

牛乳・乳製品の摂取に関連したサルコペニア予防作用を有するメタボライトの
特定

京都府立医科大学 内分泌代謝内科学

岡村 拓郎

【要旨】

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。本研究ではサルコペニア発症リスクが高い 2 型糖尿病患者を対象としたコホート研究において、牛乳を日常的に摂取している人はそうでない人と比較し有意に骨格筋率が高く、血清メチオニン濃度、フェニルアラニン濃度が高かった。さらにマウス筋管細胞を用いたメチオニン投与実験では、飽和脂肪酸による筋萎縮作用をメチオニンが有意に抑制したことから、牛乳による抗サルコペニア作用にはメチオニンが作用している可能性が示唆された。

【緒言】

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。一方で、動物実験において Db/Db マウスは筋肉量の減少および筋力の低下、いわゆるサルコペニアを有しており、骨格筋内での Foxo1 の発現上昇が「サルコペニア」の病態の中心であることを申請者は明らかとしている (Okamura T, et al. J Clin Biochem Nutr 2019)。

申請者らが実施しているコホート研究である KAMOGAWA-DM cohort study では 2014 年より 1800 名の糖尿病患者、HOZUGAWA study では 2015 年より 300 名の人間ドック受診者を対象に簡易型自記式食事歴法質問(BDHQ)による栄養調査、握力測定、体成分分析検査での骨格筋量・体脂肪量の評価、血清・尿検体保存を実施している。こちらも先行研究において、サルコペニアを有する患者は牛乳・乳製品の摂取量が少ない傾向にあることを明らかにしており、牛乳・乳製品の代謝産物(メタボライト)が抗サルコペニア作用を持つと考えた。申請者は、研究協力者(Agilent 社高桑裕史氏・アイスティサイエンス佐々野僚一氏)の独自技術である脂質誘導体化法および固相抽出と糖質・有機酸誘導体化法 (Takeo E, et al. J Biosci Bioeng 2017) を用いることにより血清・尿からの代謝物の抽出および誘導体化を安定化させる手法を開発した。そこで、本研究では登録患者の血清および尿中メタボライト(アミノ酸・有機酸・脂肪酸・糖類)をガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)を用いたメタボローム解析で網羅的に定量し、BDHQ における牛乳・乳製品摂取量と有意な関連を示す抗サルコペニアメタボライトを特定する。さらには骨格筋細胞を用いた細胞実験も併せて実施することで、メタボライトの抗サルコペニアメカニズムを明らかにすることを目的とし以下の実験を行った。

【方法】

研究計画 1. 研究計画 1. コホート研究 (KAMOGAWA-DM cohort study・HOZUGAWA study)での牛乳・乳製品の摂取量と関連する血清メタボライトの特定

KAMOGAWA-DM コホート研究に参加中の平均年齢 72.1 歳の 2 型糖尿病患者 110 名を対象に BDHQ による栄養調査、体成分分析検査での骨格筋量・体脂肪量の評価を実施したほか、血清のアミノ酸・有機酸濃度を測定した。

メタボローム解析：保存血清および尿(50 μ L)の各検体を凍結粉碎後、アミノ酸・有機酸の固相抽出(AISTI 社)にて誘導体化処理後、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)シス

テム(Agilent7890B/5977B) を用いて測定する。牛乳摂取群で増減したメタボライトを統計学的にランキングし選定する。さらには牛乳・乳製品の摂取量と各種メタボライトの相関係数を求める。

研究計画 2. 研究計画 1 で同定した抗サルコペニアメタボライト投与による筋萎縮抑制の確認

研究計画 1 で牛乳摂取と骨格筋量の変化に関与していたメタボライトをマウス筋管細胞 C2C12 に投与することで、筋管細胞の増大、萎縮を確認する。

筋管細胞の増大を認めたメタボライト(抗サルコペニアメタボライト)を添加した際の細胞内遺伝子発現の変化を Real-time PCR により、ミトコンドリア機能を細胞外フラックスアナライザーにより確認することでサルコペニア予防に関わるメカニズムを明らかにする。

