寝たきりや無重力による筋萎縮に有効な 機能性食材の開発

福島 拓*・榊原伊織*・二川 健*、**

(*徳島大学大学院医歯薬学研究部生体栄養学分野, **徳島大学大学院宇宙栄養研究センター)

Development of functional foods effective for bedridden and weightlessness-induced muscle atrophy

Taku Fukushima*, Iori Sakakibara*, Takeshi Nikawa*, **

* *Department of Nutritional Physiology, Institute of Medical Nutrition, Tokushima University Graduate School, 3-18-15, Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima, 770-8503*

** *Biomedical Sciences Institute of Space Nutrition, Tokushima University Graduate School, 3-18-15, Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima, 770-8503*

*、** 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15

As Japan enters a super-aging society, there is an urgent need to extend the healthy life span of the elderly. In order to extend the healthy life span, it is essential to prevent physical declines caused by aging. One of the age-related changes is muscle atrophy (sarcopenia). Previous studies have shown that age-related muscle atrophy is caused by a mechanism similar to that of bedridden and weightlessness-induced muscle atrophy. Weightlessness induces oxidative stress and increased expression of the ubiquitin ligase Cbl-b, which induces ubiquitination and degradation of IRS-1 and inhibits IGF-1 signaling, resulting in muscle atrophy. ROS accumulation can be suppressed by antioxidant polyphenols, and Cbl-b can be inhibited by the Cblin peptide (Cbl-b inhibitor) and the anti-ubiquitinating soy protein glycinin. Furthermore, recent studies have shown that morin, a natural flavonoid with potent antioxidant properties, inhibits muscle atrophy induced by dexamethasone (Dex). We propose the usefulness of these functional ingredients and the importance of nutrition for muscle atrophy and aim to devise a nutritional treatment.

1. はじめに

日本は超高齢社会を迎えており、高齢者の健康寿命延伸の重要性はますます高まっている。加齢によりさまざまな身体的変化が引き起こされるが、その加齢性変化の一つに筋萎縮（サルコペニア）が挙げられる。これまでの研究で、加齢による筋萎縮は寝たきりや無重力による筋萎縮とよく似たメカニズムで起こることがわかってきた。寝たきりや無重力による筋萎縮を抑制する機能性食材は、サルコペニアの抑制にもつながるため、社会的にも有意義である。本稿では、我々が現在までに行ってきた研究成果および加齢や寝たきり、無重力による筋萎縮に有効な機能性食材の開発について紹介する。

2. 加齢や無重力による筋萎縮のメカニズム

(1) 微小重力環境下における酸化ストレスの増加

通常の機械的負荷がかかる状態にある筋肉は絶えず合成と分解を繰り返している。この筋肉（タンパク質）の合成と分解のバランスが一定になっていることで筋肉量が維持されている。しかし、宇宙空間のような無重力環境下での生活や寝たきりなどの機械的負荷が減少する unloading 環境においては、筋タンパク質の合成が抑制されると同時に、筋タンパク質の分解が亢進し、筋萎縮が引き起こされる。

微小重量環境下での筋萎縮を明らかにするために、2010年に我々は宇宙実験「Myolab」を行った。Myolab

宇宙実験では、L6 筋管細胞を宇宙空間に打ち上げ、軌道上で10日間培養したのちに固定し、代謝産物の網羅的解析を行うためにメタボローム解析を実施した。解析の結果、酸化ストレス (Reactive oxygen species: ROS) の指標である酸化型グルタチオン (GSH) と還元型グルタチオン (GSSG) の比率に変化が見られ、微小重力環境下での ROS の蓄積が示唆された¹⁾。さらに、地上での模擬微小重力モデルである3D-Clinorotation に供した L6筋管細胞実験でも「Myolab」宇宙実験と同様の結果がみられ、無重力ストレスが細胞内に ROS を蓄積させることが示された。これらの結果は、16日間の宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋では ROS 応答性の遺伝子発現が上昇していたという、我々の先行研究とも合致しており、微小重力環境下では ROS が産生されることを見出した。

