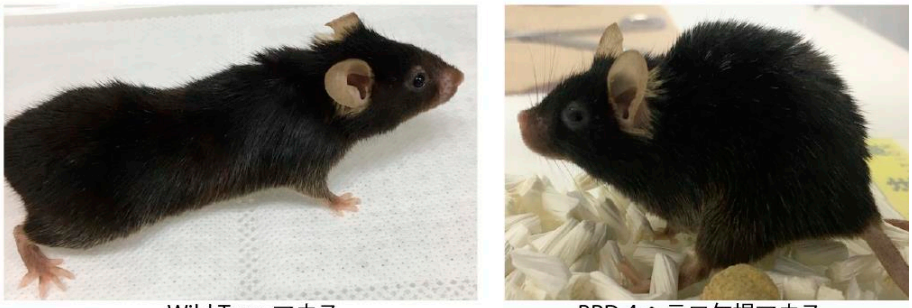
15　代謝異常からサルコペニアを呈する動物モデルの構築	望月　和樹

【目的】高齢期における代謝異常が、サルコペニア等の低栄養症状の発症の主要因であるが、代謝異常からサルコペニアを示す動物モデルは確立していない。本研究では、代謝遺伝子群の発現を促進するエピジェネティック因子 BRD4 のヘテロ欠損マウスがサルコペニアを示すか（実験 1）、BRD4 を活性化する中鎖脂肪が *Brd4* ヘテロ欠損マウスで観察されるサルコペニアを抑制できるか（実験 2）について検討することを目的とした。

【方法】実験 1．13～46 週齢の、C57BL/6J 雄野生型マウスおよび *Brd4* $^{(+/-)}$ /C57BL/6J マウスを、マウスの通常食である MF で約 100 週齢まで飼育して剖検を行い、各臓器を採取した。実験 2．54～84 週齢の雄老齢 *Brd4* $^{(+/-)}$ /C57BL/6J マウスを対照食群（con 群）、低中鎖脂肪食群（中鎖脂肪食群、対照食のラードの半分量を中鎖脂肪で置き換え）に分け、約 5 ヶ月間自由摂食させた。試験食摂取開始から約 5 ヶ月後に血漿および各組織を採取した。血中生化学指標に加え、腓腹筋のアザン染色を行うとともに、RNA マイクロアレイ解析およびリアルタイム qRT-PCR 法により、腓腹筋、ヒラメ筋の mRNA 遺伝子発現を定量した。

【結果・考察】実験 1．*Brd4* ヘテロ欠損マウスは、骨格筋重量と握力の顕著な低下および加齢性円背が認められ、老齢期サルコペニアモデルとして有用である可能性が示唆された。実験 2．*Brd4* ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与によって、副睾丸周囲脂肪の低下傾向が観察されたが、体重低下は観察されなかった。アザン染色により、中鎖脂肪食群では、筋線維周囲のコラーゲン蓄積抑制の傾向が伺われた。RNA マイクロアレイ解析および qRT-PCR 法により、中鎖脂肪食群において解糖系の副路であるペントースリン酸経路阻害関連遺伝子 *Cndp2*、クエン酸回路促進関連遺伝子 *Pcx*、脂肪滴分解に関与する *Plin3*、活性酸素種除去関連遺伝子 *Gpx2-ps 1* などの遺伝子の発現増大が確認された。さらに、腓腹筋において筋サテライト細胞からの筋再生に関与する *Myh3* の発現増大も確認された。一方、ヒラメ筋では、筋構成タンパク質をユビキチン化することにより筋萎縮を誘導する *Atrogin1* および *Murf1* の発現低下が観察された 。また、ヒラメ筋では、中鎖脂肪食群でタンパク合成関連遺伝子（*Rpl32*、*Rps21* など）の発現増大が見られた。以上のことから、老齢 *Brd4* ヘテロ欠損マウスにおける中鎖脂肪摂取は、体重や内臓脂肪量の低下を引き起こさないことが明らかとなった。さらに中鎖脂肪は、骨格筋の代謝が改善されるとともに、腓腹筋において筋サテライト系からの筋再生経路の活性化、ヒラメ筋において筋合成の活性化、筋分解が抑制され、サルコペニアのリスクを低減する可能性が考えられた。