統計解析

牛乳摂取量の多少で患者を 2 群に分け、2 群間の血清アミノ酸・有機酸濃度は t 検定で群間比較した。さらに 1 日の牛乳摂取量と血清アミノ酸・有機酸濃度,血清アミノ酸・有機酸濃度と骨格筋指数のピアソンの積率相関係数は JMP ver.14 で算出した。P 値は 0.05 未満で統計学的有意と規定した。

【結果】

1. 牛乳を習慣的に摂取している人はそうでない人と比較して有意に骨格筋率が高かった
2 型糖尿病患者 111 名(男性: 47 名、女性: 63 名)を対象とした。平均年齢は 72.1 歳、平均 BMI は 22.7kg/m²であり、牛乳の平均摂取量は 135ml/日であった。

表 1. 患者背景

	Total (n=111)
性別(男性/女性)	47/63
年齢	72.1 (5.3)
体重 (kg)	58.9 (11.0)
Body mass index (kg/m ²)	22.7 (3.4)
骨格筋量 (kg)	36.5 (7.7)
四肢骨格筋量 (kg)	17.5 (4.0)
骨格筋指数 (kg/m ²)	6.6 (1.0)
骨格筋率(%)	
収縮期血圧 (mmHg)	135.9 (14.4)
拡張期血圧 (mmHg)	79.8 (10.6)
血漿血糖 (mg/dL)	108.5 (24.7)
ヘモグロビン A1c (%)	6.1 (0.9)

クレアチニン (mg/dL)	0.84 (0.21)
eGFR (mL/min/1.73m ²)	65.2 (13.5)
総コレステロール (mg/dL)	0.7 (0.5)
HDL-コレステロール (mg/dL)	71.8 (23.2)
LDL-コレステロール (mg/dL)	123.8 (30.7)
中性脂肪 (mg/dL)	100.6 (46.0)
エネルギー摂取量 (kcal)	1867.7 (568.7)
タンパク質摂取量 (g/day)	73.5 (25.3)
動物性タンパク質摂取量 (g/day)	30.1 (9.3)
植物性タンパク質摂取量(g/day)	28.6 (10.1)
脂質摂取量 (g/day)	53.9 (19.2)
炭水化物摂取量 (g/day)	243.4 (78.5)
普通牛乳摂取量 (mL/day)	137.3 (123.7)

データは平均値 (SD) または数値で表した。eGFR, estimated glomerular filtration rate.

牛乳を 135ml/日以上摂取している人を Higher consumption(H)群、135ml/日未満摂取の人を Lower consumption(L)群と定義すると、それぞれ人数は 55 名となった。H 群、L 群で骨格筋率を比較すると、H 群で有意に高値であった($p=0.047$) (図 1)。次に、保存血清を用いてアミノ酸・有機酸濃度を測定した。すると血清メチオニン濃度と血清フェニルアラニン濃度は L 群と比較し、H 群で有意に高値であった(メチオニン: H, $10 \pm 4 \mu\text{mol/L}$, L: $8 \pm 4 \mu\text{mol/L}$, $p=0.044$; フェニルアラニン: H, $38 \pm 10 \mu\text{mol/L}$, L: $8 \pm 4 \mu\text{mol/L}$, $p=0.028$)。

表 2. 血清アミノ酸・有機酸濃度

血清アミノ酸・有機酸, $\mu\text{mol/L}$	All (n=110)	Lower consumption of milk (<135ml/day) (n=55)	Higher consumption of milk ($\geq 135\text{ml/day}$) (n=55)	p-value
アラニン	267(71)	262(72)	272(72)	0.553
シュウ酸	55(27)	58(26)	52(26)	0.337
バリン	172(47)	174(46)	172(48)	0.788
リン酸	3524(686)	3624(694)	3484(682)	0.886
ロイシン	92(26)	92(26)	92(26)	0.978
イソロイシン	44(14)	44(14)	44(14)	0.951
プロリン	96(42)	92(34)	100(50)	0.363
グリシン	145(49)	150(50)	140(46)	0.302
コハク酸	12(6)	12(6)	12(6)	0.316