(2) Cbl-b による IGF-1シグナルの抑制

微小重力環境下で上昇した ROS は、ERK のリン酸化を介して、Early growth response-1, 2 (Egr-1, 2) の mRNA およびタンパク質の発現上昇を引き起こし、その後、Egr-1, 2は、ユビキチンリガーゼ Casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) の発現を誘導する¹⁾。Cbl-b は、中央部にユビキチンリガーゼの機能を持つ RING フィンガードドメインを有し、さらに N 末端にはリン酸化したチロシンとの結合ドメインをもち、受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達を負に調節する機能をもつことが知られている。地上での模擬微小重力モデルである3D-Clinorotation 誘導性の Cbl-b の増大は、Egr-1 および Egr-2のノックダウンによって抑制されることも明らかにした。

Cbl-b は IGF-1の細胞内シグナル分子である insulin receptor substrate-1 (IRS-1) を基質としており、IRS-1をユビキチン化することによる IRS-1タンパク質の分解を誘導することで、IGF-1シグナルを障害する。IGF-1シグナルの障害は GSK3, S6K, mTOR の活性を抑制し、タンパク質合成の抑制を誘導する。さらに、FOXO を介した muscle atrophy F-box protein (MAFbx) /atrogen-1などの筋萎縮関連遺伝子の転写を引き起こし、筋タンパク質の分解が促進され、筋萎縮が起こる²⁾ (図1)。

(3) グルココルチコイドによる骨格筋の筋萎縮

グルココルチコイドは副腎皮質から分泌されるホルモンの一つであり、糖質やタンパク質、脂質などの代謝や免疫反応、ストレス応答の制御に関わる。グルココルチコイドは、炎症性疾患の治療薬として最もよく使われるが、一方で筋肉のタンパク質分解を増加させ、タンパク質合成を減少させることにより、骨格筋の筋萎縮を引き起こす。合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (Dex) は、長時間作用型の合成グルココルチコイドで

図1 筋萎縮を抑制する機能性食品の作用機序

あり、筋肉のタンパク質分解を促進し、タンパク質合成を抑制することで骨格筋の萎縮を引き起こす。Dexは、遺伝子発現経路でグルコルチコイド受容体 (GR) を介してジンクフィンガー転写因子ファミリーの一員である Krüppel-like factor 15 (KLF15) の発現を誘導する。KLF15の直接的な発現量増加に伴って、ユビキチンリガーゼ MAFbx1/atrogen-1や MuRF-1などの筋萎縮関連タンパク質の発現を増加させる。このグルコルチコイド受容体を介した遺伝子の発現誘導経路に加えて、DexはROSを誘導し、ROS誘導性の筋萎縮も引き起こす。

上記のことから、無重力環境下、および、Dexにより引き起こされる筋萎縮には、ユビキチンリガーゼとROSが重要な因子になることがわかった。この筋萎縮のメカニズムから、筋萎縮を予防する機能性食材のターゲットとして、抗酸化栄養素としてポリフェノール、および、ユビキチンリガーゼ Cbl-b の阻害食材として大豆タンパク質に着目した。

3. 筋萎縮に有効な抗酸化栄養素

(1) ケルセチンの ROS 抑制効果

ポリフェノールは、野菜に含まれる天然化合物で、高い抗酸化活性、低い毒性、核酸や酵素と相互作用する構造的な柔軟性をもっている。ポリフェノールは、ユビキチンリガーゼ MAFbx1/atrogen-1や MuRF-1などの筋萎縮関連タンパク質を減少することで、Dex 誘発性の筋萎縮を効果的に抑制することがわかっている。また、我々は以前の研究で神経切除マウスのミトコンドリアを標的として、食事性ケルセチンが廃用性筋萎縮を予防することを明らかにした³⁾。微小重力環境下での ROS 上昇に伴う筋萎縮を抑制するために、ROS を軽減できる食事成分としてケルセチンというポリフェノールの一種に着目した。ケルセチンは、タマネギやブロッコリーなどの

