840 名の高齢者を対象とした 3 年間の追跡調査では、糖尿病患者の DXA で評価した筋肉量と下肢の筋力の両者が対照と比較して減少した（Park et al., 2007）。2675 名の 6 年間の追跡調査でも、自己申告での糖尿病患者と 75g 糖負荷試験で診断された糖尿病患者のいずれにおいても、糖尿病でない人と比べて四肢の除脂肪重量が減少し、CT で評価した大腿の筋肉の断面積も糖尿病の人が約 2 倍も減少した（Park et al., 2009）。糖尿病における筋量の減少は、インスリンの作用不足が関係している可能性がある。糖尿病患者のなかでインスリン抵抗性改善薬を使用した患者は使用しなかった患者に比較して筋肉量が減りにくいという結果が得られている（Lee et al., 2011）。糖尿病患者では筋量あたりの筋力である筋肉の質が低下するという報告もある。HbA1c が 8%を超える糖尿病患者は、8%以下の患者や糖尿病なしの対照と比較して下肢の筋肉の質が低下を認めた（Park et al., 2006）。糖尿病動物モデルを用いた検討では、STZ 誘発の 1 型糖尿病において多くの研究がなされており、筋タンパクの分解の促進に関連して筋萎縮がみられることなどが報告されている（Pepato et al., 1996; Saito et al., 2004）。以上の例が示すように、高血糖やインスリン抵抗性は骨格筋の萎縮に大きく影響する因子であることが文献的に支持されることがわかった。SDT fatty ラットは 4-6 週齢という早期か

ら重篤な糖脂質代謝異常やインスリン抵抗性を呈することから、骨格筋の発達に対しても負の影響を及ぼしている可能性が考えられた。

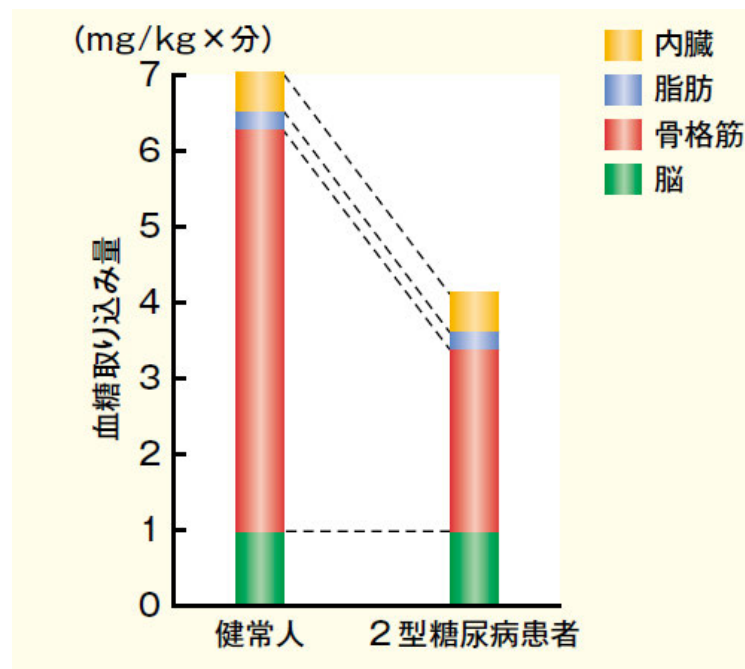


図 2-21 インスリン作用の大きさを臓器・器官別に調べた研究結果

健常人では糖の7割以上が骨格筋で利用されているのに対し、糖尿病患者では骨格筋での利用率が低下したために全身の総利用量が健常者の約半分となっている（亀井と小川，2015 より引用）。

加齢に伴う体組成の変化においては、筋肉量の低下とともに脂肪量が増加する。脂肪組織は、CRP、TNF- α 、IL-6、IL1 β などの炎症性蛋白やサイトカインを生成し、慢性炎症性環境を形成し、筋萎縮やサルコペニアの進行につながる（Vincent et al., 2012）

（図 2-22）。肥満とサルコペニアは両者とも炎症反応の増加に関連することが報告されている（Schrager et al., 2007）。臨床研究では、腹囲が大きく筋力が低い被験者ほど血中炎症反応（IL-6 などの異化サイトカイン）が高いという結果が示された。内臓脂肪の蓄積を伴うメタボリックシンドロームはインスリン抵抗性を悪化させるが、この反応もまた筋タンパク合成を抑制するといわれる。Zucker 肥満ラットでは骨格筋蛋白の

全身には 400 を超える骨格筋が存在している。骨格筋は、組織学的には筋線維の集合体として観察される (図 2-23)。病理組織学的検査では、筋線維の横断面を形態的に評価する。骨格筋は、代謝の様式の違いにより二つの筋線維タイプに大別される。収縮速度の遅い I 型線維 (遅筋) と、収縮速度が速く収縮の強い II 型線維 (速筋) である。I 型筋は酸化的代謝能に優れる、持久力がある、疲労しにくい、ミトコンドリア数が多いなどの特徴がある。II 型筋は、無酸素的な解糖代謝に優れる、瞬発力がある、疲労しやすい、ミトコンドリア数が少ない、などの特徴がある (Schiaffino and Reggiani., 2011)。II 型筋線維は、酸化的代謝能の比較的高い IIa 型と低い IIb 型に細分化される。これらの筋線維タイプの混在割合は筋肉の部位により異なる。NADH-TR の酵素組織化学染色では、これらの筋線維の型を病理組織学的に簡易的に区別することができる。骨格筋の萎縮性変化がさまざまな要因によりもたらされることは先に述べたが、これらの要因の違いによって影響を受けやすい筋線維のタイプは異なることが知られる。例えば、加齢性のサルコペニアでは、I 型筋よりも IIb 型線維が優位に減少することが知られる (Marzetti et al., 2009; Demontis et al., 2013)。一方、一般的に肥満患者などでは I 型筋がより減少しやすいといわれている (Hickey et al., 1995)。本研究では、SDT fatty ラットの筋線維の横断面積はヒラメ筋 (I 型筋) 及び長趾伸筋 (II 型筋) のいずれにおいても同週齢の SD ラットより低値を示した。その変化の程度は長趾伸筋の方が大きく、特に IIb 型の低値の寄与が大きかった。長趾伸筋は II 型筋優位であるが I 型も混在しており、今回 SDT fatty ラットの長趾伸筋では IIb 型筋に比較して I 型筋の横断面積は正常対照と大きな差は認められなかった。したがって、IIb 型筋優位に萎縮する傾向は、加齢性のサルコペニアと共通した傾向であると考えられた。

