

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

サルコペニアに対する栄養介入療法の確立へ向けた基礎的研究（20-46）

主任研究者 宮川 良博 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究要旨

骨格筋は加齢とともにその量が減少し、また機能低下をきたすことがよく知られているが、その発症メカニズムは依然として明らかとなっていない。本研究では、加齢による骨格筋の質的变化を“エネルギー代謝”の観点から解析し、培養細胞とマウスモデルを用いて「栄養素に対する感受性の変化」と「サルコペニア」をつなぐメカニズムについて検討した。はじめに培養細胞を用いて骨格筋の悪液質モデルを作製し、細胞径の変化と筋タンパク質異化経路に関連する因子の発現量の変化を定量した。次に、若齢と高齢のマウスからそれぞれ骨格筋を採取し、トランスクリプトーム解析（RNA-sequencing）を行い、発現変動遺伝子を検出した。その結果、培養細胞を用いた悪液質モデルにおいて、筋細胞径が有意に小さくなり、筋萎縮関連因子の発現量が有意に増加した。また高齢マウスの骨格筋では、3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity、positive regulation of interleukin-2 production、cellular component に関与する遺伝子の発現増加、collagen binding、biological process、extracellular matrix に関与する因子の発現減少を認めた。さらにパスウェイ解析を行った結果、インスリンを介した糖代謝に関与する因子、プリン代謝に関与する因子の発現量の変動が認められた。これらのエネルギー代謝の変化がどのようなメカニズムで骨格筋の維持に影響を及ぼすかについては未だ明らかでないが、今回作成した *in vitro* モデルも併用し詳細なメカニズムについて検討する。

主任研究者

宮川 良博 国立長寿医療研究センター 流動研究員

A. 研究目的

骨格筋は、関節運動を引き起こす運動器であるとともに、生涯にわたって糖質の恒常性を維持するために不可欠な代謝器官である (Otto et al., *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw.* 2003)。骨格筋の代謝機能は健康を維持するために重要であり、筋量、筋力を維持、向上させることが、寿命を延伸し生活の質を改善することが示されている (Ruiz et al., *BMJ.* 2008)。全身のタンパク質の 80%以上を占める骨格筋 (Heymsfield et al., *Am J Clin Nutr.* 1982) は、タンパク質の代謝回転のバランスを調整することによって制御されるが (Jagoe et al., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001)、加齢とともにこのバランスは負に制御され筋量減少と筋力低下をきたす。このような加齢に伴う骨格筋の減弱は“サルコペニア”と呼ばれ、運動などによる同化作用に抵抗性を示すこと (Balage et al., *J Nutr Biochem.* 2010) や、オートファジーの機能低下による p62/SQSTM1 の蓄積 (Sakuma et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016) が報告されているが、その発症や増悪の詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

実臨床におけるサルコペニアの治療は、栄養介入とリハビリテーションを軸として進められるが (Laviano et al., *Adv Food Nutr Res.* 2014)、栄養介入による筋萎縮の改善効果についてはバラツキがみられ (Bauer et al., *J Am Med Dir Assoc.* 2015; Amasene et al., *Nutrients.* 2019) 確立した治療法とは言い難い。このような治療効果のバラツキは、「各栄養素に対する骨格筋の感受性の分子機構」や「加齢による感受性分子機構への影響」などが未解明であることに起因する。つまり、適切な栄養介入を確立する上で、この分子機構を解明することが不可欠であり、またこれはサルコペニア発症のメカニズム解明にも寄与することが期待される。

そこで本研究では、加齢による骨格筋の質的变化を“エネルギー代謝”の観点から解析し、「骨格筋の栄養素に対する感受性の加齢性変化」と「サルコペニア」をつなぐメカニズムを明らかにすることを目的に、主にマウスや培養細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

筋萎縮モデルとして、マウス骨格筋細胞株 Ric10 とマウス大腸がん細胞株 C26 を用いて *in vitro* がん悪液質モデルを作製した。12well プレート (well 底面積: 3.8cm²) に Ric10 を 2.0×10^4 個ずつ播種し、増殖培地 (20%FBS 混合 DMEM) でサブコンフルエントとなるまで CO₂ インキュベーター内 (37°C, 10% CO₂) で 48 時間培養した。サブコンフルエントを確認した後、分化培地 (2%Horse Serum 混合 DMEM) に交換し筋管細胞への分化を誘導した。さらに 48 時間後、筋管細胞の形成を確認した後に介入培地に交換し、その 48 時間後に筋細胞径を測定、また RNA を回収した。介入培地は Ric10 と C26 をそれぞれサ