身近な野菜に豊富に含まれているポリフェノールであり、ラジカルを補足することにより ROS を抑制する。ケルセチンによる廃用性筋萎縮の抑制効果を評価するために、1 日間あるいは 14 日間に及ぶケルセチン摂取を行ったマウスに坐骨神経切除により筋萎縮を誘導し、坐骨神経切除後 4 日目に筋湿重量および筋繊維径を評価した。その結果、14 日間のケルセチン摂取を行った群でのみ筋萎縮の抑制がみられた。この結果から、ケルセチンが廃用性筋萎縮を抑制するためには、ある一定量のケルセチンが標的骨格筋に蓄積することが必要であることが明らかにされた。また、ケルセチンはタンパク質分解抑制の主要なリン酸化経路である Akt のリン酸化を活性化することもわかっている。ケルセチンの摂取は無重力や寝たきりによる筋萎縮に伴うミトコンドリアの機能低下、特にミトコンドリアの生合成の低下を防ぎ、ROS 増大を抑制することで、筋萎縮を抑制すると考えられる。

(2) プレニル化ポリフェノール

ホップやビールの含有成分である 8-プレニルナリンゲニンは、ナリンゲニンの 8 位にジメチルアリル基が結合したプレニルフラボノイドの一種である。ビールの製造過程や生体内の酵素反応、腸内細菌による代謝によってもホップ中の前駆物質（キサントフモール）から生成するため、抗菌作用や抗酸化作用、抗がん作用など、健康維持・増進効果に関与する食品因子として期待されている。C57BL/6 マウスに 8-プレニルナリンゲニン、あるいはナリンゲニンを混合した飼料を与えた後、廃用性筋萎縮の抑制効果を評価した。その結果、8-プレニルナリンゲニンは骨格筋の萎縮を抑制するという結果が示された一方で、ナリンゲニンには効果がみられなかった。このことから、プレニル基の導入により骨格筋での生理機能性向上を誘発できることが明らかとなった。また、8-プレニルナリンゲニンの体内動態を解析すると、8-プレニルナリンゲニンはナリンゲニンよりも消化管から吸収されにくく、排出されにくいことがわかり、長時間の摂食により 8-プレニルナリンゲニンは血中濃度と骨

格筋への蓄積がナリンゲニンよりも高くなることが明らかとなった⁴⁾。これらのことから、プレニル化したポリフェノールを豊富に含む食材を習慣的に摂取することで、骨格筋でのより強い生理機能性を発揮できると考えられた。

(3) モリン

モリンはケルセチンの構造異性体であり、黄色の色素をもつバイオフィラノイドであり、モクセイ科の植物に多く含まれている。しかし、骨格筋に対するモリンの影響についての報告は少ない。そのため、我々は、骨格筋萎縮に対するモリンの効果を評価するために、マウス C2C12 筋管細胞を Dex で処理し筋萎縮関連分子、筋管径、活性酸素量を測定した。その結果、モリンがマウス C2C12 筋管細胞における Dex 誘発性の活性酸素の蓄積と P66shc の発現を有意に抑制した。また、Dex による筋管径の萎縮や、筋萎縮に関連するユビキチンリガーゼである MAFbx1/atrogen-1, MuRF-1, Cbl-b の発現を効果的に抑制した⁵⁾ (図 2)。

Dex はミオシン重鎖タンパク質の発現量を減少させ、筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現量を増加させることを明らかにした。また、Dex はリン酸化された Foxo3a を有意に減少させ、Foxo3a の発現を増加させた。IGF-1 シグナルの下流分子である Foxo3a の脱リン酸化が亢進すると、MAFbx1/atrogen-1 や MuRF-1 などの筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現が誘導される。このことから、我々はモリンの存在下または非存在下で Dex を投与した C2C12 筋管細胞における Foxo3a のリン酸化を調べた。その結果、Dex 投与群は C2C12 筋管細胞における Foxo3a の総発現量を増加させたが、リン酸化された Foxo3a のレベルを有意に低下させた。興味深いことに、モリンは Dex によって C2C12 筋管細胞に誘導された Foxo3a の増加とリン酸化 Foxo3a レベルの減少を効果的に逆転させた。