セリン	72(19)	72(20)	72(18)	0.695
スレオニン	71(20)	72(22)	70(18)	0.641
リンゴ酸	7(3)	6(4)	6(2)	0.597
アスパラギン酸	7(4)	6(4)	6(4)	0.992
メチオニン	9(4)	8(4)	10(4)	0.044*
グルタミン酸	27(14)	28(16)	28(14)	0.992
フェニルアラニン	41(12)	38(10)	44(14)	0.028*
クエン酸	35(40)	34(36)	36(44)	0.866
リジン	86(58)	88(54)	84(60)	0.807
チロシン	33(18)	30(16)	36(18)	0.172

データは平均値 (SD) または数値で表した。* $p < 0.05$ (Unpaired t -test).

次に牛乳摂取量と血清アミノ酸・有機酸濃度の比例係数を算出したところ、血清メチオニン濃度、フェニルアラニン濃度と有意な正の相関を認めた(メチオニン: $r=0.209$, $p=0.031$; フェニルアラニン: $r=0.184$, $p=0.049$)。

表 3. 1 日の牛乳摂取量と血清アミノ酸・有機酸濃度の相関係数

アミノ酸および有機酸, $\mu\text{mol/L}$	r	p -value
アラニン	0.062	0.530
シュウ酸	-0.057	0.563
バリン	-0.013	0.891
リン酸	0.040	0.684
ロイシン	0.021	0.832
イソロイシン	0.006	0.948
プロリン	0.027	0.785
グリシン	-0.040	0.686
コハク酸	-0.105	0.283
セリン	0.017	0.866
スレオニン	-0.057	0.564
リンゴ酸	-0.063	0.520
アスパラギン酸	0.047	0.629
メチオニン	0.209	0.031*
グルタミン酸	-0.066	0.500
フェニルアラニン	0.184	0.049*

クエン酸	0.126	0.198
リジン	0.035	0.719
チロシン	0.093	0.342

* $p < 0.05$ (Pearson's correlation).

次に骨格筋率と血清アミノ酸・有機酸濃度の比例係数を算出したところ、血清バリリン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、リンゴ酸、メチオニン濃度が有意な正の相関を認め(バリリン: $r=0.205$, $p=0.034$; ロイシン: $r=0.261$, $p=0.007$; イソロイシン: $r=0.236$, $p=0.014$; スレオニン: $r=0.276$, $p=0.004$; リンゴ酸: $r=0.222$, $p=0.021$; メチオニン: $r=0.246$, $p=0.011$)、シュウ酸が有意な負の相関を認めた($r=-0.200$, $p=0.039$)。

表 4. 血清アミノ酸・有機酸濃度と骨格筋指数との相関係数

アミノ酸および有機酸, $\mu\text{mol/L}$	r	p -value
アラニン	0.177	0.069
シュウ酸	-0.200	0.039*
バリリン	0.205	0.034
リン酸	0.118	0.227
ロイシン	0.261	0.007*
イソロイシン	0.236	0.014*
プロリン	0.250	0.010*
グリシン	-0.043	0.663
コハク酸	0.050	0.609
セリン	0.122	0.211
スレオニン	0.276	0.004*
リンゴ酸	0.222	0.021*
アスパラギン酸	0.090	0.356
メチオニン	0.246	0.011*
グルタミン酸	-0.068	0.488
フェニルアラニン	0.079	0.419
クエン酸	0.155	0.111
リジン	0.164	0.092
チロシン	0.100	0.305

* $p < 0.05$ (Pearson's correlation).

