

<研究課題>

サルコペニア肥満予防法の開発と高齢者医療への応用—マルチオミクス解析による検討—

代表研究者 京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科・病院助教 岡村 拓郎

【まとめ】

サルコペニアに肥満が伴う「サルコペニア肥満」はサルコペニアよりも予後が悪く、糖尿病などの生活習慣病における病態の中心になっていると考えられる。サルコペニア肥満においては、耐糖能障害のみならず、脂質代謝障害がその病態進行に寄与している可能性が本研究結果から示唆された。本研究結果は骨格筋内の脂質代謝にフォーカスした新たなサルコペニア肥満治療法の開発と高齢者医療への応用の一助となるものである。

1. 研究の目的

サルコペニアとはギリシャ語で筋肉を意味する「サルコ」と、減少の意味の「ペニア」の造語であり、高齢になるに伴い、筋肉量が減少、筋力が低下していく現象を言う。30歳頃から進行が始まり生涯を通して進行する。種々の代謝性疾患や高齢者のADL低下の原因となっており、超高齢社会において、サルコペニアの発症予防は最重要課題である。サルコペニアに肥満が伴う「サルコペニア肥満」はサルコペニアよりも予後が悪く、糖尿病などの生活習慣病における病態の中心になっていると考えられるが、詳細な機序は明らかではない。申請者は *db/db* マウスが過食と不活動による肥満に、筋肉量の減少いわゆるサルコペニアを随伴しており、骨格筋内での *Foxo1* の発現上昇が「サルコペニア肥満」の病態の中心であることを明らかとしている1)。

近年、アンバイアス・網羅的なマルチオミクス解析を行うことで疾患の特性解明や個別化医療の実践を実現し、病気の予測や、治療に役立てることが可能となっている。本研究はサルコペニア肥満の骨格筋萎縮誘導機構をリポミクス及びゲノミクス解析（マルチオミクス解析）によって明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 骨格筋内のリポミクス解析

8週齢の雄 *db/m* マウスおよび *db/db* マウス（各群 $n=6$ ）を16週齢時にサクリフェイスし、握力、骨格筋量、内臓脂肪量、ヒラメ筋断面積

の測定、免疫染色を実施した。さらにヒラメ筋 (5-15mg) および $25\mu\text{L}$ の血清から脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク）を用いて脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (Agilent 7890/7000D) により長鎖脂肪酸濃度を網羅的に解析した2)。

2-2 骨格筋内発現遺伝子のマイクロアレイ解析

骨格筋の mRNA を抽出のうえ、マイクロアレイ解析 (NovaSeq 6000) により遺伝子発現を網羅的に解析した。

2-3 マウス筋管細胞への飽和脂肪酸投与実験

マウス筋芽細胞（細胞株 C2C12, KAC Co., Ltd）を24ウェルプレートに播種し、10%牛胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した (2日目)。培地は1日おきに交換した。細胞が80%のコンフルエンスに達したとき、2%のウマ血清 (分化培地) を添加した DMEM で分化を誘導した (0日目)。C2C12 筋管細胞を $100\mu\text{M}$ のパルミチン酸で処理し、対照細胞はパルミチン酸溶液と同量の100%エタノールで96時間処理した。96時間後 (5日目)、筋管細胞に対し両群でミオシン重鎖 (MHC)、MuRF-1 の免疫染色、ウェスタンブロット法 (WB) のほか、Real-Time PCR (RT-PCR) による遺伝子発現を調べた。

2-4 統計解析

データはJMPソフトウェアバージョン13.0 (SAS, Cary, NC, USA) を用いて解析した。2群間の差は unpaired t-test で評価し、 $p<0.05$ を統計的に有意とした。図は、GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 9.0 を使用して作成した。

3. 研究の成果

3-1 握力、骨格筋量、内臓脂肪量

対照群である *db/m* マウスと比較し、サルコペニア肥満モデルマウスである *db/db* マウスでは、有意に握力は低値、内臓脂肪量は高値、骨格筋量は低値であり筋断面積は低値であった (図1)。

3-2 骨格筋、血清中の脂肪酸濃度
次に血清、骨格筋中の脂肪酸濃度を測定した。血液中のラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸濃度はサルコペニア肥満群で有意に高値であった一方で、オレイン酸濃度はサルコペニア肥満群で有意に低値であった。骨格筋内の長鎖脂肪酸も同様の傾向であった(図2)。

