

卵白タンパク質による低栄養性筋萎縮の抑制メカニズムの解明

(国研) 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・研究グループ長 大石 勝隆

■ 緒 言

超高齢社会に突入したわが国では、健康寿命延伸のため加齢により引き起こされる様々な疾患や障害に対する予防・治療法の開発が急務となっている。多くの高齢者において認められる低栄養は、骨格筋を萎縮させる一因となっている。骨格筋の萎縮は、日々の生活行動に支障をきたし生活の質を低下させる。骨格筋萎縮の予防・改善において運動療法が有効であるが、運動器の障害や基礎疾患などにより寝たきりとなった高齢者にとって、筋肉量を増加させるほどの強度の運動療法はハードルが高い。そこで、我々は食事療法による筋萎縮の予防・改善法の開発に取り組んできた。これまでの研究により、低栄養による筋萎縮モデルとしてケトン体食摂餌マウスを開発した¹⁾。本研究では、アミノ酸スコアが優れている卵白タンパク質は低栄養性筋萎縮の予防・改善作用を有するかどうかモデルマウスを用いて検討を行った。

■ 方 法

実験①：7週齢の雌性 ICR マウス 9 匹を日本 SLC より入手した。AIN93M を給餌し 2 週間かけて飼育環境に馴化させた。実験に使用したケトン体食(KD)の PFC 比は 4.7 : 94.5 : 0.8 とし、ココナッツ油とラードを等量ずつ脂質源に用いた。タンパク質源は、対照としてカゼイン(CAS)のみ(CAS/KD)または卵白タンパク質(EWP、乾燥卵白 K タイプ(キューピー株式会社))のみ(EWP/KD)の 2 種類の KD を作製した。9 週齢の ICR マウスを AIN93M 群、CAS/KD 群、EWP/KD 群の 3 群に分け、試験食を 21 日間自由摂餌させた。体重および摂餌量は 7 日ごとに測定した。試験期間終了後、血液、子宮周囲白色脂肪組織、腓腹筋を採取した。血液は血清を分離後、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、遊離脂肪酸濃度を検査キット(ラボアッセイシリーズ、富士フィルム和光純薬)を用いて測定した。

実験②：6 週齢の雄性 *db/db* マウス(C57BL/6J バックグラウンド)18 匹を日本 SLC より入手した。AIN93M を給餌し 4 週間かけて飼育環境に馴化させた。実験に使用したケトン体食は、実験①と同じ組成のものを使用した。10 週齢の *db/db* マウスを AIN93M 群、CAS/KD 群、EWP/KD 群の 3 群に分け、試験食を 21 日間自由摂餌させた。体重および摂餌量は 7 日ごとに測定し、試験食開始 15 日後において、四肢の握力を握力測定装置(メルクエスト)を用いて測定した。試験期間終了後、血液、精巢上体周囲白色脂肪組織、腓腹筋、肝臓を採取した。血液は血清を分離後、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、遊離脂肪酸濃度を検査キット(ラボアッセイシリーズ、富士フィルム和光純薬)を用いて測定した。アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の測定は、外部委託(オリエンタル酵母工業)により行った。採取した腓腹筋から RNAiso Plus(タカラバイオ)を用いてトータル RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit(タカラバイオ)を利用して cDNA を合成した。合成した cDNA と TB Green EX Taq II(タカラバイオ)、ライトサイクラー(ロシュ)を用いて定量リアルタイム PCR を行った。各定量値は、内部標準として Gapdh の値で割り戻して標準化を行った。採取した肝臓片は 10% 中性緩衝ホルマリンにて一晩 4℃ で固定後、70% エタノール溶液でさらに一晩脱水させた。100% エタノールとキシレンを用いて脱水・透徹後にパラヒスト(ナカライテスク)で包埋し、ミクロトームで 6μm の厚さの切片を作製した。切片はヘマトキシリンとエオシン(武藤化学)で染色後にマリノールで封入し、顕微鏡で組織像を取得した。別の肝臓片からは、メタノールとクロロホルムを用いて総脂質を抽出し、総脂質重量とトリグリセライド量を測定した。

■ 結 果

実験①：雌性 ICR マウスにおけるケトン体食による筋萎縮と卵白タンパク質によるその予防効果の検討

試験食を開始して 15 日目において AIN93M 群に比べて KD 群では有意に摂餌量が減少したが、試験期間中の体重について群間差は認められなかった(図 1A、B)。試験開始後 21 日目の子宮周囲白色

脂肪組織と腓腹筋重量を測定してみると、どちらも3群間に有意な差は認められなかったが、EWP/KD群において白色脂肪組織重量の低下傾向がみられた(図1C、D)。次に代謝に与える影響を評価するために、血中の各代謝パラメーターの測定を行った。血糖値は、AIN93M群に比べてKD群で低下する傾向があった(図2A)。血中のコレステロールとトリグリセライド濃度については3群間で差はなかったが、遊離脂肪酸濃度はKD摂餌により増大傾向が認められた。