牛乳摂取量及び骨格筋率ともに血清メチオニン濃度と有意な正の相関を認めた。牛乳摂取により増加した。以上の結果から、メチオニンが牛乳摂取による抗サルコペニアメタボライトの一つであると考え、研究計画 2 の細胞実験においてメチオニンの抗サルコペニア作用を調べた。

2. メチオニンは筋管細胞のミトコンドリア機能を改善することで飽和脂肪酸誘導性筋萎縮を改善する

マウス筋芽細胞 C2C12 を 96-well plates およびフラックスアナライザー専用 plate に散布、増殖地で培養 (Day-2)、80% コンフルエントとなった時点で分化培地へ変更 (Day0)、Day5 に 200 μ M パルミチン酸 +10mM, 50mM, 250mM のメチオニンを負荷 (Day3)、24 時間後 (Day6) に下記項目を評価した。

RT-PCR にて遺伝子発現を調べたところ、筋萎縮関連遺伝子 (*Trim63*, *Fbxo32*, *Hdac4*, *Foxo1*)、脂肪酸代謝関連遺伝子 (*Fasn*, *Scd1*)、炎症関連遺伝子 (*Tnfa*) はメチオニン投与により有意に低下した。さらに、細胞内のパルミチン酸濃度を調べたところ、メチオニン投与によりパルミチン酸濃度は有意に低下した。また、細胞外フラックスアナライザーによりミトコンドリア機能を調べたところ、メチオニン投与により飽和脂肪酸投与により低下したミトコンドリア機能は有意に上昇した (図 2)。

【考察】

本研究において、牛乳を日常的に摂取している人はそうでない人と比較して、有意に骨格筋率が高かった。さらに牛乳を日常的に摂取している人はそうでない人と比較して、血清メチオニン濃度、フェニルアラニン濃度が有意に高く、牛乳摂取量及び骨格筋率ともに血清メチオニン濃度と有意な正の相関を認めた。以上の結果から、メチオニンが牛乳摂取による抗サルコペニアメタボライトの一つであると考え、C2C12 筋管細胞にメチオニンを投与したところ、飽和脂肪酸による筋萎縮作用を有意に抑制することが明らかとなり、その一因としてミトコンドリア機能の改善が作用している可能性が示唆された。さらには、細胞内の飽和脂肪酸濃度も低下していたことから、メチオニンによるミトコンドリア機能の改善を介した細胞内脂肪酸代謝の亢進により飽和脂肪酸の筋毒性が軽減した可能性も示唆された。

本邦において、馬庭ら [1] が実施した自立高齢者を対象とした牛乳摂取による介入研究において、牛乳の摂取により有意な血中必須アミノ酸濃度の上昇のほか、運動機能の改善を認めている。

分岐鎖アミノ酸以外のアミノ酸の多くは主に肝臓で代謝される一方で、分岐鎖アミノ酸は主に筋肉で代謝され、骨格筋タンパク合成を促進する一方で、筋タンパク分解を抑制している [2]。分岐鎖アミノ酸であるロイシンを高齢者に投与することで骨格筋タンパク合成が促進することも報告されていることから、分岐鎖アミノ酸は骨格筋の有効な基質となりサ