ブコンフルエントで 48 時間培養した培養液を回収し、C26 の培養液を悪液質誘導培地 (Cachexia)、Ric10 の培養液をコントロール培地 (Control) としてそれぞれ使用した。

2. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

Ric10 を用いた悪液質モデルにおいて、TRI Reagent (Cosmo Bio, Ltd) を用いて全 RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) を用いて、全 RNA 2 μ g から cDNA を合成した。qPCR 反応は、SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、Nuclease-free water、Forward primer、Reverse primer、cDNA 1 μ l を混合し、CFX-96 Real-Time System (BioRad) を用いて行った。得られた結果は、GAPDH をリファレンス遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ CT 法により各因子の発現量を定量した。

3. 骨格筋発現変動因子の探索・変化する代謝経路の同定

2 ヶ月齢と 28 カ月齢の雄マウスの骨格筋について、トランスクリプトーム解析 (RNA-sequencing) を行った。得られた全ての遺伝子発現データを iDEGES で正規化し、edgeR を用いて発現変動遺伝子を検出した。発現変動が確認された遺伝子について、Go 解析 (Gene Ontology enrichment analysis) とパスウェイ解析 (KEGG_ID を使用) を行った。

(倫理面への配慮)

本研究には動物実験が含まれる。動物実験にあたっては、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会の承認を得て、3R の原則を遵守し、国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程に沿って行った。実験動物は、国立長寿医療研究センター実験動物施設内で飼育した。実験動物はすべて安楽死させ、苦痛を与えない配慮を行った。

C. 研究結果

1. *in vitro* 悪液質モデル

介入培地交換後 48 時間の時点において、筋管細胞径は Control :、Cachexia : であり、Cachexia で有意に小さかった (図 1)。また、qPCR の結果、骨格筋構造タンパク質をコードする *Myh2* の発現量が有意に減少し、筋萎縮関連因子 *Murf1* や *Atrogin1* の発現量が有意に増加することが確認された (図 2)。一方で、Myostatin のシグナル伝達因子である *Smad2* の活性化は認められなかった (図 3)。