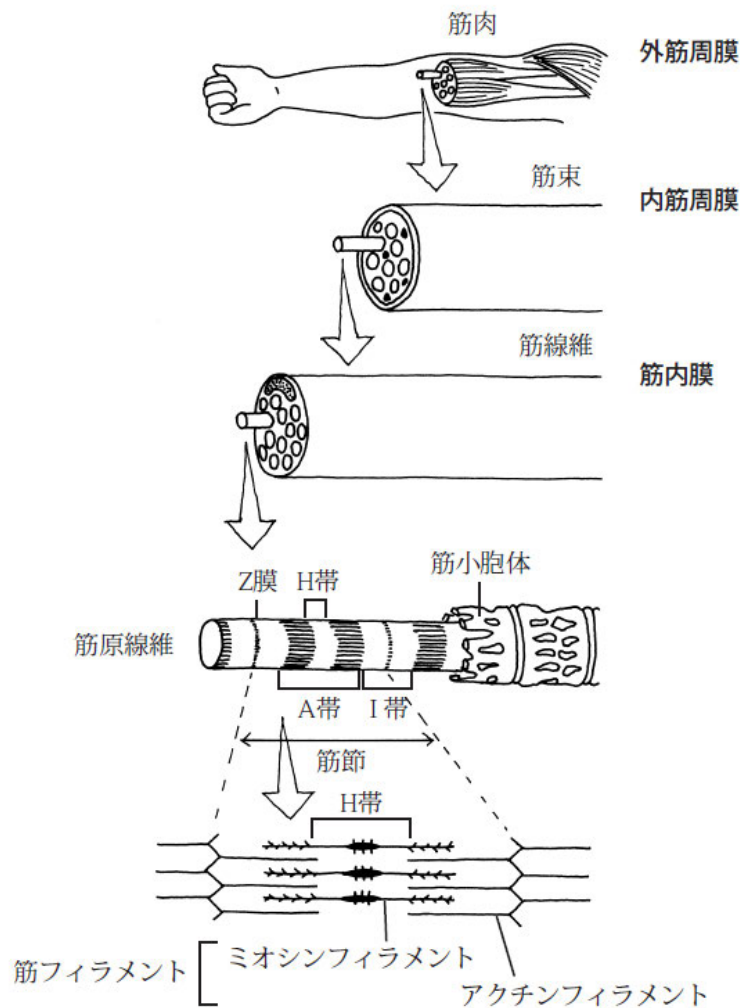


図 2-23 骨格筋の構造

筋肉は筋束の集合体で、筋束は筋線維の集合体である。筋線維の表面は細胞膜で被われている。筋線維は筋原線維とその間を満たしている筋形質より構成されている（理学療法科学学会, 2011. 臨床運動学 第 6 版より引用）。

インスリン-IGF シグナル経路は骨格筋の成長と維持に重要な役割を果たすことが知られる（図 2-24）。インスリンは膵臓の β 細胞から分泌され、一般には血糖値を下げるホルモンとして知られているが、骨格筋における作用としては、タンパク同化作用を促進し、一方でタンパク分解を抑制する。インスリンは膵臓 β 細胞で 3 カ所の S-S 結合をもつプロインスリンとして合成され、その後プロセッシングにより C-ペプチドが切り出されてインスリンとなる（図 2-25）。分泌されたインスリンは門脈を通してまず肝臓に

流入し、その後、全身循環をめぐって、骨格筋や脂肪組織などのインスリン標的臓器に到達する。インスリンは標的細胞表面のインスリン受容体（IR）に結合してそのチロシンキナーゼ活性を亢進させPI3キナーゼやAktなどを介して情報伝達分子を順々に活性化させ、基質であるインスリン受容体基質（IRS）1～4をリン酸化する。IRSタンパクのうち、IRS-1とIRS-2が全身臓器に発現しており、骨格筋では主にIRS-1が糖代謝作用を媒介しているものと考えられている（笹子と植木, 2016; Long et al., 2011）。インスリンのシグナル伝達において下流分子が活性化されると、骨格筋における多面的な作用を示す。糖脂質代謝における代表的なものとしては、糖取込の増加、グリコーゲンの合成促進と分解抑制、遊離脂肪酸の取込の増加などがある。インスリンからのシグナル情報が最終的に細胞内のGLUT4貯蔵庫に伝達され、糖取り込みが生じる（亀井と小川, 2015）。血液中のグルコースを骨格筋の細胞内に取り込む際にはこのGLUT4が重要となる。糖尿病患者がインスリン抵抗性を持つのは、この一連の情報伝達経路に異常が生じるためと考えられている。タンパク代謝に関しては、インスリンは一部のアミノ酸輸送を亢進させ、とくに分枝鎖アミノ酸の存在下で、mTORC1の活性化を介してタンパク合成を増加させる（Zoncu et al., 2011）。ヒトの骨格筋におけるインスリンの効果については、インスリン治療によりⅡ型糖尿病患者の筋線維面積が増加するという報告がある（Cederholm et al., 2000）。

IGF-1（別名ソマトメジンC）は、成長ホルモンの分泌に応じて産生されるポリペプチドホルモンで、「インスリン様成長因子」という名の通りインスリンと配列が高度に類似している（笹子と植木, 2016）。IGF-1の構造はプロインスリンと相同性が高く、3カ所のS-S結合を有するが、プロインスリンと異なりC-ペプチドを切り出すプロセッシングは受けない（図2-25）。

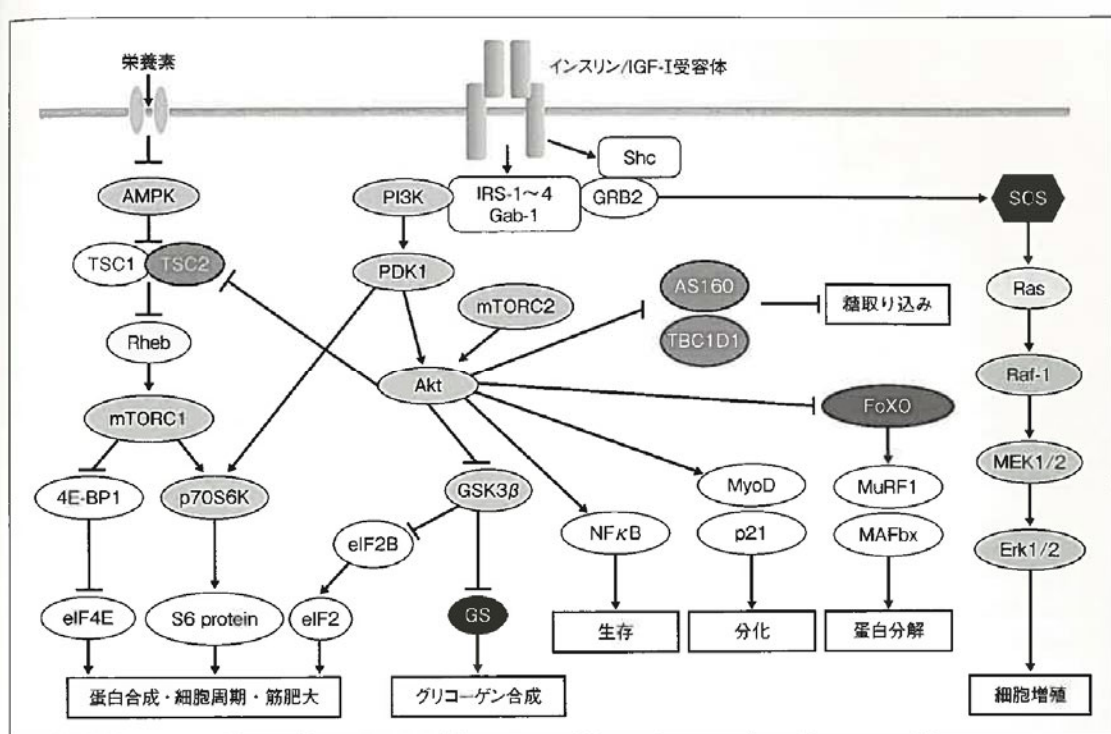


図 2-24 骨格筋における主なインスリン-IGF-1 シグナル経路
(笹子と植木, 2016 より引用)

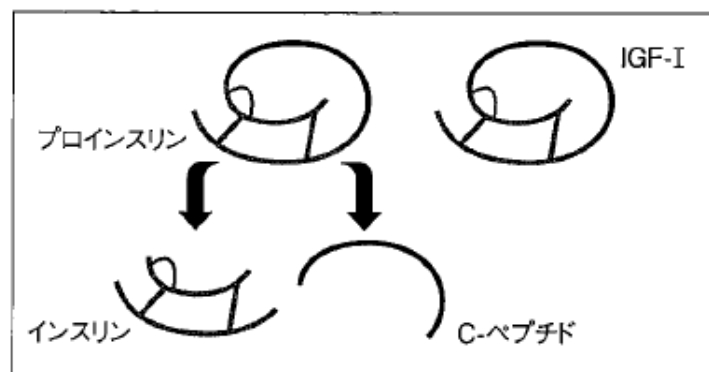


図 2-25 インスリンと IGF-1

インスリンは3カ所のS-S結合をもつプロインスリンとして合成され、プロセッシングによりC-ペプチドが切り出されてインスリンとなる。プロインスリンとIGF-1の相同性は極めて高い(笹子と植木, 2016より引用)。