実験②：雄性 *db/db* マウスにおけるケトン体食による筋萎縮と卵白タンパク質によるその予防効果の検討

実験①において卵白タンパク質の摂取は脂肪組織重量を低下させる傾向が認められたため、遺伝的素因による肥満モデルの *db/db* マウスを用いて検討を行った。試験食を開始すると、KD群では有意に体重と摂餌量が減少した(図3A、B)。試験開始21日後の精巣上体周囲白色脂肪組織の重量を測定すると、体重変化と一致してAIN93M群に比べてKD群では有意に重量が低下していた(図3C)。腓腹筋重量については、AIN93M群に比べてCAS/KD群では有意に重量が減少していたが、EWP/KD群と他の群との間には有意差は認められなかった(図3D)。血糖値は、AIN93M群に比べてKD群で有意に低下していた(図4A)。遊離脂肪酸濃度は、AIN93M群に比べてCAS/KD群で有意な増大を認めたが、EWP/KD群は他の群との間に有意差は認められなかった(図4D)。肝機能の指標である血中ALT濃度は、AIN93M群に比べてCAS/KD群では高い値を示した(図4E)。しかし、CAS/KD群に比べてEWP/KD群の血中ALT濃度は有意に低かった。血中の総コレステロールとトリグリセライド、ASTの濃度については、3群間で有意な差は認められなかった(図4B、C、F)。

筋力を評価するために、試験食開始15日目において四肢の握力を測定した。AIN93M群に比べて、CAS/KD群では握力が低下していた(図5A)。しかし、EWP/KD群と他の群との間に有意な差は認められなかった。腓腹筋に対する卵白タンパク質摂取の影響を検討するために、タンパク質の分解(*Atrogin-1*、*Murf1*)または合成(*Myod1*、*Igf-1*)にかかわる遺伝子の発現量を測定した。CAS/KD群に比べてEWP/KD群において、*Atrogin-1*の発現量は低値を示した(図5B)。*Myod1*発現量は、AIN93M群に比べてKD摂餌により減少した(図5D)。*Murf1*と*Igf-1*の発現量については、3群間で有意な差は認められなかった(図5C、E)。

肝機能の指標となる血中ALT濃度は卵白タンパク質の摂取で低値を示したので、肝臓に対する卵白タンパク質摂取の影響を検討した。試験食開始後21日目の肝臓の湿重量は、AIN93M群に比べてKD摂餌により減少していた(図6A左)。体重あたりの重量でみると、CAS/KD群に比べてEWP/KD群では肝臓重量は重くなっていた(図6A右)。肝臓のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行うと、すべての群においても肝細胞中に脂質が蓄積されている像が観察された(図6B)。肝臓中の脂質含量は、肝臓重量はKD摂餌により顕著に低下していたにもかかわらず、総脂質は3群間で有意差はなく、トリグリセライドについてはむしろKD摂餌により増大していた(図6D)。

■ 考 察

実験①で用いた雌性ICRマウスにおいて、CAS/KD群に比べてEWP/KD群では摂餌量は同じにもかかわらず、白色脂肪組織重量と血中コレステロール濃度が低値を示す傾向が認められた。また、ラットを用いた先行研究においても卵白タンパク質の摂取は、体脂肪を減少させることが報告されている²⁾。これらの知見から、遺伝的要因による肥満モデルである *db/db* マウスを用いて、肥満と筋萎縮に対する卵白タンパク質の作用を検討することとした。

実験②において、ケトン体食は *db/db* マウスの肥満と高血糖を顕著に改善したが、予想に反してタンパク質源の違いによる差は認められなかった。一方で、卵白タンパク質はケトン体食による筋萎縮と握力低下を抑制することを見出した。腓腹筋における遺伝子発現解析より、筋タンパク質分解に関わる *Atrogin-1* mRNAの発現量はCAS/KD群よりもEWP/KD群で有意に低値を示したことから、卵白タンパク質は低栄養時の筋タンパク質分解を抑制しうることが示唆された。分岐鎖アミノ酸は筋萎縮に対して予防効果を有することが知られているが、カゼインと卵白タンパク質では分岐鎖アミノ酸含有量に大きな差は無い。したがって、他のアミノ酸含有量または腸管における消化の際に生じるペプチドの違いにより、卵白タンパク質はカゼインよりも慢性的な低栄養による筋萎縮と筋力低下を抑制しうのではないかと考えている。