Wild Type マウス（左）と *BRD4* ヘテロ欠損マウス（右）



Wild Type マウス　　BRD 4 ヘテロ欠損マウス

15. 代謝異常からサルコペニアを呈する動物モデルの構築

望月　和樹

山梨大学 生命環境学部

Key words：サルコペニア，代謝異常，BRD4，骨格筋

緒　言

サルコペニアの定義は、①筋肉量低下、②筋力低下または、③身体能力の低下を示す症状のことである。サルコペニアの発症と進行には、タンパク質合成、タンパク質分解、神経と筋の統合性、および筋脂肪含量などが関連する。サルコペニアが主体である高齢による衰弱、関節疾患、転倒・骨折といった運動器疾患は、要介護となる大きな要因の一つである。しかし、高齢者への介入試験のハードルが高いこと等により、サルコペニアを予防しうる食品や薬剤の開発は進んでいない。動物実験に関しては、低栄養や代謝低下に伴うサルコペニアを適切に評価しうるモデル動物が存在しないという問題点がある。例えば、老化促進マウス P8（SAMP8）において、10 ヶ月齢で筋力減少や筋線維質の変化などサルコペニア症状を呈すことが報告されている［1]。しかし、SAM マウスは部分的な高齢期疾患は反映するものの、体重増加なども見られること、骨粗鬆症（SAMP6）やヒラメ筋量低下（SAMP8）を示す系統はそれぞれ異なり同一系統で網羅的な高齢期症状は呈しないこと、代謝異常は見られないことなどの問題がある。

このような背景の中、我々は、アセチル化ヒストンに結合するブロモドメインを有するタンパク質 BRD4 のヘテロ欠損マウスは、摂食量低下、体重低下、筋肉量低下、老人性円背等のサルコペニア症状を示すことを発見した。BRD4 は、Gene body 領域のアセチル化ヒストンに結合し、転写伸長促進因子 P-TEFb を動員して、RNA 合成酵素Ⅱのリン酸化修飾を誘導することで転写伸長反応を促進させる。我々は、糖質などの栄養素の摂取によって代謝遺伝子の Gene body 領域のヒストンアセチル化修飾が上昇したときに、BRD4 が代謝遺伝子群の Gene body に結合し、脂肪合成などの代謝遺伝子群の発現を促進することを明らかにした［2]。

高齢期の代謝異常を改善しうる食品因子に炭素数 8～12 の脂肪酸からなる中鎖脂肪がある。中鎖脂肪は、長鎖脂肪と比較して極性が高く、消化吸収時に胆汁酸によるミセル化が必要ないだけではなく、吸収された後には門脈系の血管から直接肝臓へ運ばれる比率が高いため、リンパ管を経由して 6 時間以上かけて心臓に到達する長鎖脂肪酸と比較して、迅速に臓器に提供される。細胞内に入った後には、カルニチンという特異的な担体が必要なくミトコンドリア内膜を通過し代謝される。また、中鎖脂肪は、ヒストンアセチル化修飾の基質であるアセチル CoA の産生を促進する。これらから、中鎖脂肪の摂取はサルコペニアを予防・改善することが期待できる。

以上を踏まえ本研究では、①*Brd4* ヘテロ欠損マウスは老齢モデルマウスとして適しているか、②中鎖脂肪の投与はサルコペニア症状を抑制するか、を検証した。

方　法

1.　*Brd4* ヘテロ欠損マウスと Wild type マウスの比較

13～46 週齢の C57BL/6 雄マウスおよび *Brd4*$^{(+/-)}$/C57BL/6J（BRD4 群）を、通常食（MF）および水を自由摂取させた。およそ 100 週齢で安楽死させ、血液、各種臓器を摘出した。