3-3 骨格筋内の遺伝子発現
ヒラメ筋より抽出した mRNA の発現をマイクロアレイ解析により網羅的に調べたところ、サルコペニア肥満群では *Foxo1* や *Mstn*, *Trim63*, *Fbxo32*, *Hdac4* などの筋萎縮関連遺伝子や *Fasn*, *Elovl6*, *Cd36*, *Scd1* などの脂肪酸代謝関連遺伝子の発現が有意に上昇していた(図3)。さらに骨格筋の MuRF1 の免疫染色を実施するとサルコペニア肥満群で有意に蛍光強度が高値であった(図4)。

3-4 飽和脂肪酸による筋萎縮効果
3-1~3-3の結果から、飽和脂肪酸による筋萎縮効果が疑われたため、C2C12 筋管細胞に飽和脂肪酸群(PA)として100%エタノールに溶解したパルミチン酸(100 μM)を投与し、対照群(Ctrl)は同量のエタノールのみ投与した。PA群の免疫染色では Ctrl 群と比較し、MHC の蛍光強度が有意に低下し、MuRF-1 の蛍光強度が有意に上昇した。WB でも同様の結果であった(図5)。

RT-PCR の結果、飽和脂肪酸群で筋萎縮関連遺伝子や脂肪酸代謝関連遺伝子の発現が対照群と比較して有意に上昇していた(図6)。

4. 今後の課題

サルコペニア肥満群の骨格筋では、パルミチン酸を含む飽和脂肪酸濃度が対照群に比べ有意に上昇し、骨格筋内の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、筋萎縮関連遺伝子や脂肪酸代謝関連遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。細胞実験では、パルミチン酸を投与した筋管細胞は対照群と比較して有意な筋萎縮を示し、筋萎縮や脂肪酸代謝に関連する遺伝子の発現も動物実験の結果と同様に有意に上昇した。これらの結果は、飽和脂肪酸の筋肉への過剰な蓄積が、過食や運動不足によるサルコペニア肥満における筋萎縮の一因であ

ることを示している。一方、オレイン酸は他の飽和脂肪酸と異なり、サルコペニア肥満群の骨格筋で濃度が低下していた。これまでの報告では、オレイン酸は AMPK α のリン酸化や GPR43 タンパク質の増加を誘導し、筋管細胞の分化を促進することや(3,4)、脂肪毒性の高い飽和脂肪酸による炎症性細胞死や小胞体ストレスであるパイロプトシスを抑制することが報告されている(5)。Scd1 はステアリン酸からオレイン酸への脂質合成を促進する遺伝子であることから、サルコペニア肥満群では骨格筋のオレイン酸濃度減少の代償機構として Scd1 遺伝子の発現が上昇したと考えられた。

5. 研究成果の公表方法

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition への投稿を予定している。

参考文献

- 1) Okamura T. et al. (2019) The sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin can suppress muscle atrophy in Db/Db mice by suppressing the expression of foxo1. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 65, 23-28.
- 2) Okamura T. et al. (2020) Immune modulating effects of additional supplementation of estradiol combined with testosterone in murine testosterone-deficient NAFLD model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 318, G989-G999.
- 3) Hurley MS. et al. (2006) Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation in vitro. British Journal of Nutrition; 95:623-630.
- 4) Lim JH. Et al. (2013) Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. J Biol Chem.; 288:7117-7126.
- 5) Zeng X. et al. (2020). Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. Nutrition and Metabolism;17: 11.