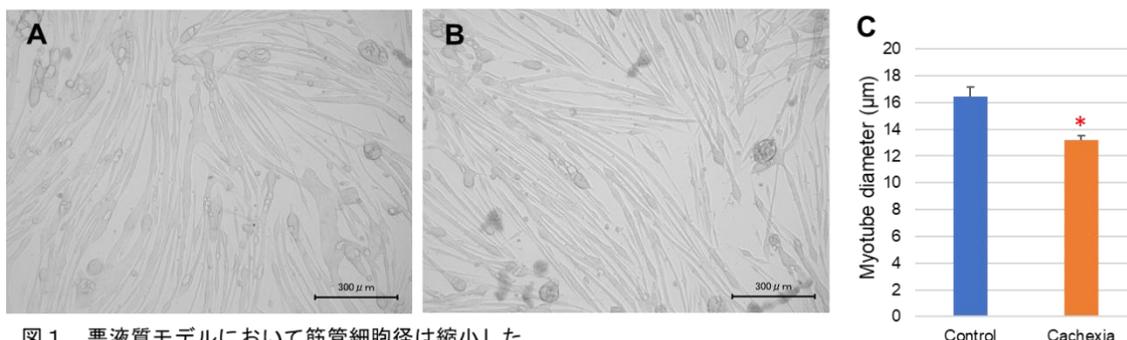


図1. 悪液質モデルにおいて筋管細胞径は縮小した
A. Control B. Cachexia C. 筋管細胞径(平均±標準偏差) * :p<0.05

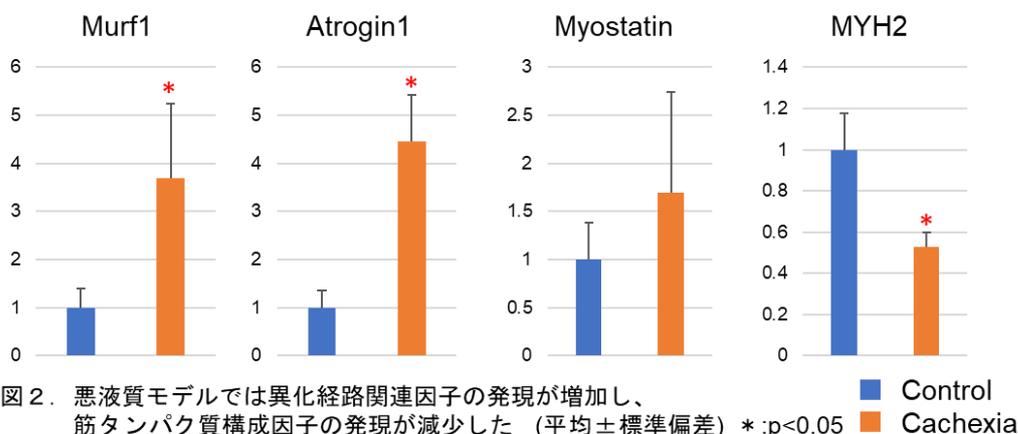


図2. 悪液質モデルでは異化経路関連因子の発現が増加し、筋タンパク質構成因子の発現が減少した (平均±標準偏差) * :p<0.05

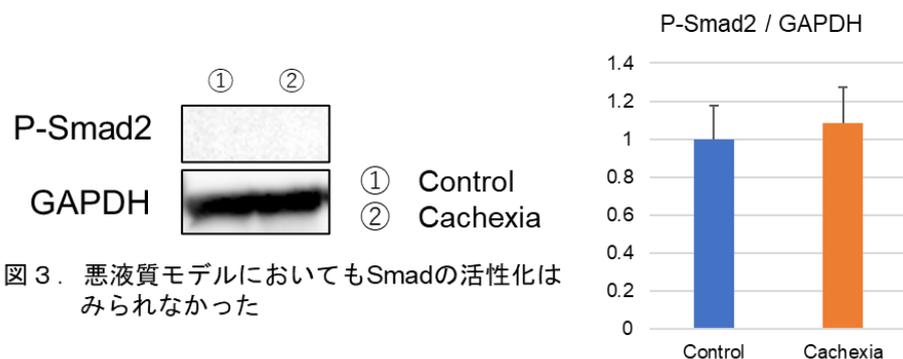


図3. 悪液質モデルにおいてもSmadの活性化はみられなかった

2. 骨格筋発現変動因子の探索・変化する代謝経路の同定

2ヶ月齢と28ヶ月齢の雄マウスの骨格筋についてトランスクリプトーム解析を行った結果、老齢マウス骨格筋で増加した遺伝子を270個、減少した遺伝子を509個同定した(779個の加齢性発現変動遺伝子)。これらの遺伝子について、Go解析を行いMolecular function、Biological process、Cellular componentについて検討したところ、高齢マウスの骨格筋で特に3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity、positive regulation of interleukin-2 production、cellular componentに關与する遺伝子の発現増加、collagen binding、biological process、extracellular matrixに關与する因子の発現減少を認めた(図4)。さらにパスウェイ解析により、エネルギー代謝に關連するパスウェイに關与する因子について高齡マウスで発現が増加したもの27個(表1)、減少したもの31個(表2)を同定した。