2.　中鎖脂肪の摂取が *Brd4* ヘテロ欠損マウスにおいてサルコペニア抑制に及ぼす影響

54～84 週齢の *Brd4*$^{(+/-)}$/C57BL/6J 雄マウスを、対照食群（軽度高脂肪食、control 群 P：F：C＝17：42：41）、中鎖脂肪食群（対照食のラードの半分量を中鎖脂肪で置き換え、中鎖脂肪食群）に分け、それぞれの食餌および水を自

由摂取させた。試験食摂取開始から 174 または 175 日目に安楽死させ、血液、腓腹筋およびヒラメ筋を摘出した。

上記の動物実験において、摂食量、体重、握力、血液パラメータ、病理染色（アザン染色）、骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋）の mRNA 量（mRNA マイクロアレイ、qRT-PCR）を測定した。結果は、平均値±標準誤差（SEM）で示した。Student's *t*-test（Excell2016）を行い、$p<0.05$ を統計的有意と判断した（*$P<0.05$、**$P<0.01$）。

結　果

1. *Brd4* ヘテロ欠損マウスと Wild type マウスの比較

Brd 4 ヘテロ欠損マウスでは、Wild type マウスと比較して、加齢性円背の傾向が観察され、体重、肝臓重量、副睾丸脂肪重量、腓腹筋重量、ヒラメ筋重量、握力が低いことが確認された。

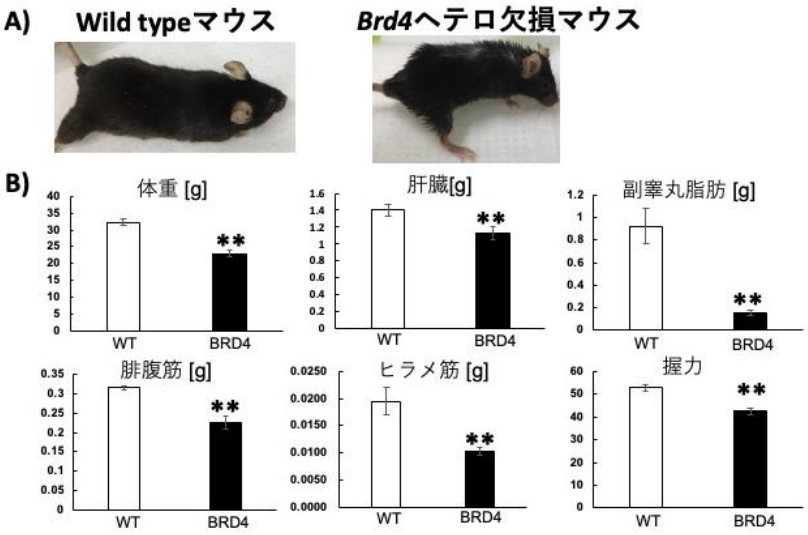


図 1. *Brd 4* ヘテロ欠損マウスと Wild type マウスの比較

A)　外見の違い。

B)　体重、臓器重量、握力。

2. 中鎖脂肪の摂取が *Brd4* ヘテロ欠損マウスにおいてサルコペニア抑制に及ぼす影響

体重はいずれも有意な差は観察されなかった。副睾丸脂肪重量は中鎖脂肪の投与によって低下傾向（$P=0.051$）を示したが、腓腹筋重量は示さなかった（図 2）。また、アザン染色陽性面積（筋線維中の膠原線維（コラーゲン等）が、中鎖脂肪投与で低下する傾向が観察された。