ルコペニアの予防に有効である可能性が高い。現に本研究においても血清中のバリン、ロイシン、イソロイシン濃度は骨格筋率と有意な正の相関を認めた。

メチオニンは必須アミノ酸の一種であり、普通牛乳中のアミノ酸 1g あたり 27mg 含まれている(日本食品標準成分表 2020 年版)。メチオニンは動物実験において、骨格筋中のインスリン様成長因子-I (IGF-I) の発現を上昇させる一方、メチオニンが欠乏すると、筋肉成長関連遺伝子の発現が阻害され、骨格筋の増大が抑制されることが報告されている[3,4]。さらに既報において、メチオニンはミトコンドリア機能を高めることが報告されており、メチオニン添加によりミトコンドリアへのピルビン酸の取り込みと TCA サイクルの活性が促進されることが主因と考えられている[5]。一方で、メチオニン制限食はヒト細胞、酵母、動物において抗加齢効果を示し、寿命を延長させる効果を示すことが報告されているほか[6]、動物実験では、体重や脂肪の減少、酸化ストレスの低下、悪性腫瘍の減少、インスリン感受性の上昇、効率的なカロリー燃焼など様々な健康効果が報告されていることから[7]、メチオニンによる健康効果には議論の余地がある。しかしながら、牛乳自体のメチオニン含有量は他のアミノ酸と比較しても多いわけではなく、牛乳摂取に伴う種々の代謝の結果としての体内でのメチオニンの増加は、本研究の細胞実験の結果からもサルコペニアにとっては有用な可能性が高く、今後さらなる研究が必要である。

本研究の限界として、介入試験ではなく横断研究による牛乳摂取量と血清アミノ酸・有機濃度の比較のため、因果関係の証明が現時点では困難である。しかしながら、牛乳摂取の多い群、少ない群で比較した際にタンパク摂取量自体に有意な差を認めないにも関わらず牛乳摂取に伴い変化した血中メチオニンやフェニルアラニンは決して牛乳中に多く含まれるアミノ酸ではないことから、牛乳が消化管に作用することでアミノ酸トランスポーターの発現を変化させた可能性が示唆された。そのため、牛乳摂取に伴う消化管における栄養素トランスポーターの変化の確認には、さらなる研究が望まれる。

本研究は牛乳摂取に伴う血液中のアミノ酸・有機酸濃度を測定した初めての研究である。さらにメチオニンの抗筋萎縮効果を細胞実験で示しただけでなく、メチオニンのミトコンドリア機能障害の改善作用も明らかとなった。牛乳摂取に伴い変化した血中メチオニンやフェニルアラニンは決して牛乳中に多く含まれるアミノ酸ではないことから、牛乳が消化管に作用することでアミノ酸トランスポーターの発現を調整している可能性があり、今後のさらなる研究が望まれる。

参考文献

- [1] MANIWA R, IWAMOTO M, YAMASAKI M, SHIWAKU K. 牛乳および乳製品摂取による高齢者の介護予防効果に関する研究. 日本農村医学会雑誌 2012;61:77-87. <https://doi.org/10.2185/JJRM.61.77>.
- [2] Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, Helmark IC, Lund P, Kristensen NB, et al. Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect

- of resistance exercise and protein ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00513.2010>.
- [3] Wen C, Jiang X, Ding L, Wang T, Zhou Y. Effects of dietary methionine on breast muscle growth, myogenic gene expression and IGF-I signaling in fast- and slow-growing broilers. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-02142-Z>.
- [4] Pettem CM, Briens JM, Janz DM, Weber LP. Cardiometabolic response of juvenile rainbow trout exposed to dietary selenomethionine. *Aquat Toxicol* 2018;198:175–89. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.02.022>.
- [5] Tripodi F, Castoldi A, Nicastro R, Reghellin V, Lombardi L, Airoidi C, et al. Methionine supplementation stimulates mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018;1865:1901–13. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.09.007>.
- [6] Dong Z, Sinha R, Richie JP. Disease prevention and delayed aging by dietary sulfur amino acid restriction: translational implications. *Ann N Y Acad Sci* 2018;1418:44–55. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13584>.
- [7] Fang H, Stone KP, Forney LA, Sims LC, Gutierrez GC, Ghosh S, et al. Implementation of dietary methionine restriction using casein after selective, oxidative deletion of methionine. *IScience* 2021;24. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102470>.