IGF-1 の分泌は下垂体由来の成長ホルモンによって正の制御を受けている。IGF-1 は主に肝臓で分泌される他、骨格筋においても分泌される。肝臓由来の IGF-1 は全身性に、局所（骨格筋）の IGF-1 はオートクリン・パラクリン的に作用すると考えられる。本研究では、標的臓器は骨格筋であるが全身性の影響を優先的に検討するため血中の IGF-1 を測定した。骨格筋そのものの IGF-1 分泌能およびその自己分泌的な影響の程度については今後の検討が必要である。

IGF-1 は標的細胞表面の IGF-1 受容体に結合し、シグナルを伝達する。インスリンが代謝作用をより強く媒介するのに対して、IGF-1 はタンパク合成と細胞増殖を促進する。IGF-1 シグナルの低下は高齢者や肥満者の筋力低下に関連する。IGF-1 の作用点としては、骨格筋の再生に携わる筋衛星細胞の活性化を介して筋再生を誘導するという報告がある (Hawke and Garry., 2001; Alway et al., 2014)。ラット IGF-1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを老齢マウスの骨格筋に投与すると、成熟マウスの骨格筋と同程度の筋断面積と筋力をもつようになることが示されている (Barton-Davis et al., 1998)。30 カ月齢のラットにギプス固定を行い下腿筋を萎縮させた後に IGF-1 を投与すると、筋肉量の回復が認められた (Chakravarthy et al., 2000)。特定の重篤な疾患を有していない高齢男性（約 70 歳）にみられたサルコペニアでは、成人男性（約 20 歳）と比較して、末梢血中の IGF-1 が 33%、骨格筋由来の IGF-1 mRNA レベルが 45%低下していたという報告がある (Benbassat et al., 1997)。また血清 IGF-1 が糖尿病患者及び糖尿病動物では低下するということが報告されている (Kim and Lee., 2015; Han et al., 2006)。

興味深いことに、インスリンと IGF-1 に高い相同性があるのと同様に、それぞれの受容体 (IR と IGF1R) も高い相同性をもち、それ以下のシグナル伝達分子も多くが共通している (図 2-24)。それぞれの伝達分子の類似性から、糖尿病でインスリンシグナルが障害されてインスリン抵抗性が誘導される状況では、同時に IGF-1 のシグナル伝達も障害をうけるものと考えられている。本研究において、SDT fatty ラットは 8 週齢で高

ンスリン血症を呈した後に 16 週齢以降ではインスリンレベルは低下し、一方で血中 IGF-1 レベルは 24 週齢から急激に低下した。したがって、SDT fatty ラットでは 16～24 週齢付近から骨格筋の成長・維持のキーププレイヤーであるインスリン及び IGF-1 の低下が顕著に認められ、それぞれのシグナル経路が正常に作用しないことで、筋タンパク合成系の低下が生じているものと考えられた。インスリン-IGF-1 シグナルの異常は、インスリン抵抗性及びインスリン分泌能低下という糖代謝システムの異常に加えて、筋タンパクの合成システムの低下という形で本ラットの骨格筋萎縮に関与している可能性が示唆された。

雄性ホルモンであるテストステロンを一定レベルに維持することは、骨格筋の維持を含む発生や生物学的プロセスにとって必要である (Basualto-Alarcón et al., 2014)。甲状腺ホルモンやグルココルチコイドなどは加齢に対して比較的一定レベルを維持するのに対して、性ステロイドホルモンの血中濃度は、加齢とともに徐々に低下することが知られている (江頭, 2014)。加齢に伴う血中テストステロン濃度の低下は多くの老年疾患やそれらから引き起こされる認知症や寝たきりなど日常生活の機能障害と関連すると考えられている。実際に、脳を含む多くの臓器、組織及び細胞にアンドロゲン受容体が存在することから、テストステロンには性機能の制御のみならず、他の多くの生理機能に関与していると推察される。精巣の疾患などでテストステロンが欠乏するような状況においては骨格筋量が低下すること、またそのような状況下ではテストステロンを補充することにより骨格筋量が増加することが報告されている (Katznelson et al., 2001 ; Snyder et al., 2000)。高齢者においては血中テストステロン濃度と骨格筋量、筋力との間に正の関連があるといわれ、テストステロン低下は直接的にサルコペニアの発症に関連するといわれる (Basualto-Alarcón et al., 2014)。また、加齢に加え糖尿病や肥満などにおける糖脂質代謝異常も性機能を障害することが知られる。STZ 誘発性の糖尿病モデル動物において、交尾行動、精子数及び精子の運動性の低下などがみられ

るという報告や (Khaneshi et al., 2013; Saito et al., 2004)、2 型糖尿病モデルの GK ラットでは勃起不全などの性機能障害がみられるという報告がある (Oger-Roussel et al., 2014)。SDT fatty ラットの lean である SDT ラットにおいては、血糖値上昇が顕著になる 20 週齢付近で血中テストステロン値が SD ラットに比べ有意に低下した (稲葉ら, 2016)。SDT fatty ラットを用いた過去の検討では、8 週齢から血漿中テストステロンレベルが同週齢の SD ラットよりも低値を示すことが報告されている (Ohta et al., 2014) (図 2-26)。一方、2 型糖尿病モデルでも OLETF ラットでは血中テストステロン濃度は対照群と同等であると報告されている (Komaki et al., 2005)。したがって、SDT fatty ラットでは、インスリンや IGF-1 だけでなく血中テストステロン濃度の減少も骨格筋の病態生理に関連している可能性が文献的に考察される。本研究では検討していないが、両ホルモンの低下の上流には成長ホルモンのシグナル伝達に何らかの異常がある可能性も考えられた。

本研究では、SDT fatty ラットの筋組織における IMCL の増加が、adipophilin の免疫染色および電子顕微鏡検査により明らかとなった。動物が摂取した過剰なエネルギーは、中性脂肪として細胞内に脂肪滴として貯蔵されることが知られる。脂肪滴の大きさや機能には多様性があり、蓄積する細胞によっても異なる。成熟脂肪細胞の脂肪滴が大型 ($\sim 200 \mu\text{m}$) であるのに対し、心筋や骨格筋の脂肪滴は極めて小型 ($\sim 1 \mu\text{m}$) である。骨格筋では脂肪酸は主要なエネルギー源であり、脂質の代謝回転も速いのが特徴である。脂肪滴の膜表面には多数のタンパク質が存在し、脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たしている。脂肪滴タンパクは単に脂肪滴を構成しているだけでなく、肥満や糖尿病などの疾患とも関わりがあるといわれる。IMCL は骨格筋線維内に蓄積する脂肪滴で、インスリン抵抗性の増加に関連すると報告されている。脂肪滴タンパクには、PAT ドメインというアミノ酸配列に相同性を有する一群のタンパク質が存在しており、PAT ファミリーと呼ばれる。Adipophilin/Plin2 は PAT ファミリーに属する脂肪滴タンパクで、骨格

筋における脂肪の貯蔵に関する機能を担う。過剰な脂肪酸の分解を促進し脂肪滴内に TG として貯蔵する作用を持ち、同時にインスリン抵抗性を誘導することが知られる (Conte et al., 2013)。さらに、adipophilin/Plin2 の発現は IGF-1 の発現低下に強い相関があることが報告されている。したがって、SDT fatty ラットで増加していた IMCL は、インスリン抵抗性や IGF-1 レベルの低下などを通じて本動物の骨格筋の病態に関連している可能性が考えられた。