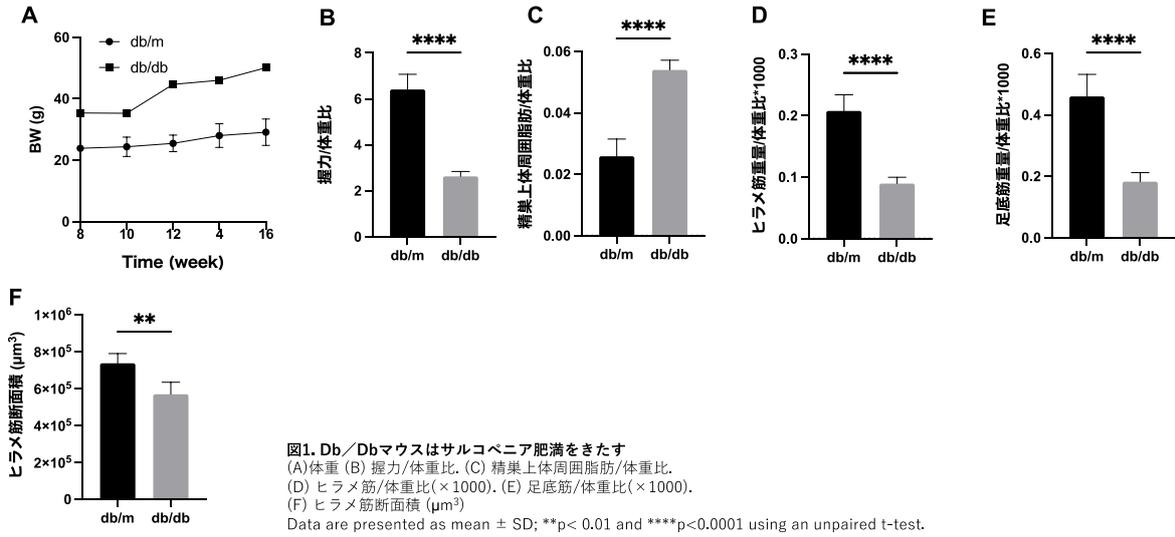


図1. Db/Dbマウスはサルコペニア肥満をきたす (A)体重 (B) 握力/体重比, (C) 精巣上体周囲脂肪/体重比, (D) ヒラメ筋/体重比(×1000), (E) 足底筋/体重比(×1000), (F) ヒラメ筋断面積 (μm²) Data are presented as mean ± SD; **p<0.01 and ****p<0.0001 using an unpaired t-test.

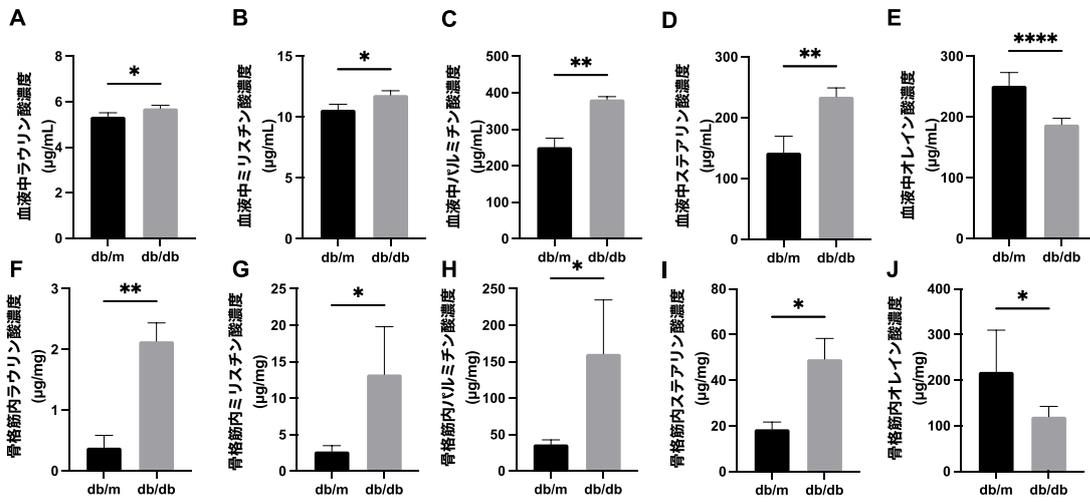


図2. サルコペニア肥満モデルマウスでは骨格筋、血清中の飽和脂肪酸濃度が上昇する 血液中の(A)ラウリン酸, (B) ミリスチン酸, (C) パルミチン酸, (D) ステアリン酸, (E) オレイン酸濃度。 骨格筋中の(F)ラウリン酸, (G) ミリスチン酸, (H) パルミチン酸, (I) ステアリン酸, (J) オレイン酸濃度。 Data are presented as mean ± SD; *p<0.05, **p<0.01, and ****p<0.0001 using an unpaired t-test.

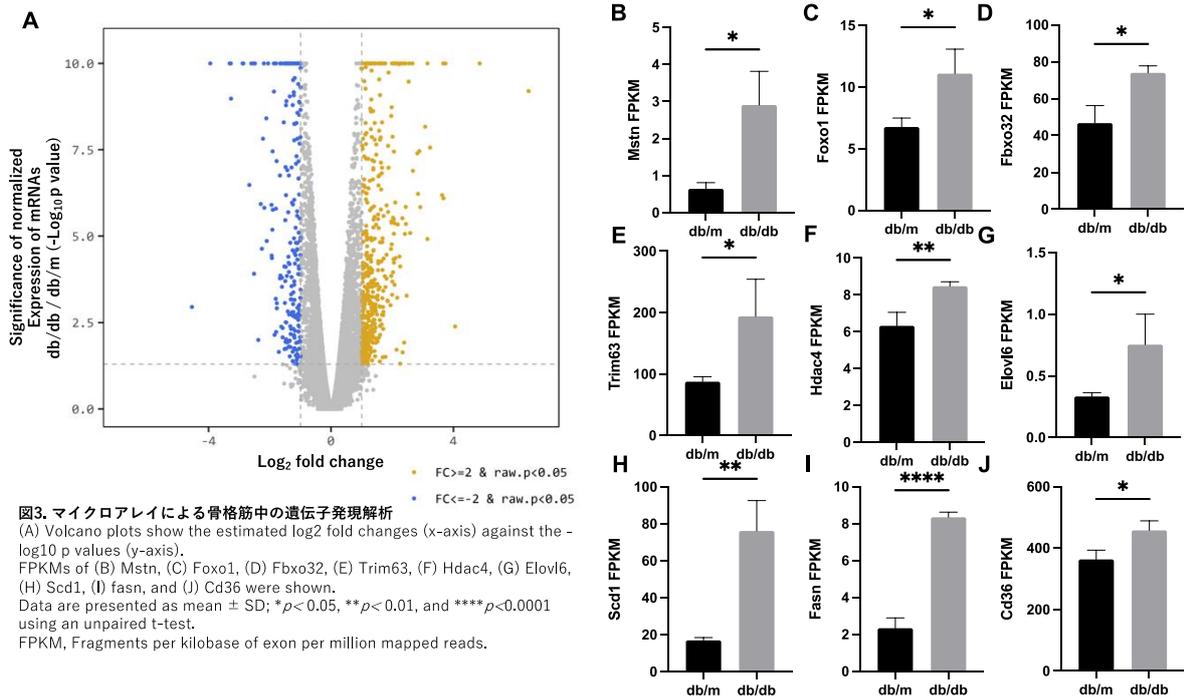


図3. マイクロアレイによる骨格筋中の遺伝子発現解析 (A) Volcano plots show the estimated log₂ fold changes (x-axis) against the -log₁₀ p values (y-axis). FPKMs of (B) Mstn, (C) Foxo1, (D) Fbxo32, (E) Trim63, (F) Hdac4, (G) Elovl6, (H) Scd1, (I) fasn, and (J) Cd36 were shown. Data are presented as mean ± SD; *p<0.05, **p<0.01, and ****p<0.0001 using an unpaired t-test. FPKM, Fragments per kilobase of exon per million mapped reads.

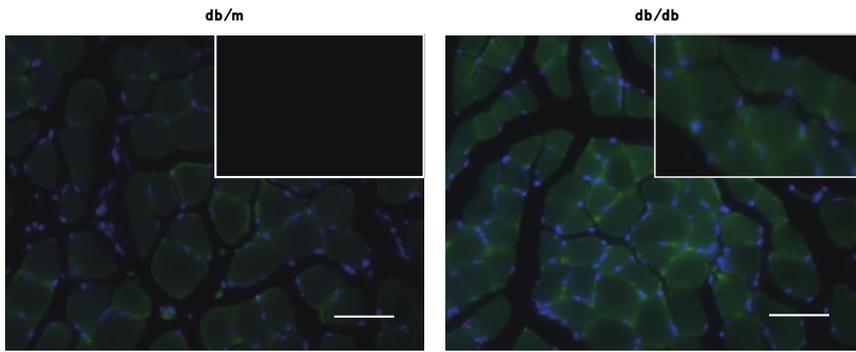


図4. 骨格筋の免疫染色(MuRF-1)
Green: MuRF1, Blue: DAPI. Scale bar, 50 μ m.

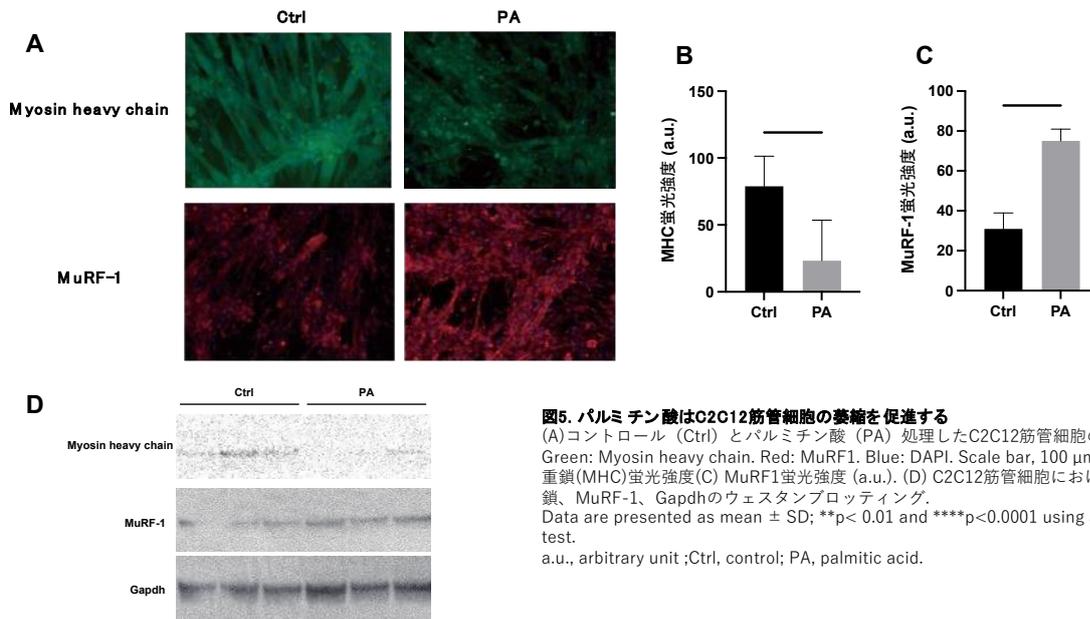


図5. パルミチン酸はC2C12筋管細胞の萎縮を促進する
(A)コントロール (Ctrl) とパルミチン酸 (PA) 処理したC2C12筋管細胞の免疫染色。Green: Myosin heavy chain. Red: MuRF1. Blue: DAPI. Scale bar, 100 μ m. (B) ミオシン重鎖(MHC)蛍光強度(C) MuRF1蛍光強度 (a.u.). (D) C2C12筋管細胞におけるミオシン重鎖、MuRF-1、Gapdhのウェスタンブロットティング。
Data are presented as mean \pm SD; ** p < 0.01 and **** p < 0.0001 using an unpaired t-test.
a.u., arbitrary unit ;Ctrl, control; PA, palmitic acid.

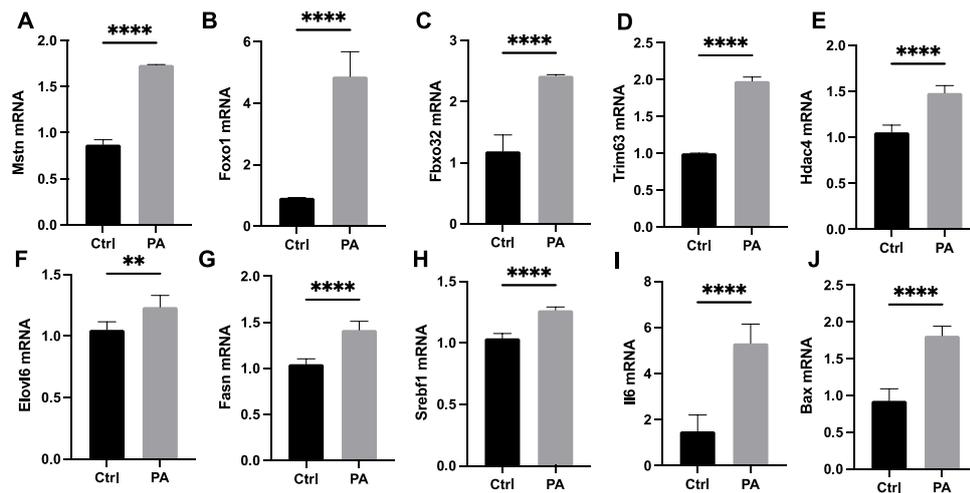


図6.パルミチン酸は、筋萎縮、脂肪酸合成、炎症、アポトーシスに関連する遺伝子の発現を増加させる
mRNA levels in C2C12 myotube cells of (A) Mstn, (B) Foxo1, (C) Fbxo32, (D) Trim63, (E) Hdac4, (F) Elovl6, (G) Fasn, (H) Srebf1, (I) Il6, (J) Bax.
Data are presented as mean \pm SD; ** p < 0.01 and **** p < 0.0001 using an unpaired t-test.
Ctrl, control; PA, palmitic acid.