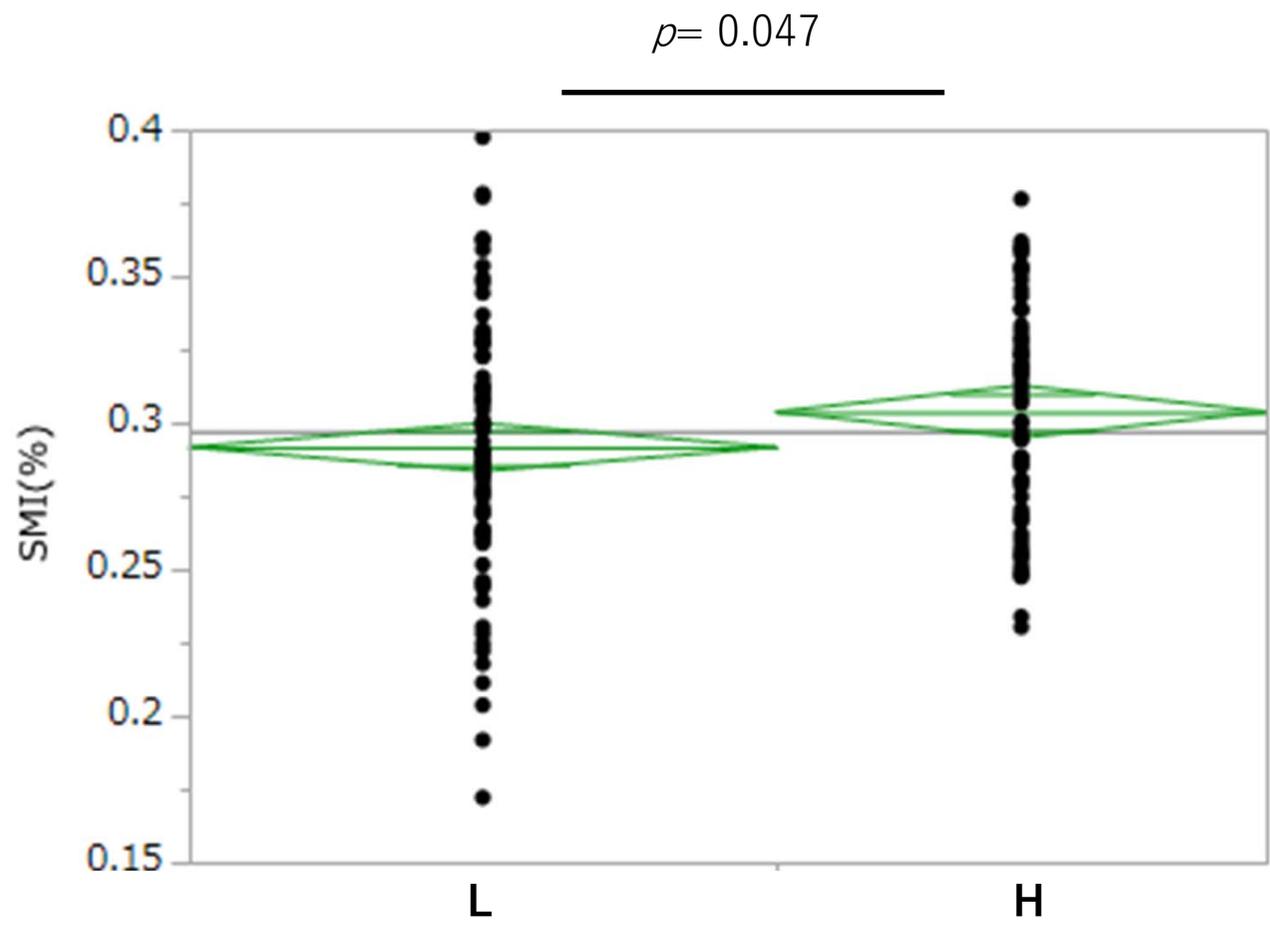


図1. 牛乳摂取量による骨格筋率の差異

牛乳を135ml/日以上摂取している人をHigher consumption(H)群、
135ml/日未満摂取の人をLower consumption(L)群と定義した。