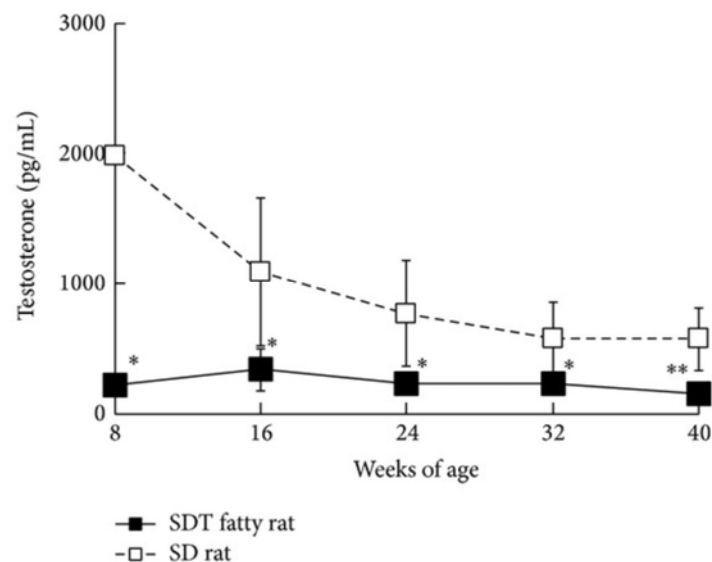


図 2-26 SDT fatty ラットの血中テストステロン濃度

SD ラットと比較して、SDT fatty ラットの血中テストステロンは 8 週齢から低値を示した (Ohta et al., 2014 より引用)。

平均値±SD (n=4-6)。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.05$ (SD ラットと比較) (t-test)

ミトコンドリアの機能異常は、サルコペニア及び糖尿病の共通するリスクファクターである。ミトコンドリアは糖の酸化的代謝で主要な役割を果たす。筋の量的調節・質的調節の両方に関連する骨格筋ミトコンドリアは、サルコペニア成因における候補器官として重要と考えられる。加齢や糖尿病では骨格筋のミトコンドリア機能低下が認められ、さまざまな病態に関与していることが多数報告されている。加齢や糖尿病の骨格筋細胞

ではミトコンドリアの機能低下によりセラミドやジアシルグリセロールが蓄積し、IRS-1 のセリン残基のリン酸化が誘導、チロシン残基のリン酸化が阻害されることによりインスリン抵抗性が惹起されるとともに、MnSOD などの酸化ストレス消去系の阻害による酸化ストレス増加も生じる。異常な状態となったミトコンドリアは、ミトコンドリアを選択的に除去する機構であるマイトファジーによって処理されるが、病態下ではこの機構に障害が生じているため、その結果、異常ミトコンドリアが蓄積し、さまざまな病態に関連すると考えられている。

糖尿病では、ミトコンドリアの酸化的代謝能の低下や、ミトコンドリア由来の酸化ストレスの増加などが報告されている。ミトコンドリアの機能異常は形態変化を伴う場合がある。本研究にてにおいても、SDT fatty ラットの骨格筋線維の電子顕微鏡検査により、SDT fatty ラットの骨格筋線維内で脂肪の蓄積に加えてミトコンドリアの内部構造の崩壊が認められ、ミトコンドリアの機能異常を呈している可能性が示唆された。

骨格筋の萎縮はタンパク質の合成と分解のバランスが崩れることによって引き起こされる。筋タンパクを分解する経路には、ユビキチン・プロテアソーム経路、カルパイン経路、リソソーム経路の3つの主要経路が存在する。萎縮したヒト大腿四頭筋や宇宙フライト（無重力による廃用性萎縮のモデル）したラットの腓腹筋中でユビキチン化タンパク質が蓄積していたという報告がある。Atrogin-1 及び Murf-1 は骨格筋に発現する E3 ユビキチンリガーゼの一種で、タンパク分解を誘導することから、筋タンパク分解系の有用な指標と考えられている (Gumucio and Mendias., 2013)。Atrogin-1 及び Murf-1 のノックアウトマウスは、それぞれ坐骨神経切除による萎縮筋に対して抵抗性を示すことから、筋萎縮の原因因子として知られるようになった。筋萎縮が生じる際には、Atrogin-1 や Murf-1 の mRNA の発現の増加が認められるという報告がある。糖尿病モデル動物の検討では、db/db マウスでインスリン抵抗性による Atrogin-1 及び Murf-1 の発現亢進が認められたという報告がある (Wang et al., 2006)。本研究の条件下では、

SDT fatty ラットの長趾伸筋における Atrogin-1 及び Murf-1 の mRNA 発現に有意な増加はいずれの週齢においても認められなかった。そのため、SDT fatty ラットの骨格筋の病態には、タンパク合成経路の異常の方が、タンパク分解経路よりも寄与が大きい可能性が示唆された。本研究では、予想とは逆に、SDT fatty ラットの Murf-1 の mRNA が SD ラットに比較して 24 週齢で有意に低値であった。これは、16 週齢から 24 週齢に至る過程で急激にタンパク合成系（血中インスリン及び IGF-1 レベル）が低下したことへの適応反応が生じている可能性が考えられた。

筋力は加齢により低下する。臨床では、筋機能や筋力の低下は筋量低下と並んでサルコペニアの重要な指標となる。筋力の低下は、特に下肢で認められやすく、筋量の低下よりも顕在化しやすい (Newman et al., 2003)。握力低下は健康状態の悪化に深く関連することなどが知られている。EWGSOP の定義をベースとして、臨床での診断基準の実際を下記に概説する。EWGSOP の定義では、骨格筋量の低下があることに加えて身体機能（歩行速度）の低下または、筋力（握力）の低下がある場合にサルコペニアと診断される。EWGSOP の定義によるサルコペニア診断の具体的手順においては、最初に歩行速度を測定し、0.8 m/秒以下の場合は四肢骨格筋量を測定して、診断基準の男性 7.23 kg/m²、女性 5.67kg/m²以下の場合はサルコペニアと診断される (図 2-27)。歩行速度が 0.8m/秒より早かった場合は、握力を測定し、男性では 30kg、女性では 20kg よりも高値の場合はサルコペニアではないと診断され、高値の場合は四肢骨格筋量を測定し、診断基準値以下の場合はサルコペニアと診断される (Cruz-Jentoft et al., 2010)。EWGSOP は欧米の基準であり、日本人と欧米人では、高齢者であっても体格や生活習慣の違いがあることから、日本人の高齢者に合ったサルコペニアの簡易基準案が作成されている (下方と安藤, 2012)。それによると、65 歳以上の高齢者で、歩行速度が 1m/秒未満、もしくは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満である場合で、さらに BMI 値が 18.5 未満、もしくは下腿囲が 30cm 未満の場合にサルコペニアと診断される。歩行速度、握力が基

準値以上であった場合は正常で、歩行速度、握力が基準値以下でも BMI、下腿囲が基準値以上であれば脆弱高齢者であるがサルコペニアではないと診断される点が特徴である。この基準に従うと、日本の 40 歳から 88 歳までの地域住民 2419 名におけるサルコペニアの有病率は 5.3%であった（下方と安藤，2012）。

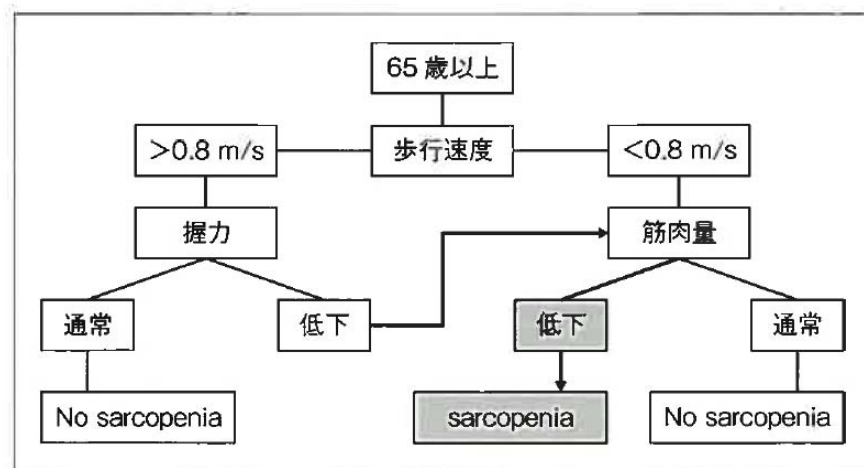


図 2-27 EWGSOP の推奨するサルコペニアの診断基準
(Cruz-Jentoft et al., 2010; 田中ら, 2014 より引用)