CAS/KD群ではAIN93Mを摂餌した *db/db* マウスと比べて血中ALT濃度が増大したが、EWP/KD群では血中ALT濃度の増大は認められなかった。本研究で用いたケトン体食はAIN93Mよりもタンパク質含有量が少なく、さらにケトン体食を摂取した群では、摂餌量が顕著に低下するために、ケトン体食群ではタンパク質の摂取が不足していると考えられる。タンパク質の摂取量が低下すると、肝臓

におけるトリグリセライドの蓄積が増加することが知られている³⁾。卵白にはカゼインよりもメチオニンが多く含まれているため、肝臓中のトリグリセライド量は差がなかったものの、ケトン体食摂餌による肝細胞への障害を軽減したのかもしれない。

■ 要 約

本研究では、卵白タンパク質が低栄養による筋萎縮を抑制しうるかどうかケトン体食摂餌マウスを用いて検討を行った。野生型の雌性ICRマウスにおいては、カゼインに比べて卵白タンパク質は白色脂肪組織の減少と筋萎縮の抑制傾向を示した。肥満モデルの雄性 db/db マウスにおいては、カゼインよりも卵白タンパク質を摂取した方が、ケトン体食による筋萎縮と筋力の低下を抑制できることを明らかにした。その作用メカニズムとして、卵白タンパク質は筋タンパク質分解に関わる酵素のmRNA発現量を低下させることを見出した。これらの知見は、慢性的な低栄養による筋萎縮に対する食事療法において、卵白タンパク質は有用であることを示唆している。

■ 文 献

- 1) Nakao R, Abe T, Yamamoto S, Oishi K. 2019. Ketogenic Diet Induces Skeletal Muscle Atrophy via Reducing Muscle Protein Synthesis and Possibly Activating Proteolysis in Mice. *Sci Rep.* 9 : 19652.
- 2) Matsuoka R, Shirouchi B, Umegatani M, Fukuda M, Muto A, Masuda Y, Kunou M, Sato M. 2017. Dietary Egg-White Protein Increases Body Protein Mass and Reduces Body Fat Mass Through an Acceleration of Hepatic β -Oxidation in Rats. *Br J Nutr.* 118 : 423-430.
- 3) Yokota SI, Ando M, Aoyama S, Nakamura K, Shibata S. 2016. Leucine Restores Murine Hepatic Triglyceride Accumulation Induced by a Low-Protein Diet by Suppressing Autophagy and Excessive Endoplasmic Reticulum Stress. *Amino Acids.* 48 : 1013-1021.