グルココルチコイドは筋繊維タイプを速筋タイプから遅筋タイプへと切り替える効果があることから、モリン

図 2 モリンによるユビキチンリガーゼの発現量抑制効果

(Ulla, A. *et al.* Arch Biochem Biophys. 704, 108873, 2021)

図3 モリンによるデキサメタゾン誘発性筋萎縮抑制効果

(Ulla, A. *et al.* Arch Biochem Biophys. 704, 108873, 2021)

でも同じような筋繊維タイプ変化が誘導されるか調べた。モリン投与は C2C12 筋管細胞の slow-type MyHC のレベルを上昇させ、さらに遅筋型筋繊維の誘導に関連する共転写因子である PGC-1 α の発現量も有意に増加することが明らかとなった⁵⁾。

これらの結果から、モリンは、ROS を軽減することで、グルコルチコイドによる筋萎縮を効果的に予防することが示唆された (図 3)。

4. Cbl-b を阻害する栄養素

(1) Cblin ペプチドの発見

廃用性筋萎縮で発現が増大するユビキチンリガーゼ Cbl-b は、IRS-1 のユビキチン化と分解を促進することにより、IGF-1 シグナルを負に制御する。そのため、加齢による筋萎縮や無重力、寝たきりによる筋萎縮の抑制には、Cbl-b のユビキチン化活性を阻害することが有効であると考えられる。一般に、ユビキチンリガーゼは基質タンパク質のある部分 (ペプチド) の立体構造を認識して結合する。ユビキチンリガーゼ Cbl-b は、基質タンパク質のリン酸化されたチロシンを認識して結合する。そのため、IGF-1 シグナル伝達に伴って引き起こされる IRS-1 のチロシンリン酸化部位を中心にペプチドを人工合成し、それらによる Cbl-b の IRS-1 ユビキチン化の競合阻害を試みたところ、DGpYMP の配列を有するペプチドが強いユビキチン化阻害作用があることを見出した。このペプチドを Cbl-b の阻害剤という意味合いで “Cblin” (Cbl-b inhibitor) と名付けた。この Cblin ペプチドは坐骨神経切除や飢餓状態、グルコルチコイドホルモンによる筋萎縮の抑制に有効である。

(2) Cblin-rich rice (CbR)

赤間らは抗筋萎縮作用を持つ食品を作るために、トランスジェニック Cblin 高発現米 (CbR: Cblin peptide-enriched rice) を構築した⁶⁾ (図 4)。これは、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を豊富に含むトランスジェニックイネを開発し、Asp-Gly-Tyr-Met-Pro をイネ種子に安定的に蓄積する新規植物システムである。イネのグルテリン遺伝子に、キモトリプシン消化によって処理された 15 個の Gln-Asp-Gly-Tyr-Met-Pro-Trp (Cblin-like peptide) リピートをコードする DNA 断片を挿入することで、Cblin ペプチドを豊富に含むトランスジェニックイネである。これまでの研究で、Gln-Arg をスペーサーとしたノボキニンヘキサペプチドの 4 つのリピートとラクタスタチンペンタペプチドの 6 つのリピートが、機能性ペプチドのイネ粒への発現効果を高めることが示されている。我々はスペーサーに Trp を用い、CBLB との結合を妨げるとされる正電荷を持つ塩基性の Arg を避けた。また、機能を失う可能性のある末端アミノ酸 Asp と Pro を変更するのではなく、バックボーン構造を保存し、胃でのキモトリプシンの認識と消化のために Gln と Trp を挿入することで、挿入したペプチド配列の発現と放出の効率を高めた。

(3) CbR の筋萎縮抑制作用

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害作用を有するペンタペプチド (Arg-Val-Pro-Ser-Leu) を経口投与すると、高血圧自然発症ラットの血圧が低下する。我々は以前、メチル化されたペプチド結合を持つテトラペプチド Gly-Sar-Sar とペンタペプチド Gly-Sar-Sar が、ジベ