また、先に述べたように、糖尿病患者では筋力が低下するという報告がなされている。高齢の糖尿病患者では、対照に比較して、開眼片足立時間が短く、Up & Go 時間が長いなど、身体能力の低下が認められた（荒木と千葉，2011）。HbA1c が 7%以上の血糖コントロール不良群と 7%未満のコントロール良好群に分けて下肢機能を比較したところ、HbA1c が 7%未満の患者は高血糖の患者と比較して下肢機能が維持されていた（Wang and Hazuda., 2011）。また、糖尿病性の末梢神経障害の重症度と筋力低下との関連が報告されている（Andersen et al., 2004; 2012）。糖尿病における筋力低下は筋線維密度の減少と運動単位の振幅増加と関連し、軸索消失後の再神経支配が不十分であることが示されている（Andersen et al., 1998）。げっ歯類の筋力評価において、前肢握力測定は一般的な手法として用いられる。本研究では、この手法を用いて、SDT fatty ラットが 24

週齢及び40週齢においてSDラットよりも筋力が有意に低値を示すことを明らかにした。SDT fatty ラットを用いた別の報告において、本ラットが16週齢までに体性神経及び自律神経の機能的及び形態的異常を呈することが報告されている (Maekawa et al., 2017)。以上より、SDT fatty ラットで認められた筋力の低下は筋量の低下や糖尿病性の末梢神経障害に関連している可能性が示唆された。

握力の測定は、EWGSOP で推奨する筋力評価の方法であること、またげっ歯類の筋力の評価において一般的な方法であることから、握力測定の結果をもって筋力＝骨格筋の機能を評価することは一定の妥当性があるものと考えられる。しかし、筋力の評価については、全身に数百種類存在する筋肉の中でどの部分を選択して測定するのが妥当なのか、ヒトだけでなく動物を用いたサルコペニア研究においても議論の余地はある。老化は脚からというように、下肢筋量、特に大腿前面の筋萎縮が大きいことを考えると、特にヒトでは大腿四頭筋の発揮筋力を測るのが適切であるという見方もある。また、筋力よりも筋力×速度で計算される「筋パワー」のほうが加齢変化が大きいことや、身体機能との関係が高いことから、筋パワーを評価するのがよいという考え方もある (山田, 2016)。今後は、ヒトでの筋力評価法の最適化とともに、実験動物での評価法についてもブラッシュアップしていくことがサルコペニア研究において重要になってくると考えられる。

ヒトでのサルコペニア (原発性、二次性に関わらず) は、その個体の成熟期の筋量のピークからの差分で筋量の低下が評価可能であるが、本研究における SDT fatty ラットのように若齢から重度の代謝異常により正常対照に比較して骨格筋の成長・成熟が認められない場合に、それが果たしてサルコペニアのモデルといえるか、という問題はある。成長ホルモンや IGF-1 受容体の遺伝子操作により個体の全身性の成長遅延に基づく骨格筋の萎縮が認められるが (Mavalli et al., 2010)、この遺伝子操作モデルは筋発育不全のモデルとはいえるがサルコペニアのモデルとはいえないという指摘がなされて

いる（葛谷，2014）。その場合、加齢（原発性）のサルコペニアのモデルではなく、標的とする分子を調節したことによる二次性の筋萎縮のメカニズムを解明する際には有用なモデルであるという。確かに、特に骨格筋の体重あたりの重量（相対重量）が正常対照と同程度に推移した場合は、そのデータのみで筋萎縮が起きているとはいえないかもしれない。また、一般論として、どんな疾患領域でもヒトの病態を模した完璧なモデル動物はないと考えられる以上、その限界を考慮しながら適切なモデルを選択するしかないのは重要な事実である。しかし、妥当な正常対照動物との比較において、そのモデル動物の筋肉の重量（相対・絶対）や筋線維面積の低値がみられた場合には、少なくとも成長遅延とは別に何らかの原因により筋肉が萎縮していると判断できるのではない。また、先に述べたようにタンパク合成・分解の不均衡やインスリン抵抗性など加齢性サルコペニアと糖尿病で増悪するサルコペニアには根底に共通のメカニズムがあると想定されるため、2 次性のサルコペニアの病態の解明を進めることで、原発性サルコペニアのメカニズムを理解する上で有用な研究結果が得られる可能性がある。特に糖尿病や脂質代謝異常のモデルにおいては、その早期の発症及び病変の程度の重篤さは適切なモデル動物を選択する上で重要な要件であり、SDT fatty ラットはそれらの点で優れたモデルと考えられる。何より、超高齢社会は現実到来しており、高齢者の QOL を損なうサルコペニアへの対応が喫緊の課題であることを考えると、正常動物の自然発症による筋萎縮を待つ場合に比べてはるかに短期間で実験・研究が完了できるメリットは大きいと考えられる。

糖尿病と骨格筋との関連は比較的古くから報告されているものの、サルコペニアはここ数年で注目が高まっている新しい疾患概念であることもあり、他の糖尿病モデルラットにおいて、本研究のように包括的に骨格筋の病態を検討した報告は少ない。本研究は、SDT fatty ラットの骨格筋の病態生理について報告した初めての研究である。SDT fatty ラットは他の糖尿病ラットモデルに比較して重篤な糖脂質代謝異常を呈し、正常

対照に比較して筋量の低下、筋力の低下、筋線維面積の低下、タンパク合成系因子の減少、IMCLの増加及び骨格筋内ミトコンドリアの形態異常を伴うことが明らかになった。これらの実験結果は、糖脂質代謝の異常に関連してサルコペニアの指標となるような骨格筋の変化がSDT fatty ラットで捉えられたことを支持するものである。結論として、SDT fatty ラットは糖尿病に関連したサルコペニアのメカニズムを解析するのに有用なモデルと考えられた。現状では、本ラットについて、筋線維タイプの構成変化の詳細、筋細胞の酸化的代謝の活性、骨格筋細胞（筋衛星細胞）の再生能、身体不活動の影響などについては検討されておらず、これらについては今後さらなる研究が必要と考えられた。

第5節 要 約

サルコペニアは骨格筋量の減少と筋力の低下で定義される老年症候群である。転倒、骨折、寝たきり及び要介護などの大きなリスクファクターとなり、高齢者の QOL を大きく損なう要因でもある。高齢化の進む国や社会においてサルコペニアは重要な健康問題となり、特に世界に先駆けて超高齢化が進む日本においてはその対策の必要性が高まっている。現状、サルコペニアを適応とする薬剤はなく、有用な治療法はない。正常動物の加齢を待つには数年単位の研究期間が必要となることや、表現型がヒトの筋萎縮と類似した適切な動物モデルが少ないことから、有用なモデル動物の作出が期待されている。

糖尿病はサルコペニアを増悪させることが知られている。加齢性、糖尿病性いずれの原因によるサルコペニアにおいても、インスリン抵抗性が筋萎縮や筋力低下に関連しているといわれる。糖尿病に関連したサルコペニアのメカニズムを解明することは、糖尿病性のサルコペニア（原疾患により増悪したサルコペニア）の対策のみならず、加齢性のサルコペニアのメカニズム解明につながる可能性がある。そこで、肥満 2 型糖尿病モデルの SDT fatty ラットを用いて、骨格筋の病態生理学的解析を実施し、糖尿病に関連したサルコペニアモデルとしての有用性を検討した。

SDT fatty ラットの血糖値、血中 TG 及び TC レベルは 8 週齢時に有意に高値を示した。血中インスリンレベルは 8 週齢で高値を示した後、16 週齢で急激に低下し以降低値のまま推移した。過食とインスリン抵抗性に関連して肥満を呈するモデルであり、8 週齢では体重が高値（SD ラットに比較し+23%）であったのにも関わらず、骨格筋の重量は SD ラットに比較してヒラメ筋（I 型筋優位）で-10%、長趾伸筋（II 型筋優位）で-34%と低値を示した。16 週齢以降、SDT fatty ラットでは骨格筋重量の低値を示したが、これに一致して組織学的には筋線維あたりの横断面積の低値が認められた。これに加えて、筋タンパク合成系の指標の血漿中 IGF-1 レベルの低下、握力測定による筋力の低下