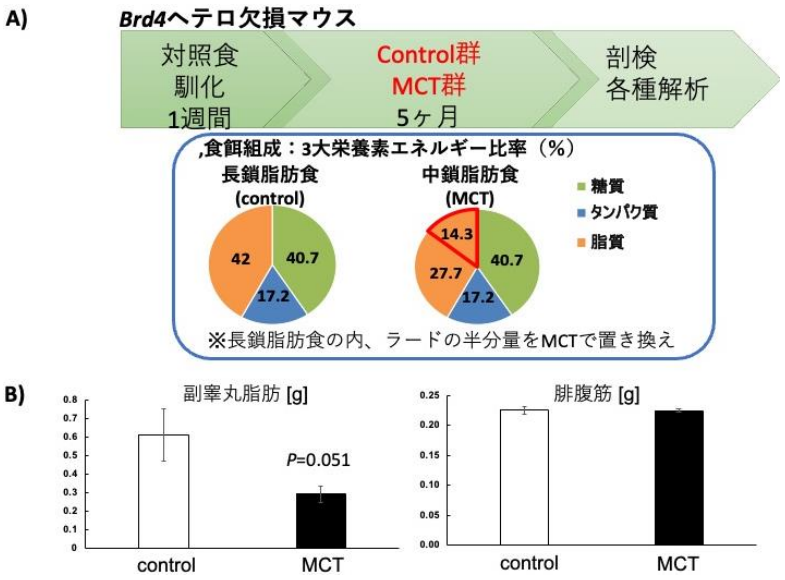


図 2. *Brd 4*ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与 Wild type マウスの比較

A) 実験計画・食餌組成。

B) 臓器重量。

マイクロアレイ解析において顕著に変化遺伝子［リニアスケール fold change1.3 以上（93 遺伝子）、 - 1.3 未満（84 遺伝子)］の中から代謝遺伝子を抽出すると、 解糖系の副路であるペントースリン酸経路阻害関連遺伝子 *Cndp2*、クエン酸回路促進関連遺伝子 *Pcx*、脂肪滴分解に関与する *Plin3*、活性酸素種除去関連遺伝子 *Gpx2-ps1* などの遺伝子が抽出され、これらの中鎖脂肪投与による発現増大は qRT-PCR 法においても確認された（図 3)。

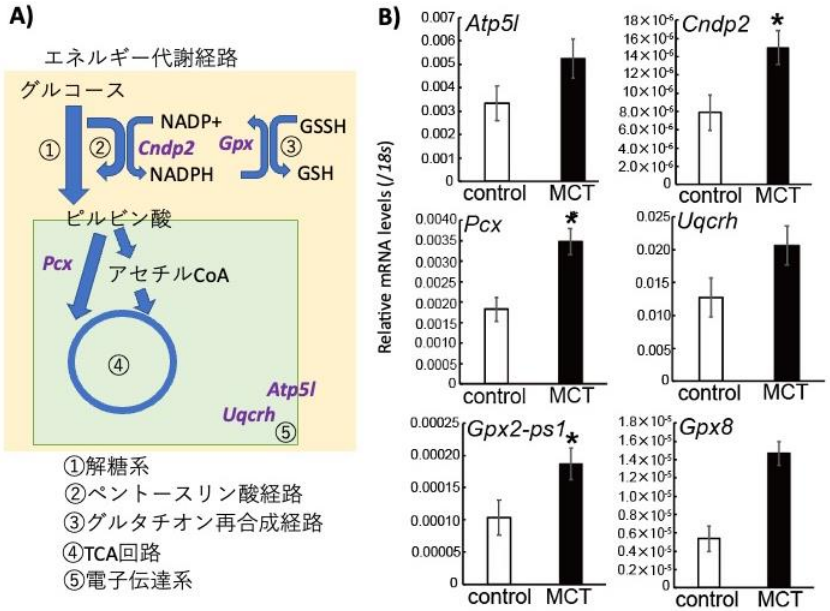


図 3. *Brd 4*ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与が代謝遺伝子の発現に及ぼす影響