図4 CbRの構造と作用機序

(Akama, K. *et al.* Biosci Biotechnol Biochem. 85, 1415-1421, 2021)

プチドやトリペプチドに比べて程度は低いですが、ラットで吸収されることを発見した⁷⁾。一方で、Cblin ペプチドが同様に吸収されるかどうかは、明らかにされていない。そのため、我々は Asp-Gly-Tyr-Met-Pro が腸で吸収されるかどうか、さらには、CbR がマウスの筋肉萎縮を防ぐことができるかどうかを調べた。まず、トランスジェニックイネ種子における15種類の Cblin ペプチドリピートの消化性を評価した。その結果、経口摂取された CbR に含まれる Cblin ペプチドが上皮細胞からタイトジャンクションを經由してマウスの血液中を循環することを明らかとした⁸⁾。次に、坐骨神経切除を行ったマウスを用いて、CbR の経口摂取による抗筋萎縮効果を評価した。その結果、CbR 摂取群では、坐骨神経切除による筋萎縮を抑制することが明らかとなった(図5)。さらに、CbR 摂取群では坐骨神経切除を行っても、IRS-1およびその下流で制御される筋萎縮関連遺伝子である Mafbx や Murf-1遺伝子発現量が抑制されていた(図6)。Cblin ペプチドが、その代謝物と相乗的に作用して、マウスの筋萎縮を抑制することを示した。これらのことから、CbR を含んだ標準的な食事は、ヒトの筋萎縮を予防し、治療させるための代替的なアプローチになる可能性が示唆された。

図5 食餌の Cblin 米が坐骨神経切除マウスの GA 重量に及ぼす影響

(Nakao R. *et al.* NPJ Science of Food, in press)

(4) 大豆タンパク質

大豆タンパク質の一種であるグリシニン Cblin ペプチドと類似配列をもつ。そこで、グリシニン食を坐骨神経切除したマウスに摂取させ解析したところ、グリシニン含有量に比例して、全脛骨筋の湿重量および横断面積が増大した。また、グリシニン食は全脛骨筋内の IRS-1 のユビキチン化を抑制し、その量を増大させた上、IRS-1 の下流シグナル分子である AKT も活性化(リン酸化)した⁹⁾。さらに、ヒトを対象とした食事介入試験においても同様の結果が得られた。この実験では、寝たきり傾向にある患者に1か月間、1日あたり約8グラム的大豆タンパク質を摂取させた。その結果、大豆タンパク質を摂取した寝たきり傾向の患者は、摂取前と比べ筋力が有意に上昇した。このことから、大豆タンパク質は、寝たきり患者の筋力減少の抑制にも有効であることがわかった¹⁰⁾。

以上のことから、廃用性筋萎縮を予防するための食材としてプレニル化したポリフェノールを多く含む食材と大豆タンパク質の組み合わせが有効であると考えられる。さらに最新の研究から、筋萎縮を抑制する新しい抗酸化物質としてケルセチン構造異性体であるモリンの ROS 軽減作用を明らかにし、また、CbR の開発により、筋萎縮抑制作用のある栄養素および食材を新たに見出すことができた。

5. Myolab と機能性食材の今後の展望

(1) 細胞の重力センシング機構の解明

これまでに我々がやってきた宇宙実験により、単一の細胞が宇宙空間の微小重力環境に反応して細胞内シグナルを変化させることが明らかとなった。しかし、細胞がどのように重力の変化を感知しているのか、細胞には重力センサーのようなものが存在するのかは未だ解明されていない。したがって、我々は地上実験の結果に基づいて、ミトコンドリアなどの比重と質量の大きい細胞内小器官がアクチン細胞骨格と相互作用しており、重力変化による相互作用の変化が骨格の張力に影響することで、

図6 IRS-1および atrogene の発現に対する Cblin 米食の影響

(Nakao R. *et al.* NPJ Science of Food, in press)