などが 24 週齢以降の SDT fatty ラットで確認された。一方、筋タンパク分解系の評価については、骨格筋蛋白の分解系マーカーである Murf-1 及び Atrogin-1 の mRNA 量測定を実施したが、いずれの週齢の SDT fatty ラットにおいても両因子の mRNA 発現レベルの増加は認められなかった。

骨格筋の病理組織検査においては、SD ラットは加齢性に筋線維の面積が増加したのに対し、SDT fatty ラットは加齢に伴う筋線維面積の増加の程度が小さく、その程度は II 型筋線維が I 型筋線維に比べて明らかであった。これは加齢性の筋萎縮が白筋優位に進行するという文献報告に一致していた。SDT fatty ラットの骨格筋では脂肪膜蛋白である adipophilin についての免疫染色で陽性となる微小空胞が認められた。また透過型電子顕微鏡学的検査を実施し、光顕的にみとめられた微小空胞が脂肪滴の沈着であることが明らかとなった。筋内脂肪蓄積は、インスリン抵抗性に関連するということが知られる他、近年では筋量低下や筋力低下などを誘導するという報告もなされており、本ラットの筋萎縮性変化に関連している可能性が示唆された。さらに、SDT fatty ラットの骨格筋線維のミトコンドリアには形態異常が認められることが電顕的に示された。骨格筋の機能及び形態の調節にミトコンドリアは深く関わっており、本ラットの骨格筋の萎縮性変化においてもミトコンドリアの機能異常が関与している可能性が示唆された。さらに、骨格筋の機能的解析として、8、24 及び 40 週齢の動物を用いて小動物用握力測定装置を用いた前肢筋力（握力）測定を実施した。SDT fatty ラットは 24 及び 40 週齢において、SD ラットに比較して筋力の低下を示した。

以上、SDT fatty ラットにおいて、筋量減少、筋力低下、筋蛋白合成系シグナルの低下などサルコペニアの指標となる病態生理学的変化が捉えられた（図 2-28）。SDT fatty ラットは糖尿病・肥満サルコペニアのモデルとして有用である可能性が示唆された。

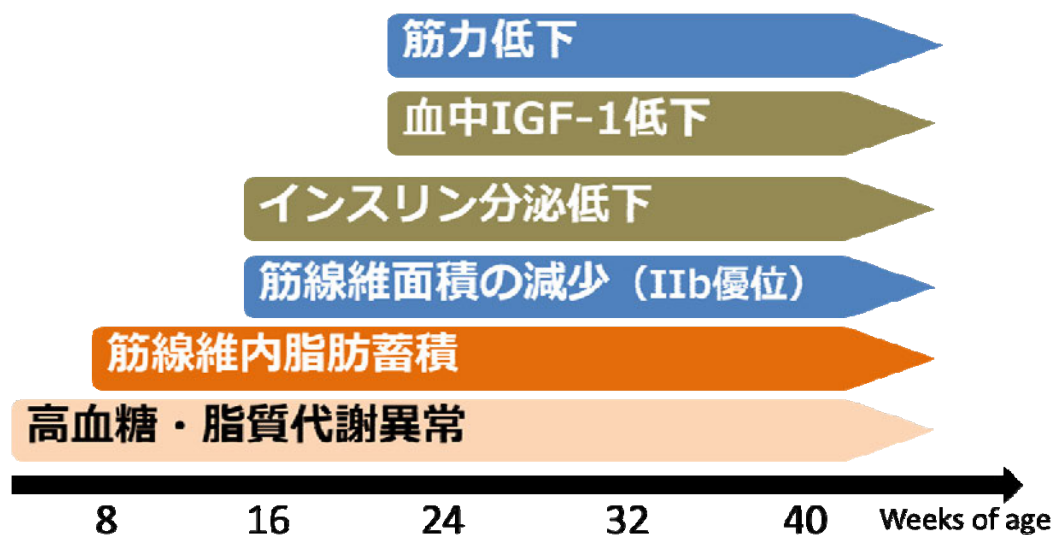


図 2-28 SDT fatty ラットの骨格筋の病態生理学的特徴まとめ

第5章 総 括

サルコペニアは骨格筋量の減少と筋力の低下で定義される老年症候群である。60 歳以上の 10%の人が筋量低下を示し、80 歳以上となるとそれが 50%に上がるといわれる。高齢化社会ではサルコペニアはより重要な健康問題となり、特に先進国で深刻となる。現状、サルコペニアを適応とする薬剤はなく、有用な治療法はない。サルコペニアの病態メカニズムの解明及び有効な薬剤開発が望まれる。糖尿病はサルコペニアを増悪されることが知られているが、そのメカニズムの詳細は解明されていない。本研究では、肥満 2 型糖尿病モデルの SDT fatty ラットを用いて、骨格筋の病態生理学的解析を実施し、糖尿病に関連したサルコペニアモデルとしての有用性を検討した。

SD ラットの体重は 40 週齢まで加齢に従い増加した。SDT fatty ラットの体重は過食及び肥満により 8 週齢で SD ラットと比較して 23%高値を示したが、16 週齢以降は SD ラットよりも低値であった。SDT fatty ラットは、離乳後から過食による肥満を呈して体重が増加するが、今回の試験と同様に 16 週齢以降に正常対照よりも体重が低下することが報告されている。SDT fatty ラットの血清グルコース、TG、TC レベルは 8 週齢時に有意に高値を示した。血清インスリンレベルは 8 週齢で高値を示した後、16 週齢で急激に低下し以降低値を示した。SDT fatty ラットの骨格筋重量は、SD ラットと比較して、16 週齢から低値を示した。その傾向はヒラメ筋（I 型筋）より長趾伸筋（II 型筋）で明らかであった。8 週齢から 40 週齢までの骨格筋重量の増加率を両ラットで比較すると、SDT fatty ラットでは加齢による骨格筋の重量増加の程度が極めて低いことが明らかとなった。

骨格筋の病理組織検査においては、8 週齢時の両ラットの骨格筋の組織像には大きな違いはなかった。SD ラットは加齢性に筋線維の面積が増加したのに対し、SDT fatty ラットは加齢に伴う筋線維面積の増加の程度が小さく、その程度は II 型筋線維が I 型筋

線維に比べて顕著であった。これは加齢性の筋萎縮が白筋優位に進行するという文献報告に一致していた。SDT fatty ラットの骨格筋では筋線維内に微小空胞の増加が認められた。脂肪膜蛋白である adipophilin についての免疫染色を実施したところ、微小空胞が陽性を示した。また透過型電子顕微鏡学的検査を実施し、光顕的にみとめられた微小空胞が脂肪滴の沈着であることを確認した。筋線維内脂肪蓄積は、インスリン抵抗性に関連するということが知られる他、近年では筋量低下や筋力低下などを誘導するという報告もなされており、本ラットの筋萎縮性変化に関連している可能性が示唆された。さらに、SDT fatty ラットの骨格筋線維のミトコンドリアには形態異常（内部構造の崩壊）が認められることが電顕的に明らかになった。骨格筋の機能及び形態の調節にミトコンドリアは深く関わっており、本ラットの骨格筋の萎縮性変化においてもミトコンドリアの機能異常が関与している可能性が示唆された。

骨格筋の蛋白合成系で重要な役割を果たす成長ホルモンの一種である血中 IGF-1 濃度を測定したところ、SDT fatty ラットは 24 週齢から SD ラットに比較して有意な低下を示した。IGF-1 シグナルの低値は高齢者や肥満者の筋力低下に関連すると報告されており、本検討においても骨格筋の萎縮性変化に関連している可能性が示唆された。一方、分解系の評価については、骨格筋蛋白の合成系分解系マーカーMurf-1 及び Atrogin-1 の mRNA 量測定を実施した。いずれの週齢の SDT fatty ラットにおいても Murf-1 及び Atrogin-1 の mRNA 発現レベルの増加は認められなかった。

さらに、骨格筋の機能的解析として、8、24 及び 40 週齢の動物を用いて小動物用握力測定装置を用いた前肢筋力（握力）測定を実施した。SDT fatty ラットは 24 及び 40 週齢において、SD ラットに比較して筋力の低下を示した。