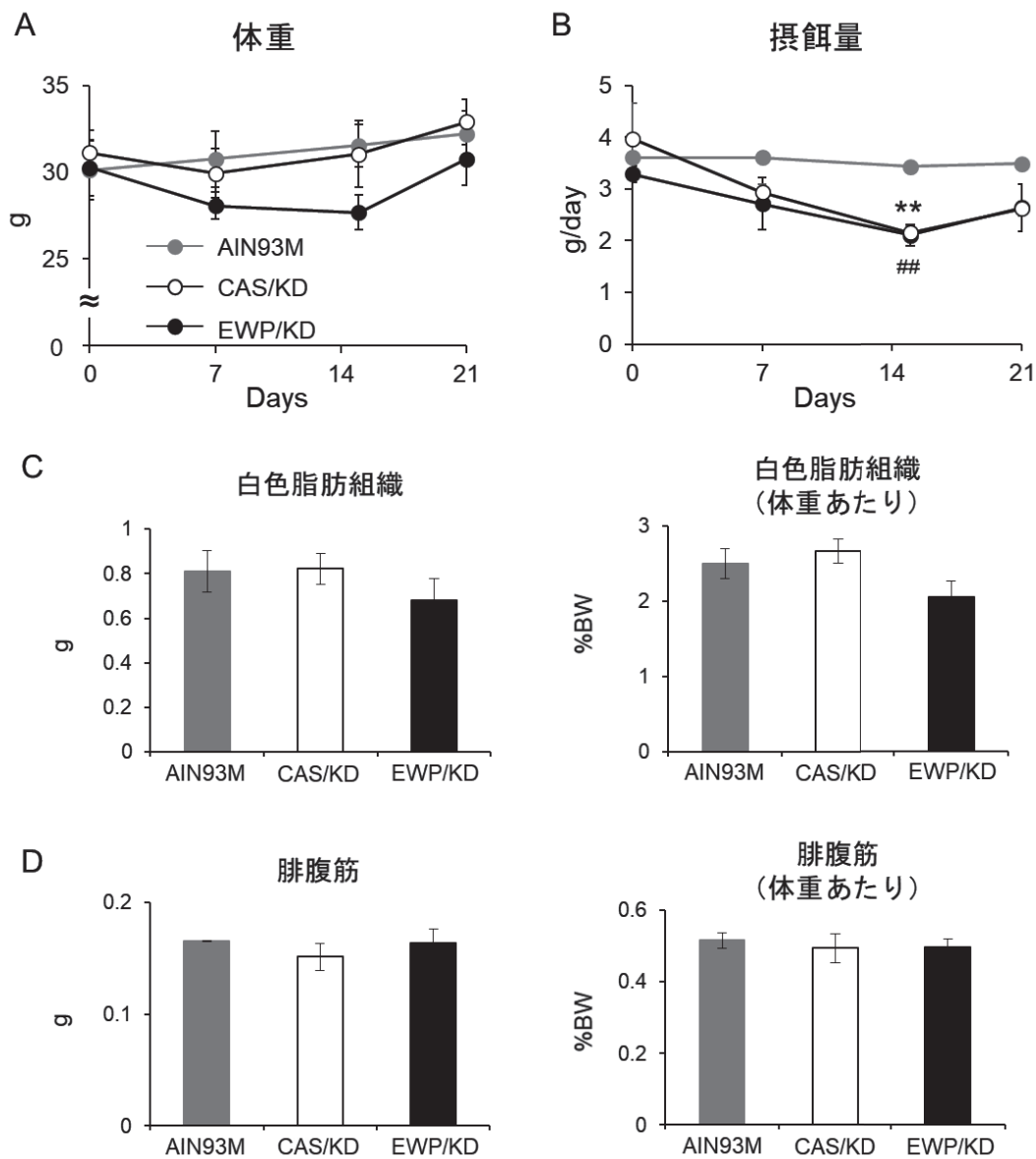


図 1. 試験食を摂餌した ICR マウスの体重、摂餌量および臓器重量
 (A, B) 試験期間中の体重(A)および摂餌量(B)。平均値±標準誤差(n=3)。
 ** $P < 0.01$ CAS/KD vs. AIN93M、## $P < 0.01$ EWP/KD vs. AIN93M。
 (C, D) 試験食摂餌 21 日後の子宮周囲白色脂肪組織(C)および腓腹筋(D)重量。
 左のグラフは湿重量を表し、右のグラフは体重(BW)に対する割合。平均値±標準誤差(n=3)。