A) 代謝概念図。

B) mRNA 発現。

筋萎縮の原因遺伝子であるユビキチンリガーゼ（*Murf1*、*Atrogin1*）では、ヒラメ筋において、中鎖脂肪食群の *Murf1* 遺伝子の発現は、control 群と比較して低かった。腓腹筋においては、低下する傾向は見られるものの有意な差ではなかった。腓腹筋 RNA マイクロアレイ解析によって変化があった遺伝子の中で、筋合成に関与する *Rpl32* 遺伝子および *Rps21* 遺伝子や、FOXO1 誘導性の筋分解抑制に寄与する可能性がある転写因子 *Ferd3l* 遺伝子の発現が、control 群と比較して中鎖脂肪食群において増大した。

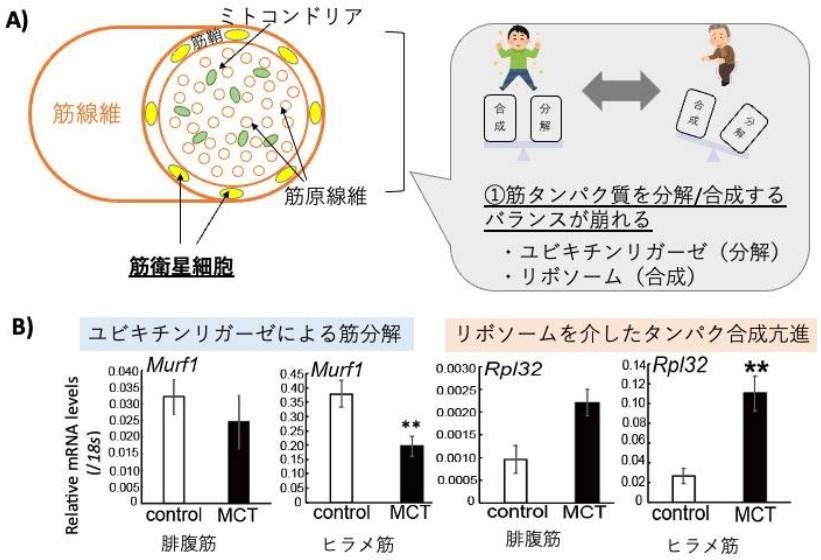


図 4. *Brd4* ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与が筋分解・合成遺伝子の発現に及ぼす影響

A) 筋合成・分解概念図。

B) mRNA 発現。

Myosin heavy chain（*Myh1-4, 6, 7*）などの発現を腓腹筋において調べた。筋衛星細胞からの筋再生に関与する *Myh3* 遺伝子の発現は、control 群と比較して中鎖脂肪食群で増大した（図 5）。

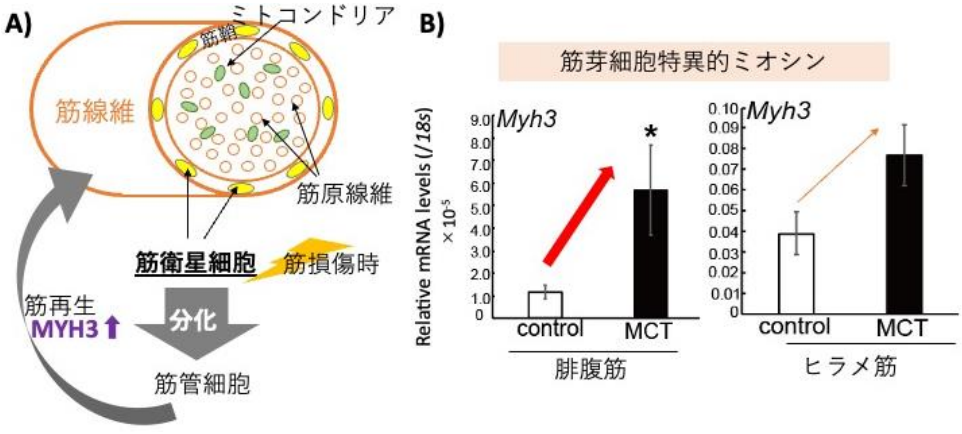


図 5. *Brd4* ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与が筋再生遺伝子の発現に及ぼす影響

