

## 論文の内容の要旨

論文題目 ビタミン D, アミノ酸による炎症制御機構とサルコペニア治療可能性の検討

氏名 矢可部 満隆

サルコペニア（加齢性筋減少症）は、主に加齢に伴う筋量や筋力の減少を意味する。1989年に提唱され、筋力、身体機能、筋肉量などが評価項目として用いられてきたが、統一された定義、診断基準はなかった。2010年、The European Working Group on Sarcopenia in Older Peopleにより、サルコペニアは「筋量と筋力の進行性かつ全身性の減少に特徴づけられる症候群で、身体的機能障害、QOL (Quality Of Life)の低下、死のリスクを伴うもの」と定義され、「骨格筋量低下を必須とし、加えて筋力低下または身体機能の低下を伴う」という診断基準が推奨された。サルコペニアは frailty、老年症候群とも密接な関連がある。今後超高齢社会を迎える我が国において、サルコペニアによる要介護状態の予防、身体機能の維持・改善は重要な課題である。

サルコペニアの成因として、筋タンパク合成作用を持つ IGF-I/PI3K/mTOR 系の低下や、筋萎縮因子である MuRF1 と Atrogin-1 増加による筋分解能亢進の関与が示唆されている。また、「加齢によりマクロファージが様々な外的刺激にさらされ、炎症性サイトカイン分泌が亢進し、炎症が老化を促進する」という”inflammaging”も関与している可能性がある。

サルコペニアの治療には、栄養、ビタミン D、運動が重要である。摂取カロリー増加や、ロイシンを含む必須アミノ酸製剤摂取により、高齢者の筋力や身体機能が改善したという報告や、ロイシンの代謝産物である HMB ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate) が高齢者の筋量、身体機能を改善させたという報告がある。ビタミン D 不足もサルコペニアのリスク要因で、高齢者に活性型ビタミン D を投与すると下肢筋力を改善させることが示唆されている。運動では、特に筋肉トレーニングがサルコペニア改善に有効だとされる。

本研究では、HMB やビタミン D の抗炎症作用のメカニズムと、それによるサルコペニア改善効果について、*in vitro* および *in vivo* で検討した。

マクロファージからの炎症性サイトカインがサルコペニアの一因であると考え、マクロファージ由来細胞の RAW264.7 細胞を使用した。LPS (lipopolysaccharide) 刺激により、IL-6

(interleukin-6)をはじめとする炎症性サイトカインの発現は増加したが、HMBはこれらを抑制した。IL-6発現において、NFκB (nuclear factor-kappaB)系とAP-1 (activator protein 1)系は重要な役割を果たす。そこで、NFκB系とAP-1系それぞれに対するHMBの効果を検討した。

NFκBはp65とp50から成り、抑制性のサブユニットであるIκBαと結合した状態で細胞質に存在している。LPSによりIκBαがリン酸化、分解されると、IκBαから外れたNFκBが核内に移行してプロモーターのκB siteに結合する。LPS刺激によりP-IκBαが増加し、IκBαが減少したが、HMBはLPSの作用を抑制し、P-IκBα/IκBα ratioの上昇を有意に抑制した。よって、HMBにはNFκB系抑制作用があることが明らかになった。

AP-1は、c-Junおよびc-Fosから構成されており、プロモーターのAP-1 siteに結合することで、転写を開始する。この上流にはMAPK (mitogen-activated protein kinase)であるJNK1/2およびp38が、さらに上流にはMKK (mitogen-activated protein kinase kinase)であるMKK4, MKK3/6が存在する。LPS刺激により、AP-1活性は上昇し、HMBはそれを抑制した。JNK1/2, p38, MKK3/6, MKK4は、LPSによりリン酸化されたが、HMBはこれらのリン酸化を抑制した。

HMBの作用メカニズムについて、PP1α (protein phosphatase 1α)およびPKR (protein kinase R)に着目した。PKRが、LPSによるMKK3/6, p38, MKK4, JNK1/2のリン酸化、IL-6発現に必要であること、PP1αがPKRを不活化させることが報告されている。ロイシンにはPP1α発現上昇、PKRのリン酸化抑制効果があることが報告されており、HMBにも同様の作用がある可能性を考えた。RAW264.7細胞にHMBを投与すると、PP1αの発現が増加した。次に、PP1α siRNAによるノックダウンを行ったところ、HMBによるp38, JNK1/2のリン酸化抑制効果が無効化された。

以上より、HMBはNFκB系、AP-1系の両方を抑制することで、IL-6を含む炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかになった。さらに、AP-1系の抑制には、PP1αの発現上昇によるPKR活性の抑制が関与していることが示唆された。

ビタミンD作用を媒介するビタミンD受容体VDR (vitamin D receptor)については、核内受容体として様々な転写に関わることが示唆されている。VDRはp65と結合するが、VDRが炎症制御において核内に移行して転写に関与するかどうかは明らかでなかった。そこで、炎症抑制におけるVDRの作用を検討した。RAW264.7細胞で1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、LPSによるIL-6発現を抑制した。ChIPを行ったところ、LPSによりp65が、IL-6プロモーターのκB siteにリクルートされた。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による前処置後にLPS添加を行ったところ、κB siteに

VDRがリクルートされた。VDRがIL-6発現においてトランスクリプションを行う可能性が示唆された。

炎症抑制においても、両者は相乗的な効果を発揮した。HMBはPP1 $\alpha$ に作用し、ビタミンDはVDRを介して作用するという、両者の異なった作用機序が、併用による抗炎症効果をもたらすと考えられた。

後肢懸垂マウスでは、体重、ヒラメ筋重量は有意に低下し、血清IL-6の有意な増加を認めた。ヒラメ筋におけるIL-6発現には変化を認めなかった。高齢マウスでは、若年マウスと比較して、体重あたりのヒラメ筋重量が低値で、血清IL-6が有意に高値であった。このように、高齢マウスと後肢懸垂マウスには類似点を認めた。そのため、後肢懸垂マウスを用いて、炎症制御によるサルコペニアの予防可能性を検討した。1,25(OH) $_2$ D $_3$ またはHMBを投与した後肢懸垂マウスでは、ヒラメ筋重量の低下、ヒラメ筋線維断面積の低下が抑制された。これらのいずれかを投与したマウスでは、3日間の後肢懸垂によるヒラメ筋のMuRF1およびAtrogin-1の発現増加が抑制された。1,25(OH) $_2$ D $_3$ とHMBを半量としたところ、両者には併用効果を認めた。ヒトを対象とする研究でも、血中25(OH)D $_3$ 低値の高齢者ではHMBにより筋力が改善しなかったという報告がある。このことから、サルコペニアの改善にはビタミンDとHMBの両方が必要であることが示唆された。

高齢者で血清IL-6高値が筋力低下と関連することや、IL-6過剰発現マウスで筋量が低下することが報告されている。血清IL-6は、骨格筋においてSOC3の発現を増加させ、下流のIRS-1, Akt活性を低下させることにより、MuRF1, Atrogin-1の発現を増加させることが示唆されている。そのため、後肢懸垂による血清IL-6の上昇が筋萎縮に関与している可能性について検討した。抗IL-6受容体抗体をマウスに腹腔内投与したところ、後肢懸垂によるヒラメ筋重量の低下が抑制された。後肢懸垂による血清IL-6の上昇は、1,25(OH) $_2$ D $_3$ またはHMB単剤では有意に抑制されなかったが、併用により有意に抑制された。よって、過剰なIL-6を抑制することは、MuRF1, Atrogin-1の発現を抑制し、サルコペニア予防、改善をもたらす可能性があると考えられた。一方IL-6は、骨格筋の運動により分泌されるマイオカインの1つでもあり、筋の成長にも関与することが示唆されている。後肢懸垂を行うと、骨髄細胞からのIL-6産生が亢進するほか、腸管透過性の亢進により門脈内のLPS濃度が上昇することが報告されている。IL-6は多面的な作用を持ち、骨格筋により産生されるIL-6は筋萎縮に寄与しないが、他の臓器に産生されるIL-6が筋萎縮に関与している可能性が示唆された。

ヒトを対象とした研究で、栄養と運動の組み合わせが筋量、身体機能改善に有効であったという報告がある。そこで、後肢懸垂により萎縮した筋肉が、運動やHMB投与により

回復が促進されるかについても検討した。腓腹筋重量は、運動または HMB 単独では有意な回復促進を認めなかったのに対し、運動と HMB の併用を行うことで、回復が有意に促進された。体重は後肢懸垂を行った全ての群で回復し、回復期間終了時には有意差を認めなかった。よって、サルコペニアのリハビリテーションにおいて、運動と HMB を組み合わせることにより、体脂肪を大きく増やすことなくサルコペニアを改善させられる可能性が示唆された。

本研究により、アミノ酸 (HMB)、ビタミン D、運動の中から、利用可能なもの組み合わせることが、サルコペニアの予防・改善につながると考えられた。