以上、SDT fatty ラットにおいて、筋量減少、筋力低下、筋蛋白合成系シグナルの低下などサルコペニアの指標となる変化が捉えられた。SDT fatty ラットは糖尿病・肥満サルコペニアのモデルとして有用である可能性が示唆された。

謝辞

本論文は、新潟大学 大学院 自然科学研究科 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。この博士論文を作成するにあたり、多くの方々のご支援ご協力を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

山田宜永教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。また本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました本学 高田良三教授、中野優教授、杉山稔恵准教授、放送大学新潟学習センター 新村末雄所長、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 太田毅主席研究員には副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、職場の上司、同僚及び実験協力者など多くの方々のご支援をいただきました。皆様のご理解とご協力なくしては、本論文が完成に至ることはありませんでした。

最後に、研究生活を温かく見守ってくれた家族に感謝します。研究と論文執筆を進める上で、家族の存在は大きな励ましであり、心の支えでした。

引用文献

- Ali S, Garcia JM. 2014. Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review. *Gerontology*. 60: 294-305.
- Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. 2014. Regulation of Satellite Cell Function in Sarcopenia. *Front Aging Neurosci*. 6: 1-15.
- Andersen H, Stålberg E, Gjerstad MD, Jakobsen J. 1998. Association of muscle strength and electrophysiological measures of reinnervation in diabetic neuropathy. *Muscle Nerve*. 21: 1647-1654.
- Andersen H, Nielsen S, Mogensen CE, Jakobsen J. 2004. Muscle strength in type 2 diabetes. *Diabetes*. 53: 1543-1548.
- Andersen H. 2012. Motor dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 228 Suppl 1:89-92.
- Argiles JM, Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. 1999. Mechanism for the increased skeletal muscle protein degradation in the obese Zucker rat. *J Nutr Biochem*. 10: 244-248.
- Arnold AS, Egger A, Handschin C. 2011. PGC-1 α and myokines in the aging muscle - a mini-review. *Gerontology*. 57: 37-43.
- Aughsteeen AA, Khair AM, Suleiman AA. 2006. Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. *JOP*. 7: 382-389.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. 1998. Viral mediated expression of insulinlike growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:15603-15607.
- Basualto-Alarcón C, Varela D, Duran J, Maass R, Estrada M. 2014. Sarcopenia and Androgens: A Link between Pathology and Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5: 217.
- Benbassat CA, Maki KC, Unterman TG. 1997. Circulating levels of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate levels and anthropometric measures. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 1484-1491.
- Buford TW, Anton SD, Judge AR, Marzetti E, Wohlgemuth SE, Carter CS, Leeuwenburgh C, Pahor M, Manini TM. 2010. Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. *Ageing Res Rev*. 9: 369-383.
- Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, et al. 2007. Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc*. 55:1216-1223.
- Cederholm T, Sylvén C, Esbjörnsson-Liljedahl M, Jansson E. 2000. Insulin treatment increases

- skeletal muscle fibre area in patients with diabetes mellitus type 2. *Clin Physiol.* 20: 354-359.
- Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. 2000. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 89: 1365-1379.
- Cleasby ME, Jamieson PM, Atherton PJ. 2016. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J Endocrinol.* 229: R67-81.
- Conte M, Vasuri F, Trisolino G, Bellavista E, Santoro A, Degiovanni A, Martucci E, D'Errico-Grigioni A, Caporossi D, Capri M, Maier AB, Seynnes O, Barberi L, Musarò A, Narici MV, Franceschi C, Salvioli S. 2013. Increased Plin2 expression in human skeletal muscle is associated with sarcopenia and muscle weakness. *PLoS One.* 8:e73709.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M; European Working Group on Sarcopenia in Older People. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 39: 412-423.
- Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL, Perrimon N. 2013. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis Model Mech.* 6: 1339-1352.
- Gumucio JP, Mendias CL. 2013. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine.* 43: 12–21.
- Han HJ, Kang CW, Park SH. 2006. Tissue-specific regulation of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in male diabetic rats in vivo and in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:1172–1179.
- Hawke TJ, Garry DJ. 2001. Myogenic satellite cells : physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 91: 534-551.
- Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC. 1991. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev.* 60: 199-213.
- Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, Houmard JA, Pories WJ, Israel RG, Dohm GL. 1995. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol.* 268(3 Pt 1):E453-457.
- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R. 2004. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc.* 52: 80-85.
- Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. 2014. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2:

819-829.

- Katsuda Y., Ohta T, Miyajima K, Kemmochi Y, Sasase T, Tong B, Shinohara M, Yamada T. 2014. Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Exp. Anim.* 63: 121–132.
- Katznelson L, Kleinberg D, Vance ML, Stavrou S, Pulaski KJ, Schoenfeld DA, Hayden DL, Wright ME, Woodburn CJ, Klibanski A. 2001. Hypogonadism in patients with acromegaly: data from the multi-centre acromegaly registry pilot study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 54:183-188. Erratum in: *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:699.
- Kemmochi Y, Fukui K, Maki M, Kimura S, Ishii Y, Sasase T, Miyajima K, Ohta T. 2013. Metabolic disorders and diabetic complications in spontaneously diabetic Torii Leprfa rat: a new obese type 2 diabetic model. *J Diabetes Res.* 2013: 948257.
- Kemp JG, Blazev R, Stephenson DG, Stephenson GMM. 2009. Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. *Int J Obes.* 33: 831–841.
- Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S, Nejati V. 2013. Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed.* 3:347-355.
- Kim MS, Lee DY. 2015. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins axis in diabetes mellitus. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 20: 69–73.
- Kim TN, Choi KM. 2013. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *J Bone Metab.* 20: 1-10.
- Kohara K. 2014. Sarcopenic obesity in aging population: current status and future directions for research. *Endocrine.* 45:15-25.
- Komaki K, Ohno Y, Aoki N. 2005. Gonadal hormones and gonadal function in type 2 diabetes model OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) rats. *Endocr J.* 52: 345-351.
- Lee CG, Boyko EJ, Barrett-Connor E, Miljkovic I, Hoffman AR, Everson-Rose SA, Lewis CE, Cawthon PM, Strotmeyer ES, Orwoll ES; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Research Group. 2011. Insulin sensitizers may attenuate lean mass loss in older men with diabetes. *Diabetes Care.* 34: 2381-2386.
- Long YC, Cheng Z, Copps KD, White MF. 2011. Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Mol Cell Biol.* 31: 430–441,
- Maekawa T, Tadaki H, Sasase T, Motohashi Y, Miyajima K, Ohta T, Kume S. 2017. Pathophysiological profiles of SDT fatty rats, a potential new diabetic peripheral neuropathy model. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 88(Pt 2):160-166.

- Marzetti E, Lees HA, Wohlgemuth SE, Leeuwenburgh C. 2009. Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *Biofactors*. 35: 28-35.
- Masuyama T, Katsuda Y, Shinohara M. 2005. A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Leprfa* allele of the Zucker fatty rat into nonobese spontaneously diabetic Torii (SDT) rats. *Exp. Anim.* 54: 13–20.
- Matsui K, Ohta T, Oda T, Sasase T, Ueda N, Miyajima K, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M. 2008. Diabetes-associated complications in spontaneously diabetic Torii fatty rats. *Exp. Anim.* 57: 111–121.
- Mavalli MD, DiGirolamo DJ, Fan Y, Riddle RC, Campbell KS, van Groen T, Frank SJ, Sperling MA, Esser KA, Bamman MM, Clemens TL. 2010. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest.* 120:4007-4020.
- Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. 1979. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol.* 1:233-236.
- Morinaga H, Ohta T, Matsui K, Sasase T, Fukuda S, Ito M, Ueda M, Ishii Y, Miyajima K, Matsushita M. 2009 Effect of food restriction on adipose tissue in spontaneously diabetic Torii fatty rats. *Exp Diabetes Res.* 2009: 715057.
- Morley JE, Anker SD, von Haehling S. 2014. Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology-update 2014. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 5: 253-259.
- Morley JE. 2012. Sarcopenia in the elderly. *Fam Pract.* 29:i44-i48.
- Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick E, Goodpaster B, Nevitt M, Kritchevsky SB, Tyllavsky FA, Rubin SM, Harris TB, Health ABC Study Investigators. 2003. Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function. *J Am Geriatr Soc.* 51: 1602-1609.
- Oger-Roussel S, Behr-Roussel D, Caisey S, Kergoat M, Charon C, Audet A, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. 2014. Bladder and erectile dysfunctions in the Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 306: R108-117.
- Ohta T, Katsuda Y, Miyajima K, Sasase T, Kimura S, Tong B, Yamada T. 2014. Gender Differences in Metabolic Disorders and Related Diseases in Spontaneously Diabetic Torii-*Leprfa* Rats. *J Diabetes Res.* 2014: 841957.
- Ozaki K, Matsuura T, Narama I. 2001. Histochemical and morphometrical analysis of skeletal muscle in spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Acta Neuropathol.* 102: 264-270.