A) 筋合成・分解概念図。

B) mRNA 発現。

考　察

本研究において、*Brd4* ヘテロ欠損マウスは、体重、骨格筋重量減少、握力低下、老人性円背を示すサルコペニアモデルであることが確認された。このマウスにおいて、中鎖脂肪投与が骨格筋の代謝やサルコペニアの発症に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、中鎖脂肪群において、ミトコンドリア膜での ATP 合成酵素 *Atp5l*、TCA 回路を促進する *Pcx* などの代謝に関与する遺伝子群の発現増大が見られたことから、中鎖脂肪の投与によって、*Brd4* ヘテロ欠損マウスではクエン酸回路や電子伝達系などのエネルギー産生回路が活性化することが示唆された。また、NAD^+から NADH への反応を阻害することによりペントースリン酸経路阻害に関与すると考えられる *Cndp2* の発現が中鎖脂肪の投与によって増大した。ペントースリン酸回路は、解糖系の活性低下や解糖系では処理できない量のグルコースが流入したときに活性化される。さらにペントースリン酸経路で産生される NADPH は、脂肪合成の基質である。それゆえ、ペントースリン酸経路の阻害に関与する遺伝子の発現増大は、解糖系を円滑に回転させる効果を有するとともに、脂肪合成を抑制するものであると考えられる。

次に、筋分解抑制や再生に関与する遺伝子の発現が中鎖脂肪投与によって増大するかを調べた。これまでの多くの研究によって、加齢に伴い部分的に再生や変性した筋線維が認められるようになることから、高齢期における筋肉量の維持には、筋分解の抑制だけではなく、筋再生能力の維持が重要であると考えられている。筋線維は多核細胞であるが、1 つの核が支配できる細胞の体積は決まっているため、筋萎縮が生じた際には、筋サテライト細胞との融合により核数を増やして筋線維を回復させる必要がある。本研究では、筋サテライト細胞との融合による筋再生時に発現する *Myh3* が、腓腹筋において顕著な mRNA 増大、ヒラメ筋において増大傾向が確認された。一方、ヒラメ筋では、筋構成タンパク質をユビキチン化して分解することにより筋萎縮を誘導する *Atrogin1* および *Murf1* の発現低下が観察された。また、ヒラメ筋では、中鎖脂肪食群でタンパク合成関連遺伝子（*Rpl32*、*Rps21* など）の発現増大が見られた。それゆえ、中鎖脂肪は、腓腹筋における筋サテライト細胞との融合による筋再生系を活性化し、ヒラメ筋における筋分解抑制と筋タンパク質合成を促進することによって、筋萎縮を抑制する可能性が示唆された。

以上のことから、高齢期 *Brd4* ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の長期的摂取は、骨格筋におけるエネルギー代謝の活性化、筋衛星細胞からの筋再生、筋分解酵素の発現低下を介し、骨格筋における筋萎縮を予防する可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究は、山梨大学生命環境学部地域食物科学科食品栄養学部門の研究室の所属学生の協力のもとに行われたものです。ここに感謝します。

文　献

1） Guo AY, Leung KS, Siu PM, Qin JH, Chow SK, Qin L, et al. Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8). Exp Anim. 2015;64(4):425-33. Epub 2015/07/22. doi: 10.1538/expanim.15-0025. PubMed PMID: 26193895; PubMed Central PMCID: PMC4637380.

2） Sakurai N, Inamochi Y, Inoue T, Hariya N, Kawamura M, Yamada M, et al. BRD4 regulates adiponectin gene induction by recruiting the P-TEFb complex to the transcribed region of the gene. Sci Rep. 2017;7(1):11962. Epub 2017/09/22. doi: 10.1038/s41598-017-12342-2 10.1038/s41598-017-12342-2 [pii]. PubMed PMID: 28931940; PubMed Central PMCID: PMC5607256.