H群、L群で骨格筋率を比較すると、H群で有意に高値であった($p=0.047$)。

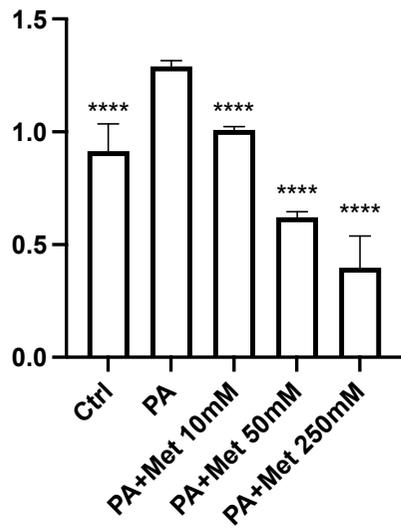
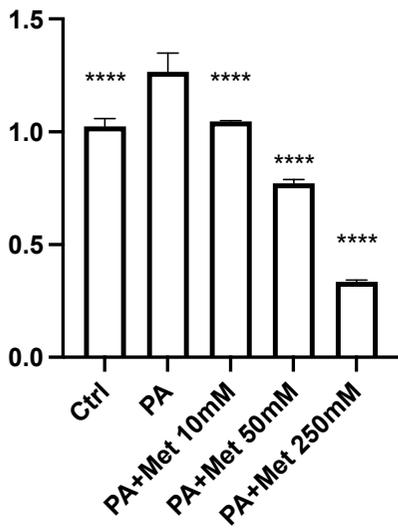
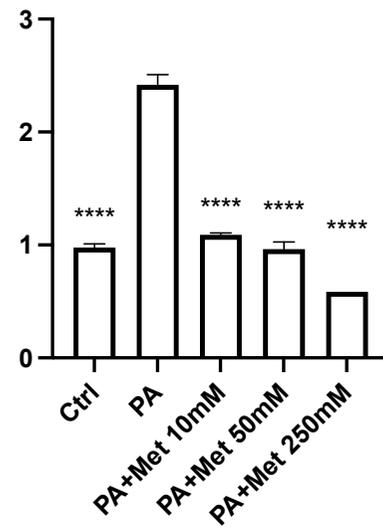
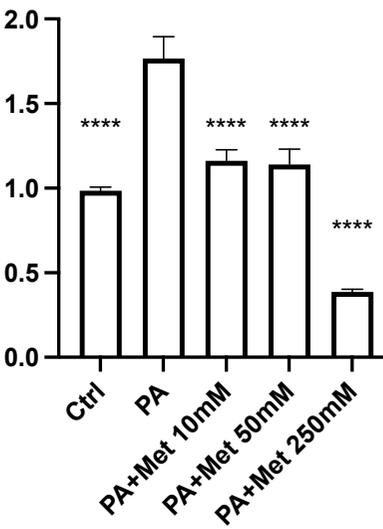
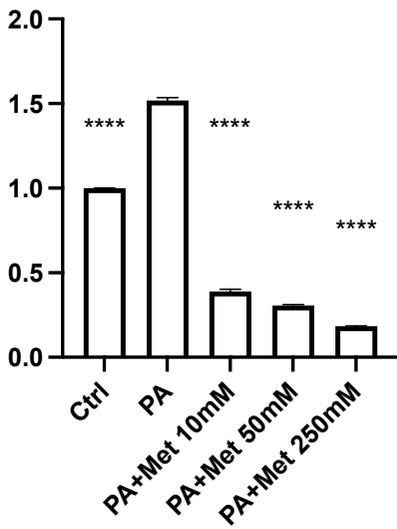
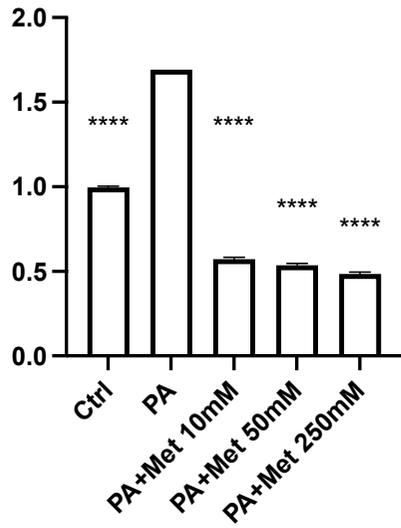
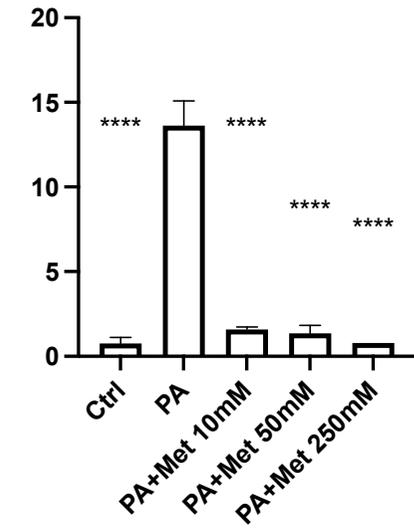
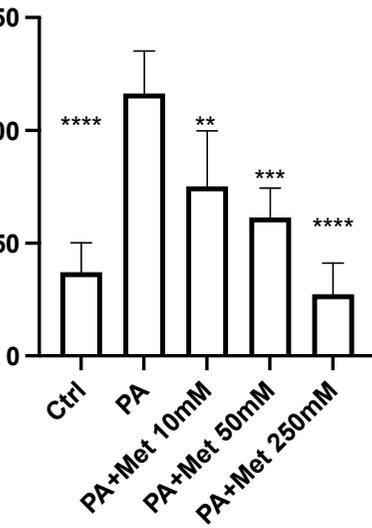
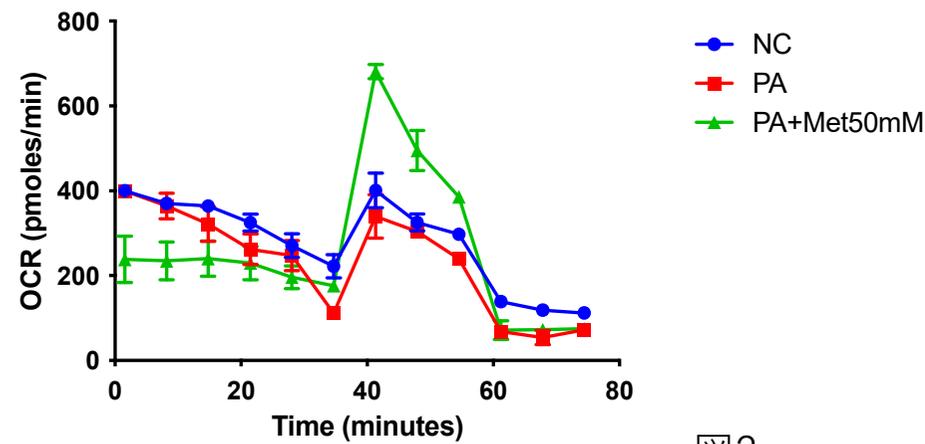
A C2C12_Trim63**B C2C12_Fbxo32****C C2C12_Hdac4****D C2C12_Foxo1****E C2C12_Fasn****F C2C12_Scd1****G C2C12_Tnfa****H C2C12_PA****I OCR Data**

図2. メチオニンによるC2C12筋管細胞の筋萎縮抑制効果

Real-time PCRによる遺伝子発現の評価 (A) *Trim63*, (B) *Fbxo32*, (C) *Hdac4*, (D) *Foxo1*, (E) *Fasn*, (F) *Scd1*, (G) *Tnfa*.

(I) 細胞内パルミチン酸濃度($\mu\text{mol/mg}$)。 (J) 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能評価。
Met, メチオニン; OCR, 酸素消費速度; PA, パルミチン酸.

検定によるPA群との比較。 **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.