- Pani G, Cavallucci V, Bartoccioni E. 2016. Age-Related Sarcopenia: Diabetes of the Muscle?. *Journal of Clinical and Molecular Endocrinology*. 1: 29.
- Park SW, Goodpaster BH, Strotmeyer ES, de Rekeneire N, Harris TB, Schwartz AV, Tylavsky FA, Newman AB. 2006. Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes*. 55: 1813-1818.
- Park SW, Goodpaster BH, Strotmeyer ES, Kuller LH, Broudeau R, Kammerer C, de Rekeneire N, Harris TB, Schwartz AV, Tylavsky FA, Cho YW, Newman AB. 2007. Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes Care*. 30: 1507-1512.
- Park SW, Goodpaster BH, Lee JS, Kuller LH, Boudreau R, de Rekeneire N, Harris TB, Kritchevsky S, Tylavsky FA, Nevitt M, Cho YW, Newman AB; Health, Aging, and Body Composition Study. 2009. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 32: 1993-1997.
- Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. 1996. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 271: E340–E347,
- Rosenberg I. 1989. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr*. 50: 1231–1233.
- Saito TR, Tatsuno T, Takeda A, Hashimoto H, Suzuki M, Terada M, Aoki-Komori S, Tanaka M, Koranyi L, Nagy GM. 2004. Effects of i.c.v. administration of leptin on copulatory and ingestive behavior in STZ-induced diabetic male rats. *Exp Anim*. 53:445-451.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 91: 1447-1531.
- Schrager MA, Metter EJ, Simonsick E, Ble A, Bandinelli S, Lauretani F, Ferrucci L. 2007. Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J Appl Physiol*. 102:919-925.
- Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, Santanna J, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Kapoor SC, Atkinson LE, Strom BL. 2000. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 85: 2670-2677.
- Sitnick M, Bodine SC, Rutledge JC. 2009. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. *J Physiol*. 587: 5753–5765.
- Sugimoto K. 2014. [Transdisciplinary Approach for Sarcopenia. The application of life style

- diseases-animal models to the research for sarcopenia]. [article in Japanese]. Clin Calcium. 24: 1479-1486.
- United Nations. 2013. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World Population Ageing.
- Vincent HK, Raiser SN, Vincent KR. 2012. The aging musculoskeletal system and obesity-related considerations with exercise. Ageing Res Rev. 1: 361-373.
- von Haehling S, Morley JE, Anker SD. 2010. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 1: 129-133.
- Wang CP, Hazuda HP. 2011. Better glycemic control is associated with maintenance of lower-extremity function over time in Mexican American and European American older adults with diabetes. Diabetes Care. 34: 268-273.
- Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. 2006. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. Endocrinology. 147: 4160-4168.
- Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. 2011. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. Science. 334:678-683.
- 荒木厚、千葉優子. 2011. 糖尿病患者における転倒—糖尿病合併症、身体能力低下、血糖コントロールとの関連. 医学のあゆみ. 239: 457-461.
- 稲葉信博、剣持佑介、龍門徳彦、平尾直啓、山中沙織、千葉薫、太田毅、山田宜永、美谷島克宏. 2016. 非肥満2型糖尿病モデル雄性SDTラットの精子形成における病態生理学的変化. 北信越畜産学会報 112: 1-7.
- 江頭正人. 2014. サルコペニアとアンドロゲン. 医学のあゆみ 248: 686-690.
- 亀井康富、小川佳宏. 2015. 骨格筋からみた糖尿病の病態と治療. 月刊糖尿病. 1: 2-7.
- 葛谷雅文. 2014. 原発性ならびに二次性サルコペニアと動物モデル. 248: 696-700.
- 葛谷雅文. 2015. 超高齢社会におけるサルコペニアとフレイル. 日内会誌. 104: 2602-2607.
- 葛谷 雅文. 2016. サルコペニアと栄養. 外科と代謝・栄養. 50: 1-6.
- 笹子敬洋、植木浩二郎. 2016. 筋肉と栄養素. 医学のあゆみ. 259(10): 1067-1071.
- 下方浩史、安藤富士子. 2012. 日常生活機能と骨格筋量、筋力との関連. 第53回日本老年医学会学術集会記録. 日老医誌. 49: 195-198.
- 杉本研. 2013. 生活習慣病モデル動物のサルコペニア研究への応用. 第55回日本老年

- 医学会学術集会記録. 日老医誌. 50 : 766—769.
- 内閣府平成 29 年版高齢社会白書. 2017. p2-6.
- 田中政道、長谷川浩、神崎恒一. 2014. サルコペニアとフレイルティ. 医学のあゆみ. 248: 659-664.
- 山田陽介. 2014. 骨格筋量・筋力の評価法. 医学のあゆみ. 248: 670-678.
- 理学療法科学学会. 2011. 臨床運動学 第 6 版. 第 4 章 筋の障害. p19.

Summary

Sarcopenia is the age-related decrease of muscle mass and function. Diabetes and obese are known to be risk factors to exacerbate sarcopenia but the underlying mechanism of diabetes-related sarcopenia is still unknown. An obese type 2 diabetes SDT fatty rat shows an early onset of severe diabetes and there have been no reports on the characteristics of their skeletal muscle. Therefore, pathophysiological analyses were performed for the skeletal muscle in this rat. Diabetic male SDT fatty rats were sacrificed at 8, 16, 24, 32 and 40 weeks of age. Age-matched Sprague-Dawley (SD) rats were used as the normal control. In addition to biological blood parameters, the soleus and the extensor digitorum longus muscles were examined for muscle weight, histopathology and protein synthesis and degradation. Muscle grip strength was also examined. As results, muscle weights of the SDT fatty rats were significantly decreased from 16 weeks of age. The mean cross-sectional area of muscle fibers in the SDT fatty rat decreased from 24 weeks of age. Increased intramyocellular lipid accumulation was observed in the SDT fatty rats from 8 weeks of age, identified by immunohistochemistry for adipophilin and TEM. Plasma insulin-like growth factor (IGF)-1 levels and muscle strength in the SDT fatty rats decreased at 24 weeks of age thereafter. These pathophysiological findings have been reported both in the sarcopenia in aged humans and in patients with diabetes. This study is the first report of skeletal muscle pathology in SDT fatty rats. SDT fatty rats showed severe metabolic disorders including hyperglycemia and hyperlipidemia at younger age than other diabetic rat models and was accompanied by decreases in muscle weight, muscle

strength, muscle fiber area and protein synthesis hormone (IGF-1), an increase in IMCL and abnormal mitochondrial morphology. These results suggested that the sarcopenia secondary to impaired glycolipid metabolism was observed in the skeletal muscle of the SDT fatty rats. There have been little reports of comprehensive pathophysiological analyses of the skeletal muscle using diabetic rodent models. In conclusion, SDT fatty rat was considered to be a useful model for analysis of diabetes-related sarcopenia. Details of changes of muscle fiber type proportion, mitochondrial oxidative activity and regenerative potential in skeletal muscle in SDT fatty rats are yet to be investigated. Further investigation of skeletal muscle in the SDT fatty rat is needed.