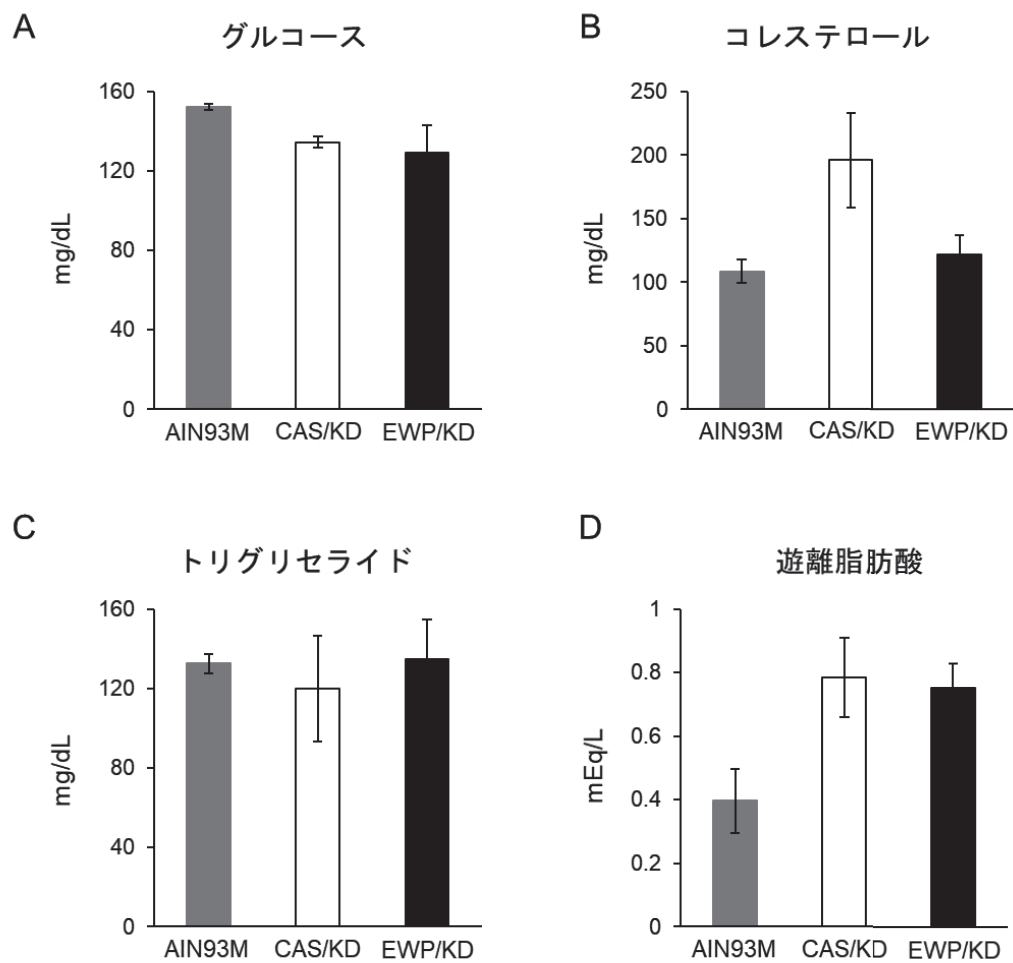


図 2. 試験食を摂餌した ICR マウスの血中代謝パラメーター濃度
試験食摂餌 21 日後の血漿中のグルコース (A)、総コレステロール (B)、
トリグリセライド (C) および遊離脂肪酸 (D) 濃度。平均値±標準誤差 (n=3)。
群間に有意差は認められなかった。

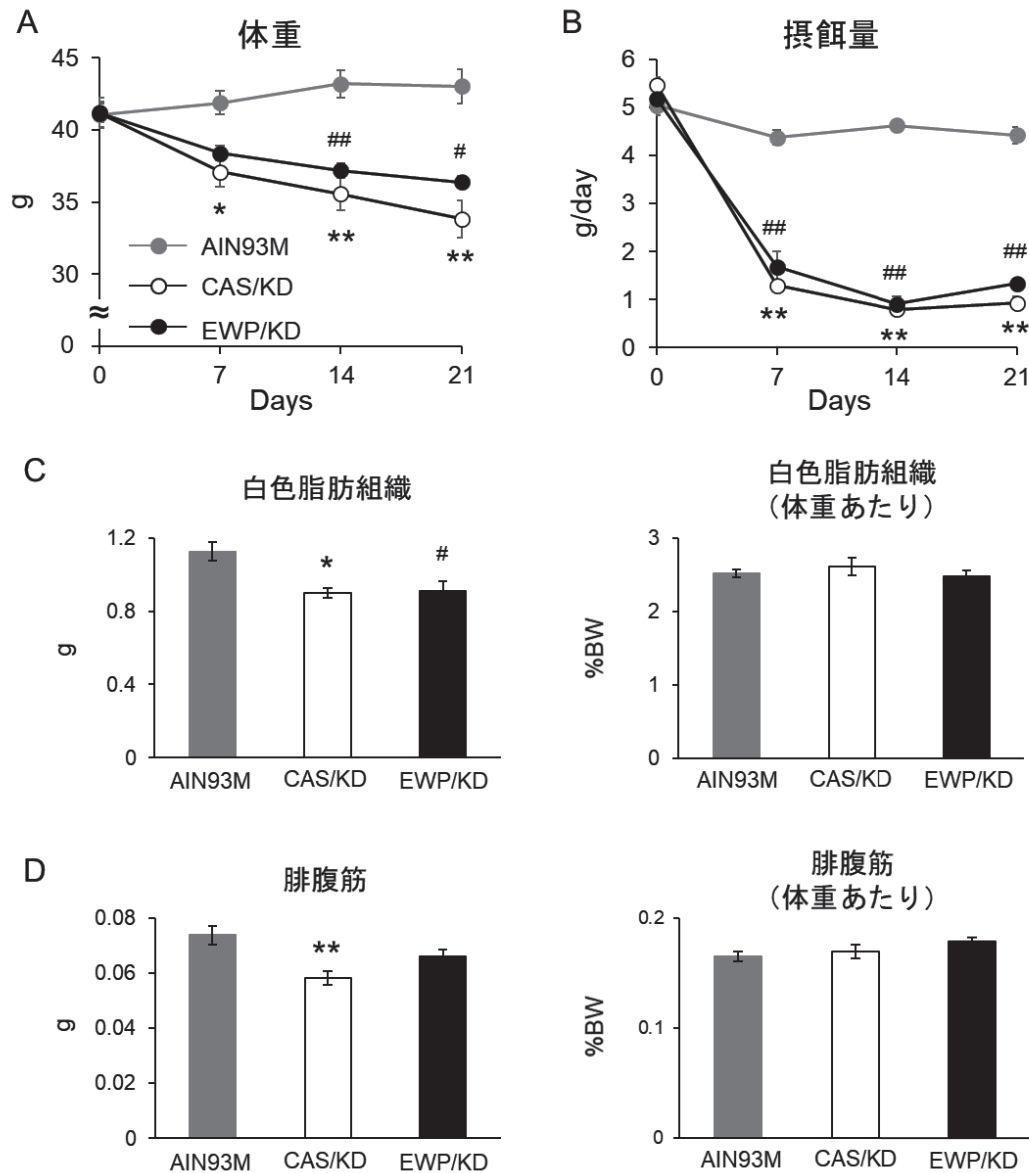


図 3. 試験食を摂餌した *db/db* マウスの体重、摂餌量および臓器重量
 (A) 試験期間中の体重変化。平均値±標準誤差 (n=6)。
 (B) 試験期間中の摂餌量。平均値±標準誤差 (n=3)。
 (C-D) 試験食摂餌 21 日後の精巢上体周囲白色脂肪組織 (C) および腓腹筋 (D) 重量。
 左のグラフは湿重量を表し、右のグラフは体重 (BW) に対する割合。
 平均値±標準誤差 (n=5 or 6)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ CAS/KD vs. AIN93M、
 # $P<0.05$, ## $P<0.01$ EWP/KD vs. AIN93M

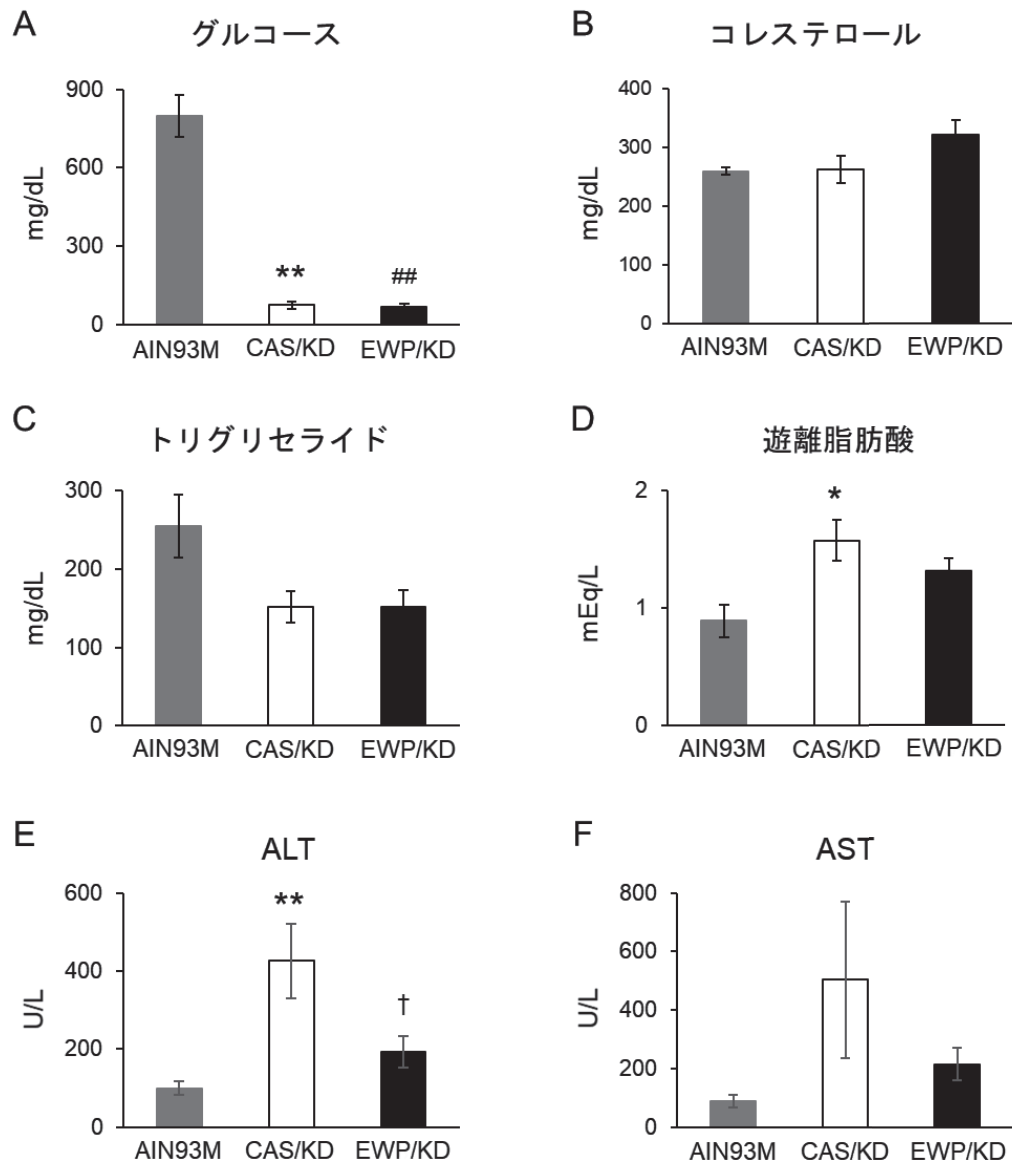


図4. 試験食を摂餌した *db/db* マウス血中の代謝パラメーターおよび肝機能指標
試験食摂餌 21 日後の血漿中の代謝パラメーターおよび肝機能指標の濃度を測定した。

グルコース (A)、総コレステロール (B)、トリグリセライド (C)、遊離脂肪酸 (D)、ALT (E) および AST (F) 濃度。平均値±標準誤差 (n=5 or 6)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ CAS/KD vs. AIN93M、## $P < 0.01$ EWP/KD vs. AIN93M、

† $P < 0.05$ EWP/KD vs. CAS/KD

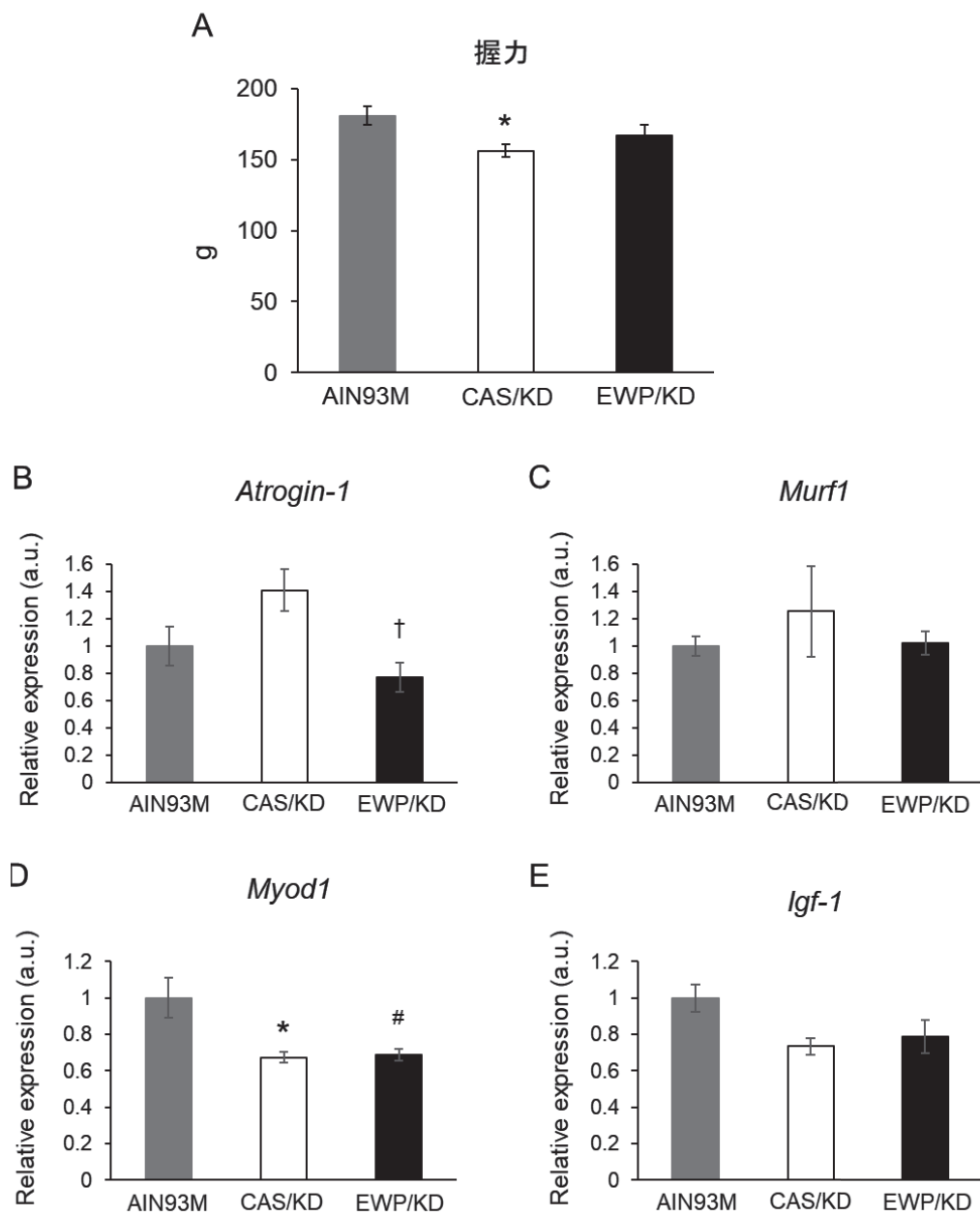


図 5. 試験食を摂餌した *db/db* マウスの握力と腓腹筋における遺伝子発現量

(A) 試験食摂餌 15 日後の *db/db* マウスの四肢の握力。平均値±標準誤差 (n=6)。

* $P < 0.05$ CAS/KD vs. AIN93M。

(B-E) 試験食摂餌 21 日後の腓腹筋における *Atrogin-1* (B)、*Murf1* (C)、*Myod1* (D) および *Igf-1* (E) の mRNA 発現量。平均値±標準誤差 (n=5 or 6)。

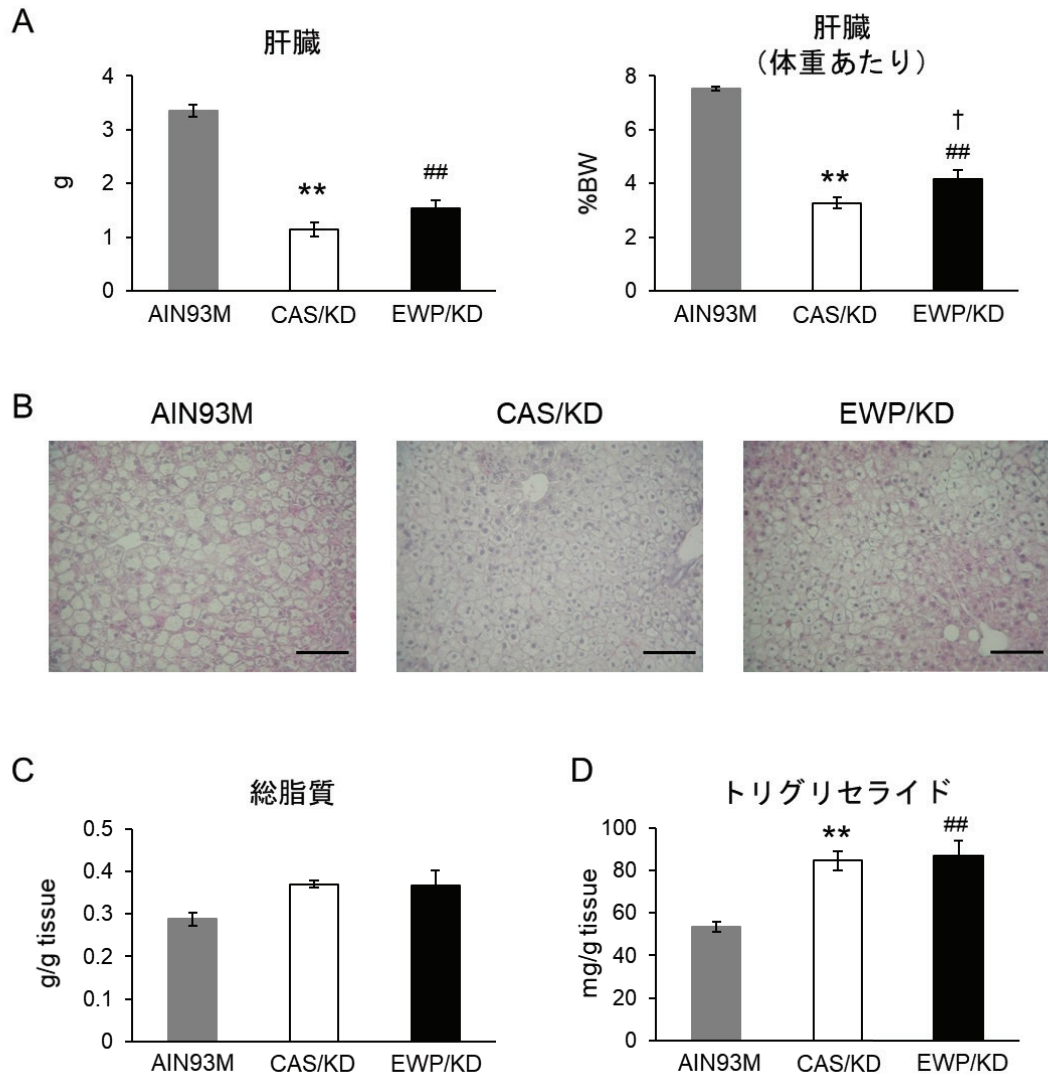


図 6. 試験食を摂餌した *db/db* マウスの肝臓の重量、組織像および脂質含量
 (A) 試験食摂餌 21 日後の *db/db* マウスの肝臓重量。左のグラフは湿重量を表し、右のグラフは体重 (BW) に対する割合。平均値±標準誤差 (n=6)。
 (B) 試験食摂餌 21 日後の肝臓をパラフィン包埋し切片 (6mm) をヘマトキシリンとエオシンを用いて染色した。Scale bar=100 μ m。
 (C, D) 試験食摂餌 21 日後の肝臓から総脂質 (C) およびトリグリセライド (D) を抽出し濃度を測定した。平均値±標準誤差 (n=5 or 6)。** P <0.01 CAS/KD vs. AIN93M、## P <0.01 EWP/KD vs. AIN93M、† P <0.05 EWP/KD vs. CAS/KD