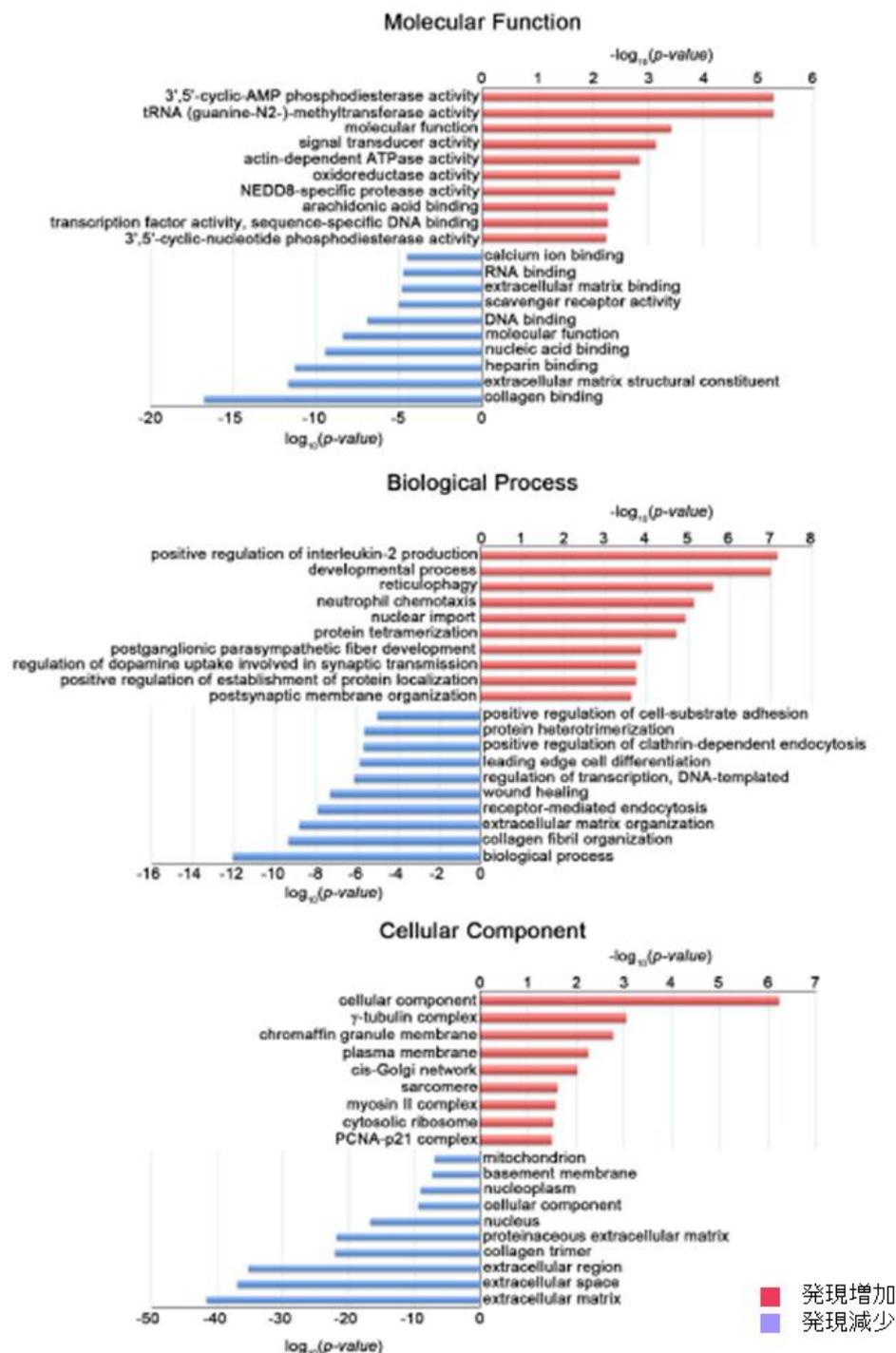


図 4. 高齢マウスにおいて発現変動のみられた因子 (Go解析)

Term	Pathway	Gene count	Gene
ko01100	Metabolic pathways	20	MAO, NQO1, kbl, ggt, GCNT2, E2.7.7.41, ACOT, AMY, ACER, AMPD, CA, ACSL, glnA, argG, ATPeV1H, B3GALT1, ADCY2, PDE4, MTHFD2, PDE7
ko00230	Purine metabolism	4	AMPD, ADCY2, PDE4, PDE7
Ko04935	Insulin signaling pathway	4	MKNK, PPP1R3, EIF4EBP1, PRKCZ
ko04152	AMPK signaling pathway	3	EEF2, EIF4EBP1, TBC1D1
ko04931	Insulin resistance	3	PPP1R3, PRKCQ, PRKCZ

表 1. 高齢マウスにおいて発現が増加した因子

Term	Pathway	Gene count	Gene
ko01100	Metabolic pathways	21	E1.1.1.30, PLOD1, SCD, FASN, PIK3C, speD, SEPSECS, ALG12, PLCD, B4GALT6, B3GALT3, ADCY7, HACD, SUV420H, SMOX, PDE3B, MBOAT1, PAPSS, PLA2G4, DNMT3Q, GADL1
ko04152	AMPK signaling pathway	8	SCD, FASN, PIK3C, LEP, IGF1, SREBP1, CREB5, IRS1
Ko04935	Insulin signaling pathway	5	FASN, PIK3C, SREBP1, PDE3B, IRS1
ko04020	Calcium signaling pathway	5	PTAFR, CAMK2, PDGFRB, PLCD, ADCY7
ko04931	Insulin resistance	4	PIK3C, SREBP1, CREB5, IRS1
ko00230	Purine metabolism	3	ADCY7, PDE3B, PAPSS