骨格と接合している受容チャネルの活性変化を引き起こすという仮説を立てた。この仮説を直接解明するために、名古屋大学の曾我部先生、小林先生と共同実験を国際宇宙ステーション (ISS) で行う。この実験では、世界で最初の宇宙共焦点顕微鏡システムを用い、細胞骨格の張力や受容チャネルの活性を随時観察する。また、培養筋細胞を用いて、微小重力環境における筋萎縮メカニズムの解明およびその治療薬開発を目指す。

(2) 筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の発見

我々は、廃用性筋萎縮を予防・治療するために、無重力や寝たきりにより影響を受けた IGF-1 シグナルを回復する天然バイオ素材として、Cblin ペプチドや台湾ツルの根に豊富なテルペノイド Celastrol を発見した。今回の Myolab 宇宙実験ではこれら天然バイオ素材の実際の無重力による筋萎縮への有効性や相加効果を確認する。この実験は、徳島大学と Yonsei 大学が共同して無重力による筋萎縮を予防しうる食材の開発を目指す (図7)。

6. おわりに

超高齢社会を迎えた日本は、高齢者の健康寿命延伸の必要性に迫られている。このような現状のなか、我々は廃用性筋萎縮の予防に有効な機能性食材の研究を長年行ってきた。この間に、筋萎縮を予防しうる機能性食材のターゲットとして抗ユビキチン化作用のある大豆タンパク質や抗酸化ストレスを軽減できるポリフェノールの有用性を明らかにしてきた。さらに、我々の最新の研究成果から、天然フラボノイドであるモリンが筋萎縮作用の抑制に効果的であることが明らかとなった。また、Cblin ペプチドを豊富に含む Cblin 高発現米 (CbR) の開発により、筋萎縮抑制作用のある食材を新たに見出すことができた。今後も廃用性筋萎縮を抑制する機能性成分の探究をしていくと同時に、これらの成分を多く含む機能性食材の開発も進めていきたい。

最後に、これまでの我々の研究成果は大変多くの方々に支えられて蓄積してきた結果である。我々の研究に携わっていただいた方々に心より感謝申し上げる。

右：無重力や寝たきりによる筋萎縮予防に有効なバイオ素材の探求
左：細胞の重力センシング機構のイメージング解析

図7 徳島大学の参画する宇宙実験

文 献

- 1) Uchida, T., Sakashita, Y., *et al.* Reactive oxygen species upregulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 314, C721-C731 (2018)
- 2) Nakao, R., Hirasaka, K., *et al.* Ubiquitin Ligase Cbl-b Is a Negative Regulator for Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling during Muscle Atrophy Caused by Unloading. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4798-4811 (2009)
- 3) Mukai, R., Matsui, N., *et al.* Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *J. Nutr. Biochem.* 31, 67-76. 2016
- 4) Mukai, R., Horikawa, H., *et al.* Prevention of Disuse Muscle Atrophy by Dietary Ingestion of 8-Prenylnaringenin in Denervated Mice. *PLoS One.* 7, 1-11 (2012)
- 5) Ulla, A., Uchida, T., *et al.* Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes. *Arch Biochem Biophys.* 704, 108873 (2021)
- 6) Akama, K., Shimajiri Y., *et al.* Functional rice with tandemly repeated Cbl-b ubiquitin ligase inhibitory pentapeptide prevents denervation-induced muscle atrophy in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem.* 85, 1415-1421 (2021)
- 7) Hanh, V. T., Shen, W., *et al.* Effect of Aging on the Absorption of Small Peptides in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5935-5943 (2017)
- 8) Nakao, R., Shen, W., *et al.* Oral intake of transgenic rice containing ubiquitin ligase inhibitory Cbln pentapeptide prevents atrophy in denervated skeletal muscle of mice. *NPJ Science of Food, in press* (2021)
- 9) Abe, T., Kohn, S., *et al.* Soy glycinin contains a functional inhibitory sequence against muscle-atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b. *Int. J. Endocrinol* (2013)
- 10) Hashimoto, R., Sakai, A., *et al.* Effects of dietary soy protein on skeletal muscle volume and strength in humans with various physical activities. *J. Med. Investig.* 62, 177-183 (2015)

本稿は、第62回大会における特別講演をまとめたものである。