

# ビタミンDによるサルコペニアの予防・改善の分子基盤の解析

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科

分子栄養学研究室

亀井 康富

---

## 【序章】

骨格筋は運動・糖取込み・エネルギー代謝に重要であるため、適度な運動・適切な食事によって骨格筋機能を保持することは健康増進に重要である。しかしながら、サルコペニアと呼ばれる加齢や不活動・低栄養・疾患などによる筋萎縮・筋機能低下（図1）が超高齢社会を迎えた我が国で問題となっている。加齢に伴いサルコペニアの有病率は増加しており、発症すると寝たきりや車いす生活を余儀なくされるなど、生活の質の低下、医療・介護費の増大が生じてしまう。

近年サルコペニアとビタミンDの関係が示唆されている。ビタミンDは脂溶性ビタミン（図2）であり、核内受容体であるビタミンD受容体を介して遺伝子発現を調節するが、核内受容体を介さない作用も報告されている。体内では骨ホメオスタシスを制御していることがよく知られているほか、骨格筋を含む多くの組織で重要な役割を担っている。ヒト体内のビタミンDの充足・不足の基準は設けられているが、サルコペニアを発症するような高齢者ではビタミンDが不足・欠乏している場合が多い（図3）。また、血中ビタミンD濃度と高齢者の活動量や転倒リスク、筋力・筋量との関係が示唆されている。さらに高齢者にビタミンDを投与すると筋サイズが増大することも報告されている。しかし、その分子機序についてはよくわかっていない。

我々は筋萎縮を引き起こす重要な因子である転写因子FOXO1に着目して研究を行ってきた（図4）。その過程でビタミンDがFOXO1を抑制するデータが得られた。すなわちビタミンDによる筋萎縮の抑制が示唆され、その分子機序解明につながる知見が得られた。本稿ではこれらのビタミンDによるFOXO1の抑制を介した筋萎縮抑制効果の研究結果について報告する。

## 【第1章】

FOXO1の転写活性を抑制する化合物のスクリーニング

### 1-1 要旨

骨格筋は人体最大の組織であり、運動や糖取込み、エネルギー代謝などの重要な役割を果たしている。低栄養や加齢、寝たきりなどの不活動、がんなどの疾患によって骨格筋が萎縮することが知られている。筋萎縮が生じると、エネルギー消費の減少による肥満や糖取込み能の減少による糖尿病の発症、そして生活の質（QOL）の低下へとつながる。筋萎縮時に骨格筋においてフォークヘッド型転写因子O1（FOXO1）の発現が増加することが知られており、これによりユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーの亢進といったタンパク質分解に関わる遺伝子の発現が増加する。さらに、骨格筋特異的なFOXO1過剰発現マウスの解析で、骨格筋の減少が観察されている。これらの結果はFOXO1が筋萎縮を引き起こす原因の一つであることを示しており、その転写活性を抑制することは筋萎縮予防のために有効であると考えられる。そこで本研究ではFOXO1

の転写活性を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索を試みた。

本研究ではレポーターアッセイを用いて FOXO1 の転写活性を測定する独自の実験系を確立した。この実験系を用いて 520 種類の食品・植物等由来の化合物をスクリーニングした結果、数種類の化合物で FOXO1 の転写活性が抑制された。すなわち、これらの化合物は FOXO1 の転写活性の抑制を介して筋萎縮を抑制する可能性があることが示唆された。

## 1-2 緒言

骨格筋はヒトの体重の約 40% を占める人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖取込み、運動において重要な役割を果たしている。骨格筋の機能はその量や質に依存しており、身体活動、環境、病態などによって変化する。適切な運動トレーニングや十分な栄養により骨格筋量を維持することはエネルギー消費を増加させ、肥満や糖尿病などの生活習慣病の予防・改善につながる<sup>1,2)</sup>。一方で、寝たきりや不活動、飢餓や加齢などによって骨格筋の萎縮が生じる<sup>3,4)</sup>。その結果、エネルギー消費の減少による肥満や、糖取込みの減少・血糖値上昇による糖尿病の発症、そして生活の質 (QOL) の低下へと向かう。超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命の延伸の観点から重要である<sup>5,6)</sup>。そのため、生活習慣病の予防や QOL の維持のための骨格筋の萎縮・機能不全の予防法の開発は国民の健康の維持・増進のために重要である。

Forkhead box protein O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、低栄養や不活動、がんなどの病態下などで発現増加することが報告されている<sup>7,8)</sup>。また、骨格筋特異的に FOXO1 を過剰発現させたマウスでは顕著な筋萎縮が観察されている<sup>9)</sup>。ユビキチンリガーゼの一種である Atrogin 1 や MuRF 1、リソソームタンパク質分解酵素の一種である Cathepsin L など、筋タンパク質の分解に重要な因子が FOXO1 の標的遺伝子として知られている<sup>10)-13)</sup>。

以上より、FOXO1 は筋萎縮を引き起こす重要な因子であり、その転写活性を抑制することは筋萎縮の抑制に有効であると考えられる。そこで本研究では FOXO1 のレポーターアッセイ

(GAL4-FOXO1 レポーターアッセイ) を行い、筋萎縮の予防を目的とした FOXO1 の転写活性を抑制する化合物の探索を行った。FOXO1 に DNA 結合領域の GAL4 を付加すると、FOXO1 自体の転写活性化能をレポーター (ルシフェラーゼ) で測定することができる。GAL4-FOXO1 融合タンパク質を発現するプラスミドと GAL4 認識配列の UAS を付加したルシフェラーゼを発現するプラスミドを HEK293T 細胞に導入すると、UAS に GAL4-FOXO1 融合タンパク質が結合し、FOXO1 の転写活性によってルシフェラーゼが発現する (図 5-1)。このルシフェラーゼの活性を測定することで FOXO1 の転写活性化能を評価することができる。そのため、ルシフェラーゼ活性を減少させるような化合物は FOXO1 の転写活性を抑制する化合物であるということになる。本研究では 520 種類の食品・植物由来成分 (Sigma Aldrich 社より購入) をスクリーニングし、FOXO1 の転写活性に対する効果を検討した。

### 1-3 方法

#### ○ 細胞培養

HEK293T 細胞（理研）を使用した。細胞は 10cm dish に播種し、10% FBS と 1% PS を含む DMEM（ナカライテスク, code 08459-64）を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中（CO<sub>2</sub> インキュベーター）で培養した。

#### ○ トランスフェクション

##### 【試薬の組成】

##### ・プラスミド溶液①

OptiMEM (Life Technologies, cat:31985-070)	500 $\mu$ l
pM FOXO1	2.5 $\mu$ g
4xUAS TK Luc	2.5 $\mu$ g
ph RL-TK	0.2 $\mu$ g

##### ・プラスミド溶液②

OptiMEM	500 $\mu$ l
Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, cat:11668-019)	5 $\mu$ l

プラスミドは pM FOXO1（GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミド）、4xUAS TK Luc（レポーターのホタルルシフェラーゼの上流に GAL4 認識配列である UAS を組み込んだプラスミド）、ph RL-TK（常時発現型のウミシイタケルシフェラーゼプラスミド、内部標準用）の本研究室で以前に作製した 3 種類を使用した。溶液①と②を調製し、5 分間室温でインキュベートした。続いて、インキュベート後の①と②を混ぜ合わせ、転倒混和して 20 分間室温でインキュベートした（③）。10cm dish で培養していた細胞の培地をアスピレーターで除去し、OptiMEM 4 mL とインキュベート後の③を加えた。37°C、5%CO<sub>2</sub> 中（CO<sub>2</sub> インキュベーター）で 5 時間培養したのち、白色 96 well plate（cat:MS-8096W）に  $1 \times 10^6$  cell / ml の密度で 100  $\mu$ l/well で再播種した。

#### ○ 食品・植物由来ライブラリー化合物の添加

520 種類の植物・食品成分ライブラリー（薬理・生理活性ライブラリー（植物由来）120 種、天然生理活性物質ライブラリー280 種、食品関連化合物ライブラリー（香料）120 種、Sigma Aldrich, cat:s990043 シリーズ）を使用した（各化合物は DMSO に 10 mM で溶解済）。各化合物（10 mM）を化合物 : DMSO = 2.5  $\mu$ l : 2.5  $\mu$ l で調製し、調製後の化合物（5 mM）0.465  $\mu$ l に対し DMEM（10% FBS、1% PS）232.5  $\mu$ l を加え、化合物の終濃度が 10  $\mu$ M になるように調製した（3 well 分）。各化合物の調製後、96 well plate の培地をアスピレーターで除去し、化合物入りの培地を 75  $\mu$ l/well で細胞に添加した（終濃度: 10  $\mu$ M、n=3）。その後 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中（CO<sub>2</sub> インキュベーター）で 20 時間培養した。

## ○ Luc assay

化合物添加 20 時間後に培地を除去し、1×PBS を 10  $\mu$ l / well を加えた。Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, cat: E2920) の Luciferase Reagent を 10  $\mu$ l / well 加え、10 分間室温でインキュベートした。このとき plate は遮光した。インキュベート後、GloMax NAVIGATOR System GM 2010 (Promega)を用いて Luciferase 活性（ホタルルシフェラーゼ活性）を測定した。測定後、内部標準測定用に Dual-Glo® Stop & Glo Reagent を調製した。Substrate : Buffer=1 : 100 の割合で 10  $\mu$ l/well の試薬を well の数だけ調製した。Luciferase 測定後の白色プレートに Dual-Glo® Stop & Glo Reagent を 10  $\mu$ l ずつ加えて軽くゆすり、10 分間室温でインキュベートした。インキュベート後、GloMax NAVIGATOR System GM 2010 (Promega)を用いて Luciferase 活性（ウミシイタケルシフェラーゼ活性）を測定した。

## 1-4 結果

### ○ FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニング

GAL4-FOXO1 レポーターアッセイを用いて FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入すると、レポータールシフェラーゼ活性の増加が観察された（図 5-2）。これは FOXO1 の転写活性化能によるものであることを示す。本研究では 520 種類の食品・植物由来化合物を用いてスクリーニングを行い、レポーター活性が 65%以下の化合物をヒット化合物としたところ、Retinoic acid、 $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{VD}_3$ （図 6）などの化合物がレポーター活性を抑制した。すなわち、これらの化合物は FOXO1 の転写活性を抑制することが示唆された。

## 1-5 考察

筋萎縮の予防や治療には運動や栄養状態の改善が推奨されているが、薬や特定の成分の摂取による治療法は確立されていない。そこで本研究では筋萎縮を引き起こす重要な因子である転写因子 FOXO1 に着目し、FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。以前本研究室で確立した、HEK293T 細胞に GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミド、4×UAS TK Luc (UAS 結合レポータープラスミド)、ph RL-TK Luc (内部標準用プラスミド) を導入しレポーター活性を測定することで FOXO1 の転写活性を評価する実験系を用いた。GAL4 タンパク質は UAS に結合するため、GAL4-FOXO1 融合タンパク質が UAS 領域に引き寄せられることで FOXO1 の転写活性によりレポーターの発現が誘導される（図 5-1）。そのため、測定したレポーター活性を FOXO1 の転写活性として評価することができる。今回、Retinoic acid、 $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  などの化合物がレポーター活性を抑制した（図 6）。すなわち、これらの化合物は FOXO1 の転写活性を抑制することが示唆された。その中でも、Retinoic acid について、前駆体である  $\beta$ -carotene が筋萎縮誘導条件下で FOXO1 と相同性を有する FOXO3a の核移行及び筋萎縮関連遺伝子 Atrogin 1 の発現増加を抑制する報告がなされている<sup>14)</sup>。そのため、今後更なる解析を行い Retinoic acid による筋萎縮抑制効果の検討を行う必要がある。また、 $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  (活性型ビタミン D) について、ビタミン D はサルコペニア（加齢性筋萎縮）の予防に効果的であるという疫学的研究報告<sup>15)</sup>や、高齢者の多くでの多くでビタミン D が不足・欠乏しているという報告<sup>16)</sup>

がなされているなど、ビタミンDと筋萎縮の関連が示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムはよくわかっていない。本研究結果からビタミンDによる筋萎縮抑制効果がFOXO1の抑制を介したものである可能性が考えられる。そこで以降の章では、ビタミンDに着目し、FOXO1を介した筋萎縮抑制効果について *in vitro* 及び *in vivo* での更なる検討を行った。

## 【第2章】

### 骨格筋萎縮におけるビタミンDの効果

#### 2-1 要約

ビタミンDはサルコペニアのような筋萎縮の予防に効果的であることが知られている。また、高齢者の多くで血中ビタミンD (25(OH)D<sub>3</sub>) 濃度が低いことが報告されている。しかしながら、骨格筋や筋細胞におけるビタミンDの作用機序はよくわかっていない。所属する研究室ではこれまでに、活性型ビタミンDが筋萎縮を引き起こす重要な因子である転写因子FOXO1の活性を抑制し、Atrogin 1 (ユビキチンリガーゼ) や Cathepsin L (リソソームタンパク質分解酵素) などの筋萎縮関連遺伝子の発現を抑制することを見出しており、ビタミンDによる筋萎縮抑制のメカニズムの手掛かりを得ている。さらに筋萎縮誘導条件下において活性型ビタミンDは筋タンパク質合成に重要な分岐鎖アミノ酸の異化を抑制した。以上より、ビタミンDは筋萎縮の抑制及び筋タンパク質合成の低下の抑制に重要であることが示唆された。

#### 2-2 緒言

骨格筋はヒトの体重の約40%を占める人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖取込み、運動において重要な役割を果たしている。骨格筋の機能はその量や質に反映され、身体活動、環境、病態などによって変化する。寝たきりや不活動、飢餓や加齢などによって骨格筋の萎縮が生じる<sup>3),4)</sup>。その結果、エネルギー消費の減少(肥満)や、糖取込みの減少・血糖値上昇(糖尿病)、そして生活の質(QOL)の低下へと向かう。超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命の延伸の観点から重要である<sup>5),6)</sup>。そのため、生活習慣病の予防やQOLの維持のための骨格筋の萎縮・機能不全の予防法の開発は国民の健康の維持・増進のために重要である。

Forkhead box protein O1 (FOXO1)はフォークヘッド型の転写因子であり、低栄養や不活動、がんなどの病態下などで発現増加することが報告されている<sup>7),8)</sup>。また、骨格筋特異的にFOXO1を過剰発現させたマウスでは顕著な筋萎縮が観察されている<sup>9)</sup>。ユビキチンリガーゼの一種であるAtrogin 1やMuRF1、リソソームタンパク質分解酵素の一種であるCathepsin Lなど、筋タンパク質の分解に重要な因子がFOXO1の標的遺伝子として知られている<sup>10)-13)</sup>。

ビタミンDは脂溶性ビタミンであり、肝臓で25(OH)Dに、さらに腎臓で1,25(OH)<sub>2</sub>Dに代謝される。体内では骨ホメオスタシスを制御していることがよく知られているほか、骨格筋を含む多くの組織で重要な役割を担っている<sup>5),17)</sup>。ビタミンD受容体(VDR)は核内受容体型転写因子であり、活性型ビタミンDである1,25(OH)<sub>2</sub>Dによって活性化する。サルコペニアを発症するような高齢者ではVDRの発現が減少すること<sup>15)</sup>や、血中ビタミンDが不足・欠乏していること

16)、高齢者へのビタミン D 投与で筋線維径の増大が見られる<sup>18)</sup> など、ビタミン D と筋萎縮の関連が示唆されている。また、我々は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が FOXO1 の転写活性を抑制したことや、筋萎縮誘導条件下の C2C12 筋細胞において FOXO1 の標的遺伝子の発現増加を抑制したこと<sup>19)</sup>を見出しており、活性型ビタミン D による筋萎縮抑制効果が示唆された。そこで本研究ではビタミン D による FOXO1 の抑制を介した筋萎縮抑制のより詳細な作用機序を解明するために、培養細胞を用いて筋萎縮抑制作用を調べた。

## 2-3 方法

### ○ C2C12 筋細胞

C2C12 筋細胞 (理研) を用いた。細胞は 10% FBS と 1% PS を含む DMEM (ナカライテスク, code 08459-64) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中で培養した。

### ○ C2C12 筋細胞 デキサメタゾン (DEX)、ビタミン D 代謝物添加実験

C2C12 筋細胞 (理研) を用いた。細胞は 12 well plate に播種した。24 時間後に 1% PS を含む DMEM (ナカライテスク, code 08459-64) に培地を交換し、DEX (ナカライテスク, cat: 11107-64) 溶液および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Cayman Chemical, cat:71820) を添加した (n=6)。処理濃度は、DEX は 10 μM、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> は 100 nM、1 μM の終濃度になるよう加えた。24 時間後に回収し、遺伝子発現解析に供した。

### ○ 遺伝子発現解析—RNA 抽出・逆転写 (RT) 反応・リアルタイム PCR

C2C12 筋細胞を 1×PBS 1 ml で 2 回 wash し、セパゾール (ナカライテスク, cat:09379-97) を 1 ml ずつ well に加え細胞を溶解し、よく懸濁して 1.5 ml チューブに回収した。これらの細胞懸濁液に 200 μl のクロロホルムを添加し、Vortex でよく攪拌した後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) した。分離した溶液のうち上層 (水層) だけを新しいチューブに回収し、そこへ 500 μl のイソプロパノールを添加して転倒混和した後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) により total RNA を沈殿させた。上清を除去し、80%エタノールでリンスしてから上清を除去した。約 30 μl の滅菌 MQ 水で沈殿を溶解し、微量分光光度計・Nano drop Lite (株式会社エル・エム・エス)を用いて total RNA 量を測定した。

Total RNA をフラットキャップ PCR チューブで 0.5 μg/6 μl になるよう滅菌 MQ 水で希釈し、そこへゲノム DNA Remover\*入り 4×DN Master Mix\*を 2 μl 加え、37°C で 5 分間インキュベートした (DNase 処理)。DNase 処理後、5×RT Master Mix\*を 2 μl ずつ加え、以下の反応条件 (Table 1) で逆転写 (reverse transcription:RT) 反応を行い、cDNA を作製した。RT 反応後、TE を 90 μl 加え 10 倍に希釈した。希釈したサンプル溶液で反応液 (Table 2) を調製し、以下の反応サイクル (Table 3) で CFX connect real time PCR system (BioRad)を用いてリアルタイム PCR を行った。反応に使ったプライマーは Table 4 に示す。

\* : ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, cat:FSQ-301)

## ○ C2C12 筋細胞 デキサメタゾン (DEX)、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 添加 アミノ酸解析

C2C12 筋細胞 (理研) を用いた。細胞は 10cm dish に播種した。24 時間後に 1% PS を含む DMEM (ナカライテスク, code 08459-64) に培地を交換し、DEX (ナカライテスク, cat: 11107-64) 溶液および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Cayman Chemical, cat:71820) を添加した (n=3)。処理濃度は、DEX は 10 μM、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> は 1 μM の終濃度になるよう加えた。24 時間後に 1×PBS 10ml で 2 回 wash した後、1×PBS 10ml を加え細胞をよく懸濁しながら 50 mL チューブに回収する作業を 2 回行った。これらの細胞懸濁液を遠心分離 (4,500 rpm, 4°C, 3min) し上清を除去した。残った沈殿に 2.5% スルホサリチル酸を 600 μl 加え、26G の針を付けた 1 mL のシリンジで 30 回程度ピペティングし破碎した。再び遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) し、上清を 1.5 mL チューブに移し、-20°C で保存した。その後アミノ酸解析をエスアールエル株式会社に委託した。

## 2-4 結果

### ○ 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> はグルココルチコイド誘導性の FOXO1 標的遺伝子の発現増加を抑制する

合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (DEX) は FOXO1 の活性を増加させることが報告されている<sup>20), 21)</sup>。そこで C2C12 筋細胞に DEX 及び 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加し 24 時間後の遺伝子発現変化を調べた。DEX の添加による FOXO1 の遺伝子発現の変化は見られなかったが、FOXO1 標的遺伝子である Atrogin 1 の発現の増加が観察された (図 7)。また 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の添加により、VDR の遺伝子発現増加が観察された。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の添加によって、DEX 誘導性の Atrogin 1 の遺伝子発現増加が抑制された (図 7)。

### ○ 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> はグルココルチコイド誘導性の BCAA 異化亢進を抑制する

分岐鎖アミノ酸 (Branched chain amino acid, BCAA : バリン、ロイシン、イソロイシン) は必須アミノ酸であり、骨格筋のタンパク質を構成する必須アミノ酸の約 35% を占める。BCAA の代謝は身体の外部・内部の環境に適応して調節される。例えば、絶食や激しい運動などで FOXO1 によるタンパク質分解が増加する。そして転写調節因子 PGC1α によって BCAA 分解酵素である BCAA アミノ基転移酵素 (BCAT2) や分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素 (BCKDHa) が増加し、BCAA 分解が増加する (図 8)。BCAA のうち特にロイシンにはタンパク質合成促進作用が知られるが、絶食など筋萎縮が生じる状態ではロイシン量が減少するとともにタンパク質合成は減少する。すなわち、BCAA の分解を抑制することにより筋萎縮の抑制が期待される。

そこで C2C12 筋細胞に DEX と 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加し、24 時間後の BCAA 代謝に関わる遺伝子発現と細胞内アミノ酸量の変化を調べた。図 9 に示すように DEX によって PGC1α、BCAT2、BCKDHa の発現増加が観察された。そして興味深いことに、これらの発現増加は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって抑制された。さらに細胞内バリン量は DEX によって減少し、有意な差はないものの 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって回復した (p=0.051) (図 10)。

## 2-5 考察

グルココルチコイドの作用はリガンド依存性の転写因子である核内受容体であるグルココルチコイド受容体との結合を介して生じる<sup>22)</sup>。グルココルチコイドは様々な組織で作用する。骨格筋における作用において、グルココルチコイドは炎症性疾患などの治療に使用され、タンパク質の異化を促進し、骨格筋の萎縮を誘導することが知られている<sup>23)</sup>。またグルココルチコイドによって FOXO1 が活性化することが先行研究において報告されている<sup>20), 21)</sup>。図7に示すように合成グルココルチコイドである DEX によって FOXO1 標的遺伝子である筋萎縮関連遺伝子 Atrogin 1 の著しい発現増加が観察された。そして DEX 誘導性の Atrogin 1 の遺伝子発現増加は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって抑制された。

BCAA は骨格筋のタンパク質を構成する必須アミノ酸の約 35% を占め、さらに食物中の必須アミノ酸の約 50% を占めるとされる。すなわち、ヒトは大量の BCAA を体内に蓄えている。BCAA の代謝は身体の外部・内部の環境に適応して調節される。例えば、絶食や激しい運動などで FOXO1 によるタンパク質分解が増加するほか、PGC1 $\alpha$  によって BCAA 分解酵素である BCAT2 や BCKDHa が増加し、BCAA 分解が増加する (図8)。BCAA のうち特にロイシンにはタンパク質合成促進作用が知られるが、絶食など筋萎縮が生じる状態ではロイシン量が減少するとともにタンパク質合成は減少する。すなわち、BCAA の分解を抑制することにより筋萎縮の抑制が期待される。DEX による筋萎縮誘導条件下で PGC1 $\alpha$  及び BCAT2、BCKDHa の発現の増加が観察された (図9)。そして DEX 誘導性のこれらの遺伝子の発現増加は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって抑制された (図9)。また、ロイシン、イソロイシンについては濃度が低く検出することができなかったが、細胞内バリン量は DEX によって減少し、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって回復したことが観察された (図10)。以上の結果より、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> は DEX 誘導性の PGC1 $\alpha$  及び BCAT2、BCKDHa の発現増加を抑制することで BCAA の異化亢進を抑制することが示唆された。骨格筋の量はその合成と分解のバランスによって決定される。合成が大きければ骨格筋の肥大が生じ、一方で分解が大きければ萎縮が生じる。これまでの結果では 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の FOXO1 の抑制を介した萎縮抑制作用の可能性を示してきた。しかし今回の結果は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が萎縮の抑制だけでなく筋タンパク質合成の低下を抑制する、すなわち骨格筋の合成と分解の両方にはたらきかけることで筋萎縮を抑制する作用を持つ可能性が示唆された。しかし、先に述べたように今回の結果における細胞内 BCAA はバリンのみを示しており、他の BCAA であるロイシン、イソロイシンは濃度が低く、検出することができなかった。今後、収量を増やし、バリンだけでなくロイシン、イソロイシンも 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって DEX による減少が抑制されるか検討する必要がある。

## 【第3章】

### 骨格筋特異的 FOXO 1 過剰発現マウスにおけるビタミン D の効果

#### 3-1 要旨

FOXO1 は Atrogin 1 などの筋萎縮関連遺伝子を標的としており、低栄養や不活動、様々な病態下で発現増加し筋萎縮を誘導する。以前に我々が作製した骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウス



(FOXO1-Tg マウス) では顕著な筋萎縮が観察されている。ビタミン D はサルコペニア (加齢性筋萎縮) の予防に効果的であるという疫学的研究報告や、高齢者の多くでビタミン D が不足・欠乏しているという報告がなされているなど、ビタミン D と筋萎縮の関連が示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムはよくわかっていない。また、これまでの結果からビタミン D による筋萎縮の抑制のメカニズムとして FOXO1 の抑制を介したものであることが示唆されている。つまりビタミン D が FOXO1 を抑制しているのであれば、ビタミン D が充足した状態の FOXO1-Tg マウスでは、不足した状態の FOXO1-Tg マウスと比較して筋萎縮、筋機能の低下が抑制されることが予想される。そこで本研究では FOXO1-Tg マウスを低ビタミン D 餌で飼育し、生体においてもビタミン D による FOXO1 の抑制を介した筋萎縮の抑制が生じるかどうか検討した。

### 3-2 緒言

骨格筋はヒトの体重の約 40% を占める人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖取込み、運動において重要な役割を果たしている。骨格筋の機能はその量や質に反映され、身体活動、環境、病態などによって変化する。寝たきりや不活動、飢餓や加齢などによって骨格筋の萎縮が生じる<sup>3),4)</sup>。その結果、エネルギー消費の減少 (肥満) や、糖取込みの減少・血糖値上昇 (糖尿病)、そして生活の質 (QOL) の低下へと向かう。超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命の延伸の観点から重要である<sup>5),6)</sup>。そのため、生活習慣病の予防や QOL の維持のための骨格筋の萎縮・機能不全の予防法の開発は国民の健康の維持・増進のために重要である。

Forkhead box protein O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、低栄養や不活動、がんなどの病態下などで発現増加することが報告されている<sup>7),8)</sup>。また、骨格筋特異的に FOXO1 を過剰発現させたマウス (FOXO1-Tg マウス) では顕著な筋萎縮が観察されている<sup>9)</sup>。ユビキチンリガーゼの一種である Atrogin 1 や MuRF 1、リソソームタンパク質分解酵素の一種である Cathepsin L など、筋タンパク質の分解に重要な因子が FOXO1 の標的遺伝子として知られている<sup>10)-13)</sup>。

ビタミン D は脂溶性ビタミンであり、体内では骨ホメオスタシスを制御していることがよく知られているほか、骨格筋を含む多くの組織で重要な役割を担っている<sup>5),17)</sup>。サルコペニアを発症するような高齢者では VDR の発現が減少すること<sup>15)</sup>や、血中ビタミン D が不足・欠乏していること<sup>16)</sup>、高齢者へのビタミン D 投与で筋線維径の増大が見られる<sup>18)</sup> など、ビタミン D と筋萎縮の関連が示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムはよくわかっていない。また、これまでに行ってきた実験からビタミン D による FOXO1 の抑制を介した筋萎縮抑制効果が示唆されている (1 章、2 章)。そこで本研究では FOXO1-Tg マウスを低ビタミン D 餌で飼育し、生体における FOXO1 による筋萎縮とビタミン D の関係を調べた。FOXO1-Tg マウスでは顕著な筋萎縮が観察されており<sup>9)</sup>、低ビタミン D 餌で飼育したマウスは筋力が低下することが報告されている<sup>24)</sup>。ビタミン D が FOXO1 を抑制しているのであれば、ビタミン D が充足した状態の FOXO1-Tg マウスでは、不足した状態の FOXO1-Tg マウスと比較して筋萎縮、筋機能の低下が抑制されることが予想される。すなわちビタミン D が充足していれば FOXO1 による筋萎縮は抑制される

可能性があると考えられる。本実験により、生体内でもビタミンDによってFOXO1が抑制されているかどうか検討することとした。

### 3-3 方法

#### ○ 実験動物

以前に作製した骨格筋特異的FOXO1過剰発現マウス（FOXO1-Tgマウス、C57BL/6 background）を実験に使用した。このマウスはHuman skeletal muscle  $\alpha$ -actinプロモーターを用いて骨格筋特異的にFOXO1を過剰発現させている。コントロールマウスにはFOXO1-Tgマウスの同腹仔を用いた。飼育室は24°Cで12時間の明暗サイクルに設定し、床敷きは熱乾燥のピュアチップ（清水実験材料）、餌はコントロール群にはAIN-93G（日本クレア）、低ビタミンD群には低ビタミンD配合AIN-93Gを使用し、餌と水は自由摂取させた。

#### ○ 群分け

- ・野生型コントロール群（WT ctr）
- ・野生型低ビタミンD食摂取群（WT 低VD）
- ・FOXO1-Tgコントロール群（FOXO1-Tg ctr）
- ・FOXO1-Tg低ビタミンD食摂取群（FOXO1-Tg 低VD）

(n=6)

#### ○ 餌

コントロール餌・・・AIN-93G（ビタミンD含有量 100 IU/100g）

低ビタミンD餌・・・低ビタミンD配合AIN-93G（ビタミンD含有量 12.5 IU/100g）

#### ○ 実験スケジュール

4週間各個体を飼育ケージで個飼いし、餌と水を自由摂取させた。実験期間中は摂食量は毎日、体重は1週間に1度測定した。4週間後に解剖し、骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、大腿四頭筋）、肝臓、腎臓、白色脂肪（精巣上体周囲）、血液を採取した。

#### ○ 遺伝子発現解析 — RNA抽出・逆転写（RT）反応・リアルタイムPCR

解剖時に採取した骨格筋（腓腹筋）をマイクロチューブに入れ、液体窒素で凍結させて-80°Cで保存した。その凍結切片約0.5gを破砕用チューブに入れ、セパゾール（ナカライテスク）1mlとジルコニアボール（0.5φ）を加え、破砕機で5分間破砕した。組織懸濁液を遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 10 min）し、上清を別のチューブに入れた。そこへクロロホルム（ナカライテスク）200μlを添加し、Vortexでよく攪拌した後、遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 10 min）した。分離した溶液のうち上層（水層）だけを新しいチューブに回収し、そこへ500μlのイソプロパノール（ナカライテスク）を添加して転倒混和した後、遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 10 min）によりtotal RNAを沈殿させた。上清を除去し、80%エタノールでリンスしてから上清を除去した。骨格筋の場合は100μlの滅菌超純水で沈殿を溶解し、超微量分光光度計・Nano drop 2000 Lite（株式会社エル・エム・エス）

を用いて 260 nm の吸光度を測定して Total RNA 量を決定した。

Total RNA をフラットキャップ PCR チューブで 0.5 µg/6 µl になるよう滅菌 MQ 水で希釈し、そこへゲノム DNA Remover\*入り 4×DN Master Mix\*を 2 µl 加え、37°C で 5 分間インキュベートした (DNase 処理)。DNase 処理後、5×RT Master Mix\*を 2 µl ずつ加え、以下の反応条件 (Table 1) で逆転写 (reverse transcription:RT) 反応を行い、cDNA を作製した。RT 反応後、TE を 90 µl 加え 10 倍に希釈した。希釈したサンプル溶液で反応液 (Table 2) を調製し、以下の反応サイクル (Table 3) で CFX connect real time PCR system(BioRad)を用いてリアルタイム PCR を行った。反応に使ったプライマーは Table 4 に示す。

\* : ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, cat:FSQ-301)

## ○ 血清 25(OH)D<sub>3</sub> 解析

解剖時に採取した血液を氷上で 1.5 時間置いた後、遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 15 min) し、上清 (血清) を新しいチューブに回収した。回収した血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> の測定はエスアールエル株式会社に委託した。

## 3-4 結果

### ○ 骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウスにおける低ビタミン D の影響の解析

FOXO1 は Atrogin 1 などの筋萎縮関連遺伝子を標的としており、低栄養や不活動、様々な病態下で発現増加し筋萎縮を誘導する。以前に本研究室で作製した骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウス (FOXO1-Tg マウス) では顕著な筋萎縮が観察されている<sup>9)</sup>。また、これまでの結果からビタミン D による FOXO1 の抑制が示唆されており、ビタミン D によって筋萎縮が抑制されることが考えられる。そこで FOXO1-Tg マウスを低ビタミン D 餌で飼育し、骨格筋の重量や遺伝子発現の変化を調べ、筋萎縮に対する影響を評価した。摂食量は群間に差は見られず (図 11)、体重については FOXO1-Tg マウスで低値であったが有意な差は無く、低ビタミン D 餌による影響も見られなかった (図 11)。筋重量は、腓腹筋、前脛骨筋、大腿四頭筋が FOXO1-Tg マウスで有意に軽く、ヒラメ筋では差は見られなかった (図 12)。また、いずれも低ビタミン D 餌による影響は見られなかった。その他の組織 (肝臓、腎臓、白色脂肪) の重量には変化は見られなかった。生体におけるビタミン D の充足・不足は血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度で評価される。採取した血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度を調べたところ、WT マウス、FOXO1-Tg マウスともに低ビタミン D 餌で飼育した群で有意に低下していた (図 13)。採取した骨格筋 (腓腹筋) の遺伝子発現を調べたところ、FOXO1 は FOXO1-Tg マウスで有意に増加しており、VDR はビタミン D の充足・不足に関わらず変化が見られなかった。また FOXO1 の標的である Atrogin 1、Cathepsin L については、Atrogin 1 は FOXO1-Tg マウスで ctr 餌群に比べ低ビタミン D 餌群で有意ではないがわずかな増加が見られ、Cathepsin L は FOXO1-Tg マウスで有意に増加していたが低ビタミン D 餌による影響は見られなかった (図 14)。

### 3-5 考察

FOXO1 は Atrogin 1 などの筋萎縮関連遺伝子を標的としており、低栄養や不活動、様々な病態下で発現増加し筋萎縮を誘導する。以前に我々が作製した FOXO1-Tg マウスでは顕著な筋萎縮が観察されている<sup>9)</sup>。ビタミン D はサルコペニア（加齢性筋萎縮）の予防に効果的であるという疫学的研究報告<sup>15)</sup>や、高齢者の多くでの多くでビタミン D が不足・欠乏しているという報告<sup>16)</sup>がなされているなど、ビタミン D と筋萎縮の関連が示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムはよくわかっていない。また、これまでの結果からビタミン D による FOXO1 の抑制が示唆されており、ビタミン D による筋萎縮の抑制のメカニズムとして FOXO1 の抑制を介したものであることが考えられる。そこで FOXO1-Tg マウスを低ビタミン D 餌で飼育し、生体においてもビタミン D による FOXO1 の抑制を介した筋萎縮の抑制が生じるかどうか検討した。ビタミン D が FOXO1 を抑制しているのであれば、ビタミン D が不足した状態の FOXO1-Tg マウスではさらなる筋萎縮、筋機能の低下が予想される。FOXO1-Tg マウスで骨格筋重量の低下は見られたものの、低ビタミン D 餌によって重量の低下は促進されなかった。しかしながら、遺伝子発現の変化を調べると、筋萎縮関連遺伝子の Atrogin 1 が有意ではないものの低ビタミン D 餌によってわずかに発現が増加していた。また、低ビタミン D 餌で飼育した群は血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度の低下が見られた (図 13)。すなわち、生体においてビタミン D が欠乏していると FOXO1 による筋萎縮が促進される可能性が示唆された。今回は既報<sup>24)</sup>と同様に 1 ヶ月の実験期間で血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度の低下が見られた。しかし、その濃度に至るまでどれほどの日数がかかったのかは不明である。ビタミン D は脂溶性であり、肝臓で脂肪組織に貯蔵されるため、1 ヶ月かかって血清中の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度が徐々に低下した可能性も考えられる。そのためビタミン D が欠乏した状態の影響を調べるにはさらに長期間の実験を行う必要があると想定される。また次のステップとして FOXO1-Tg マウスにビタミン D を投与し、実際に筋萎縮が抑制されるか調べるべきであろう。

ビタミン D の栄養状態の指標は血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度である。サルコペニアを発症するような高齢者では血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度が低く、ビタミン D 不足・欠乏状態であることが報告されている<sup>16)</sup>。そのため、十分量のビタミン D を摂取し血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度が充足した状態を保つことがサルコペニア予防に重要であるのかもしれない。

#### 表

**Table 1 逆転写反応サイクル**

37°C	15 min
50°C	5 min
98°C	5 min
4°C	∞

**Table 2** リアルタイム PCR 反応液

試薬	液量
Primer Fw (50 $\mu$ M)	0.06 $\mu$ l
Primer Rv (50 $\mu$ M)	0.06 $\mu$ l
THUNDERBIRD SYBR green (TOYOBO)	5 $\mu$ l
cDNA 溶液 (5 ng/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
MQ 水	2.38 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

**Table 3** リアルタイム PCR サイクル

95°C	5 min	} ×40 サイクル
95°C	10 sec	
60°C	30 sec	
70°C	5 sec	

**Table 4** リアルタイム PCR プライマー配列

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
36B4	GGCCCTGCACTCTCGCTTTC	TGCCAGGCAGCGCTTGT
FOXO1	GCGGGCTGGAAGAATTCAAT	TCCAGTTCCTTCATTCTGCA
Atrogin 1	TCGGCAAGTCTGTGCTGGT	CCATCCGATACACCCACATGT
Cathepsin L	TCTCACGCTCAAGGCAATCA	AAGCAAATCCATCAGGCCTC
VDR	GGCTTCCACTTCAACGCTATG	TGCTCGGCCTGAAGAAACC
CYP27B1	CATCATGGGCAGAGCACCGT	TCACCATCCGCCGTTAGCAA
CYP24A1	AACAGCACGACACACTGGCAGA	CTCGGCGAGCCCAGATGCAG

## 引用文献

- 1) Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. & Muntener, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* **80**, 1215-1265, doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1215 (2000).
- 2) Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C. & Ravussin, E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest* **86**, 1423-1427, doi:10.1172/jci114857 (1990).
- 3) Menconi, M. *et al.* Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. *Crit Care Med* **35**, S602-608, doi:10.1097/01.ccm.0000279194.11328.77 (2007).
- 4) Proctor, D. N., Balagopal, P. & Nair, K. S. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr* **128**, 351s-355s, doi:10.1093/jn/128.2.351S (1998).
- 5) Beaudart, C. *et al.* The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 4336-4345, doi:10.1210/jc.2014-1742 (2014).

- 6) Landi, F., Marzetti, E., Martone, A. M., Bernabei, R. & Onder, G. Exercise as a remedy for sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**, 25-31, doi:10.1097/mco.000000000000018 (2014).
- 7) Kamei, Y. *et al.* A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Lett* **536**, 232-236 (2003).
- 8) Reed, S. A., Sandesara, P. B., Senf, S. M. & Judge, A. R. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *Faseb j* **26**, 987-1000, doi:10.1096/fj.11-189977 (2012).
- 9) Kamei, Y. *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* **279**, 41114-41123, doi:10.1074/jbc.M400674200 (2004).
- 10) Kamei, Y. *et al.* FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles through a region downstream of 3'-UTR: possible contribution to ammonia detoxification. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E485-493, doi:10.1152/ajpendo.00177.2014 (2014).
- 11) Sandri, M. *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412 (2004).
- 12) Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* **14**, 395-403 (2004).
- 13) Yamazaki, Y. *et al.* The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. *Biochem J* **427**, 171-178, doi:10.1042/bj20091346 (2010).
- 14) Ogawa, M. *et al.* The preventive effect of beta-carotene on denervation-induced soleus muscle atrophy in mice. *Br J Nutr* **109**, 1349-1358, doi:10.1017/s0007114512003297 (2013).
- 15) Lappe, J. M. & Binkley, N. Vitamin D and Sarcopenia/Falls. *J Clin Densitom* **18**, 478-482, doi:10.1016/j.jocd.2015.04.015 (2015).
- 16) Okuno, J. *et al.* Effects of serum 25-hydroxyvitamin D(3) levels on physical fitness in community-dwelling frail women. *Arch Gerontol Geriatr* **50**, 121-126, doi:10.1016/j.archger.2009.02.011 (2010).
- 17) Ceglia, L. & Harris, S. S. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Calcif Tissue Int* **92**, 151-162, doi:10.1007/s00223-012-9645-y (2013).
- 18) Ceglia, L. *et al.* A randomized study on the effect of vitamin D(3) supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E1927-1935, doi:10.1210/jc.2013-2820 (2013).
- 19) Hirose, Y., Onishi, T., Miura, S., Hatazawa, Y. & Kamei, Y. Vitamin D Attenuates FOXO1-Target Atrophy Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **64**, 229-232, doi:10.3177/jnsv.64.229 (2018).
- 20) Castellero, E., Alamdari, N., Aversa, Z., Gurav, A. & Hasselgren, P. O. PPARbeta/delta regulates glucocorticoid- and sepsis-induced FOXO1 activation and muscle wasting. *PLoS One* **8**, e59726, doi:10.1371/journal.pone.0059726 (2013).
- 21) Shimizu, N. *et al.* Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab* **13**, 170-182, doi:10.1016/j.cmet.2011.01.001 (2011).

- 22) Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* **19**, 1429-1438, doi:10.1210/me.2005-0046 (2005).
- 23) Schakman, O., Gilson, H. & Thissen, J. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* **197**, 1-10, doi:10.1677/joe-07-0606 (2008).
- 24) Seldeen, K. L. *et al.* Chronic vitamin D insufficiency impairs physical performance in C57BL/6J mice. *Aging (Albany NY)* **10**, 1338-1355, doi:10.18632/aging.101471 (2018).