表 2. 高齢マウスにおいて発現が低下した因子

D. 考察と結論

本研究では、まず筋萎縮を誘導する *in vitro* モデルとしてマウス骨格筋細胞株 Ric10 とマウス大腸がん細胞株 C26 を用いて悪液質モデルを作製した。このモデルでは、悪液質を誘導することで *Murf1* や *Atrogin1* の発現量が増加したが、これらの因子は生体を用いたがん悪液質モデルにおいて骨格筋での発現量が同様に増加することが報告されている (Reed et al., FASEB J. 2012)。加えて筋細胞径の有意な萎縮も確認され、本モデルが悪液質による筋萎縮を一定程度反映することが示唆された。サルコペニアにおける筋萎縮においても *Murf1* の発現量が増加するとしている報告 (Altun et al., J. Biol. Chem. 2010) がある一方で、加齢における発現量の変化はないとする報告 (Gaugler et al., J. Appl. Physiol. 2011) もある。そのため本モデルをサルコペニア研究へ応用するために、IKK/NF κ B 経路などの他の筋タンパク質異化経路や、IGF-1 を介した筋タンパク質同化経路の変化についても検討する必要がある。

若齢マウスと高齢マウスの骨格筋を用いたトランスクリプトーム解析の結果から、インスリンを介した糖代謝を制御する IGF1 や IRS1 の発現量が低下することが明らかとなった。これは、加齢に伴い骨格筋での IGF1 の発現量が低下するとの報告 (Giovannini et al., *Mech Ageing Dev.* 2008)、高齢ラットにおいて若齢と比較し IRS1 の発現量が低下するとの報告 (West et al., *Front Physiol.* 2019) と一致する。また、IGF1 の過剰発現により加齢による筋萎縮が軽減するとの報告 (Ascenzi et al., *Aging Cell.* 2019) もあり、インスリンシグナルを維持することでサルコペニアを予防できる可能性があると考えられる。さらに本研究で、プリン代謝に関連する因子が骨格筋において加齢性変化を受けることが明らかとなった。高齢マウスで発現が増加した AMPD は細胞内の AMP を異化する酵素であるが、過剰発現により AMP の恒常性が破綻することが示唆されている (Nagappa et al., *Mol Microbiol.* 2019)。また PDE4 は細胞内 cAMP 濃度の主要な調節因子であるが、これに対する阻害剤の使用により除神経、四肢の固定、敗血症、または癌を伴う動物モデルの筋萎縮を軽減すること (Hinkle et al., *Muscle Nerve.* 2005)、遺伝的にノックアウトすることで火傷による筋タンパク質の分解が抑制されること (Kaumann et al., *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2009) が報告されている。つまり、高齢マウスの骨格筋ではこれらの因子の発現増加によって、細胞内での cAMP 濃度が上昇し、筋タンパク質異化経路が活性化され筋萎縮が誘導されている可能性が考えられる。一方で発現量が減少した ADCY7 は、Akt 経路の活性化を介して腫瘍の増殖を促進する (Sun et al., *Oncotarget.* 2018) こと、がん悪液質により萎縮する骨格筋で発現量が 1%にまで低下する (Martinelli et al., *Oncogene.* 2016) ことが報告されている。ADCY7 の骨格筋での機能に関する報告は今までにないが、筋の再生過程における筋衛星細胞、筋芽細胞の増殖の制御を介して骨格筋量の維持に関与している可能性が考えられ、今後より詳細に検討予定である。

本研究より、加齢に伴い骨格筋ではインスリンを介した糖代謝やプリン代謝が変化することが明らかとなった。これらのエネルギー代謝の変化がどのようなメカニズムで骨格筋の維持に影響を及ぼすかについては未だ明らかでないが、今回作成した *in vitro* モデルも併用し詳細なメカニズムについて検討する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし