

# ファイトケミカルによるサルコペニア予防と予防メカニズムの検討

慶應義塾大学薬学部 榎木 裕紀

105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30 03-5400-2656

## 要旨

### 1、 調査研究目的

サルコペニアは加齢に伴う筋肉の萎縮によって筋量・筋力が低下する病態を指し、1989年に Rosenberg によって提唱された概念である。近年は加齢のみならず筋萎縮病態全般を指す言葉として普及し始めている。また最近になり ICD-10 の疾病分類に加えられ疾病としての認知が高まってきた。その反面、運動療法や食事療法といった従来の治療が存在するのみで、様々な疾患に関連したサルコペニアについては有効かつ確立された治療法に乏しい。近年、サルコペニアの分子機序が明らかにされるにつれてこれらを治療標的とした創薬が盛んにおこなわれているが、未だ上市された薬物はなく、治療戦略の構築は超高齢社会においては喫緊の課題である。

ファイトケミカル (phytochemical) は植物などに含まれる化合物の総称であり、様々な生理活性を有し、健康機能の維持・増進のため、また医薬品の創薬シーズとして多くの種類が知られている。サルコペニアの分子機序が明らかになることでこれら既存のファイトケミカルがサルコペニア治療薬として有効である可能性が考えられる。そのためにはサルコペニアの分子機序に基づいた動物モデルや培養細胞モデルによるスクリーニングが必要となる。そこで本研究では、サルコペニア治療に有用なファイトケミカルシーズの探索を目的として、サルコペニア治療薬の評価を可能なモデルの作製とファイトケミカルのスクリーニングを行った。

### 2、 調査研究方法

#### 2-1 試薬

Asiatic acid, betulinic acid, kireinol, oleanolic acid hydrate, tanshinone IIA, ursolic acid は東京化成工業株式会社より購入した。ジメチルホルムアミド (DMF) は富士フィルム和光株式会社より購入した。

#### 2-2 培養細胞実験

C2C12 myoblast cell は 10% fetal bovine serum (GIBCO)、100 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai tesque) 含有 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, SIGMA aldrich) にて培養した。C2C12 myoblast cell の myotube cell へ

の分化には 2% horse serum、100 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシン含有 DMEM (分化培地) を使用した。

### 2-3 ファイトケミカルの各種遺伝子発現に及ぼす影響の検討

96 ウェルプレートに、 $1.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養し細胞を接着させた。その後培地を分化培地に交換し、4 日間分化させた。培地は 2 日間隔で交換した。4 日間分化培養後、分化培地にファイトケミカルを添加した。添加から 2 時間後、細胞から RNA を回収し、cDNA の合成をおこなった。ファイトケミカルの C2C12 myoblast cell の分化関連遺伝子発現に及ぼす影響は、分化開始と同時にファイトケミカルを添加した。コントロール実験には DMF (0.05%) を添加した。分化開始 2 日後、細胞から RNA を回収し、cDNA の合成を行った。RNA の回収および cDNA の合成には SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡) を使用し、添付のプロトコルに従った。

### 2-4 ファイトケミカルの C2C12 myotube 形態に及ぼす影響の検討

12 ウェルプレートに、 $2.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、48 時間培養後、分化開始と同時に各種ファイトケミカルを添加した。コントロール実験には DMF (0.05%) を添加した。分化開始 4 日後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し (室温 15 分)、免疫染色を行った。

### 2-5 免疫染色

細胞固定液をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、0.2% triton-X100 in PBS で透過処理を行った。細胞表面を PBS で洗浄後、4%ブロックエースで 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を洗浄後、myosin heavy chain antibody (R&D systems, 100 倍希釈) で 1 時間抗体反応を行った。1 次抗体洗浄後、Alexa anti-mouse IgG antibody (Thermo Fisher Scientific, 200 倍希釈) にて 1 時間抗体反応を行った。2 次抗体を洗浄後、蛍光顕微鏡 (Keyence, BZ-9000) 観察を行った。

### 2-6 実験動物

7 週齢雄性 C57BL/6JJmslc は三協ラボサービス株式会社より購入した。22±1°C、12 時間間隔の明暗サイクル、自由飲水、摂食下で飼育した。本研究は慶應義塾動物実験委員会 (18071(0)-1、19031(0)) の承認を得て行った。

### 2-7 廃用性筋萎縮モデルの作製

#### 2-7-1 ギプス固定モデルの作製

ギプス固定モデルはマウスの右足をギプス固定することにより作製した。マウスを

イソフルラン（富士フィルム和光株式会社、2.5%、0.8 mL/min）で麻酔後、仰臥位にし、右足をキャストライト $\alpha$ （アルケア株式会社）を用いて固定した。その後マウスを自由飲水、摂食下、1週間飼育することでモデルとした。

#### 2-7-2 坐骨神経切断モデルの作製

坐骨神経切断モデルはマウスの左側の坐骨神経切断により作製した。マウスをイソフルラン（2.5%、0.8 mL/min）で麻酔後、伏臥位に固定した。マウス大腿部の毛をバリカンで剃り、ポピドンヨードで消毒した。眼科ハサミを用いて表皮を切開し、さらに大腿部の筋肉を切開し、坐骨神経を露出させた。坐骨神経をピンセットで30秒圧迫後、切断し、縫合して閉じた。その後マウスを自由飲水、摂食下、1週間飼育することでモデルとした。

#### 2-8 廃用性筋萎縮モデルに対するファイトケミカルの有効性の検討

ギプス固定処置当日からマウスに対して、betulinic acid (100 mg/kg, i.p.) を1日1回投与した。コントロール群には vehicle として corn oil を同量投与した。ギプス処理1週間後にマウスを安楽死後、前脛骨筋および腓腹筋を回収した。

#### 2-9 Total RNA の回収

腓腹筋を眼科ハサミで細断後、RNAiso PLUS 500  $\mu$ L を加え、氷冷しながらポリトロンホモジナイザーで激しくすりつぶした。抽出手順は添付のプロトコルに従った。Total RNA の収量は 230 nm の吸光度より算出し、OD260/280 ratio が 1.8 以上であり、純度の高い RNA が得られていることを確認した。なお器具及び試薬類はすべてオートクレーブ処理を行ったものを使用した。

#### 2-10 cDNA の合成および real time RT-PCR

Total RNA は ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix（東洋紡）を用いて 37°C/15分、50°C/5分、98°C/5分、4°Cの条件で逆転写反応することで cDNA を合成した。PCR 反応は cDNA 0.5  $\mu$ g、KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix 及びプライマーを混合し、98°C/2分を1サイクル、98°C/10秒、60°C/10秒、68°C/30秒を40サイクルの条件下で iCycler thermal cycler (Bio-Rad 社) により行った。また相対的 mRNA 発現量は Cq 値を GAPDH の Cq 値を用いて  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  により算出した。

#### 2-11 統計解析

実験データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差検定は2群間では Student の t-検定を用いて行った。危険値が 0.05 以下であるとき統計学的に有意であると評価した。3群間以上のデータについては分散分析 (ANOVA) を用い Turkey 法により

多重比較検定を行った。危険値が 0.05 以下であるとき統計学的に有意であると評価した。

### 3、調査研究成果および考察

#### 3-1 筋萎縮または筋肥大関連遺伝子発現に及ぼすファイトケミカルの影響

ファイトケミカルが C2C12 myotube における各種遺伝子発現に及ぼす影響について解析した結果を図 1 に示す。今回ファイトケミカルにはトリテルペノイド類である、asiatic acid, betulinic acid, kireinol, oleanolic acid hydrate, tanshinone IIA, ursolic acid の 6 つを使用した。骨格筋特異的に発現し、骨格筋の分解に関与することが報告されているユビキチン E3 リガーゼの一つである atrogin-1 の発現は betulinic acid および ursolic acid において抑制されていた。また骨格筋肥大の強力なネガティブ制御因子として知られるマイオカインの一つである myostatin の発現においても betulinic acid および ursolic acid において抑制されていた。また筋肥大と関連することが報告されているマイオカインとして知られる apelin および irisin の発現に対して、tanshinone IIA は上昇傾向を示し、一方 ursolic acid は抑制することが確認された。また PI3K-Akt 経路を介して筋肥大に関連する因子として知られる insulin-like growth factor (IGF) -1 の発現は asiatic acid、betulinic acid および ursolic acid で抑制されていた。また骨格筋の分化に関連する myoD および myogenin の発現に対して tanshinone IIA および ursolic acid は強い抑制作用を示した。以上の結果から、ursolic acid は筋萎縮に対する抑制作用を有するものの、筋肥大に関する遺伝子発現についても抑制作用を有することが明らかになった。また betulinic acid は筋萎縮関連遺伝子の発現に対しては抑制的な作用を有するものの、筋肥大関連遺伝子への影響は、ursolic acid と比較して弱いことが示された。Rizhen らは ursolic acid は C2C12 細胞の protein synthesis を亢進するが、濃度の最適値 (5  $\mu$ M) が存在することを示している[1]。また myostatin の発現抑制作用を有するが、atrogin-1 については発現を上昇させたと報告している。また今回検討に用いたファイトケミカルのうち、betulinic acid、ursolic acid、oleanolic acid は TGR5 のアゴニストである。Sasaki らは、TGR5 受容体アゴニストは myostatin 発現抑制作用を有し、さらに myogenin 発現上昇作用により骨格筋機能を改善する新たな創薬標的になるうることを報告している[2]。しかし Sasaki らのこれら TGR5 を介した骨格筋培養細胞での作用は TGR5 過剰発現細胞であることや骨格筋培養細胞株がマウス由来ではなく、ヒト由来であり、今回用いた細胞実験条件と異なる。以上 *in vitro* の検討を総括すると今回検討したファイトケミカル中でも betulinic acid は筋萎縮関連遺伝子を抑制するが、筋肥大や分化への影響が少ないことから筋萎縮に対する抑制薬としての効果を有する可能性が示唆された。

### 3-2 ファイトケミカルの C2C12 myotube 形態に及ぼす影響の検討

各種ファイトケミカルの添加後、4日間分化培養した際の C2C12 myotube の形態を図 2 に示す。コントロールと比較して betulinic acid および oleanolic acid は同等の myotube 形態が観察されたが、その他のファイトケミカルについては分化が抑制される傾向が観察された。また tanshinone IIA および ursolic acid は myotube length および myotube width がコントロールと比較して顕著に短い形態を示していた。これら tanshinone IIA および ursolic acid は先ほどの分化関連遺伝子である myoD および myogenin のどちらの発現もほかのファイトケミカルと比較してより強く抑制していた。従って、この両ファイトケミカルによる顕著な分化抑制作用は分化期に誘導されるこれら分化関連遺伝子発現の抑制が強く関与している可能性が示唆された。また ursolic acid は培養細胞実験で毒性を示すことも報告されており先ほども述べたように指摘濃度が存在する[1,3]。一方で、動物実験では筋肥大作用を有する[4]ことから培養細胞でのスクリーニングでは明らかにできない抗サルコペニア作用の関与も示唆される。事実、ursolic acid は多彩な作用を有することが知られている[5,6]。今回の形態学的な評価では betulinic acid および oleanolic acid は分化への抑制的な影響はほとんどないことが示されたが、さらに定量的な評価方法 (western blotting、myotube length や width の定量など) により検討する必要がある。

### 3-3 廃用性筋萎縮モデルの検討

坐骨神経切断 (DN) またはギプス固定 (cast) による廃用性筋萎縮処置 1 週間後の骨格筋重量及び各種遺伝子発現に及ぼす影響について解析した結果を図 3, 4 に示す。いずれのモデルにおいてもモデル処置 1 週間において有意な骨格筋重量の減少が認められた。またその減少率は DN > cast であった (図 3)。この骨格筋重量の減少率を反映するように、筋萎縮関連遺伝子である atrogen-1 の発現上昇は DN モデルのほうが cast モデルよりも高かった (DN model  $14.7 \pm 5.1$  倍、cast model  $9.1 \pm 3.0$  倍 v.s sham or ctrl) (図 4A)。さらに骨格筋分化関連遺伝子である myoD および myogenin についても cast モデルよりも DN モデルのほうが高い上昇を示した (図 4F、4G)。筋肥大と関連する apelin 発現は cast モデルでやや上昇したものの、DN モデルでは変動は見られなかった。以上より、DN モデルでは坐骨神経切断による、神経と骨格筋間での電気シグナルの完全なる消失により、cast モデルと比較してシビアな廃用性筋萎縮病態モデルであることが示された。またこれら廃用性筋萎縮モデルでは骨格筋の分解系 (atrogen-1) の亢進による筋萎縮が誘導されており、代償的に分化関連遺伝子 (myoD、myogenin) 発現が上昇するがその筋肥大抑制に対する寄与は不明である。また神経 - 骨格筋シグナルが残存している cast モデルでは、myostatin や apelin といった筋収縮や運動依存的にレスポンスするマイオカインと呼ばれる分子が変動することからこれらを標的とした治療戦略も有効である可能性

が考えられる。実臨床への応用を考慮すると、入院や骨折などによる不動性の廃用性筋萎縮としての cast モデルが有用であることが考えられ、今後の検討に使用することとした。

3-4 ギプス固定誘発廃用性筋萎縮モデルに対する betulinic acid の有効性の評価  
ギプス固定誘発廃用性筋萎縮モデルに対して betulinic acid を7日間投与した結果を図5に示す。今回の結果では、betulinic acid は骨格筋重量の有意な減少抑制作用および atrogen-1 や myostatin などの抑制作用も見られなかった。骨格筋重量については腓腹筋 (GA) ではやや減少抑制傾向を示したが、前脛骨筋 (TA) ではほとんど見られなかった (図5A)。過去に Kunkel らは ursolic acid が DN モデルによる廃用性筋萎縮に対して有効であることを示している[4]。しかし、彼らは ursolic acid を 200 mg/kg で1日2回の投与を実施しており、今回の我々の検討投与量 100 mg/kg、1日1回と比較すると4倍多い。また Kunkel らの報告においても ursolic acid の筋萎縮抑制作用は、骨格筋重量を約4%程度抑制したにしか過ぎず、その作用は GA で強く見られ、TA では少なかった[4]。これらは今回の結果と類似している。今回我々は DN モデルよりも cast モデルのほうがシビア度が低いことを明らかにし、*in vitro* の検討結果から betulinic acid は ursolic acid よりも高い有効性を示す可能性が示唆されていたため、今回の投与量による検討を実施したが今後はさらに条件を振り、さらに n 数を増やして検討する必要がある。

#### 4、まとめ

今回、培養細胞を用いたスクリーニングは、抗サルコペニア作用を有することが報告されている ursolic acid ならびに TGR5 アゴニストを中心として活性評価を行うことで、これら発現プロファイリングをもとに *in vivo* で有効な化合物スクリーニングのための重要な基盤となった。また *in vivo* では DN モデルと cast モデルの比較検討によりモデルシビア度や筋萎縮プロファイルの違いについて明らかにすることで、これらを標的としたサルコペニア治療薬創薬のための重要な情報となる。今後、本研究で得られた情報をもとにさらに多くのファイトケミカルのスクリーニングと治療薬開発のための情報構築を実施する予定である。

#### 5、調査研究発表 (口頭又は誌上発表)

該当なし

#### 6、引用文献

- [1] Yu R, Chen JA, Xu J, Cao J, Wang Y, Thomas SS, et al. Suppression of muscle wasting by the plant-derived compound ursolic acid in a model of

chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017;8:327–41.  
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12162>.

- [2] Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, Murata S, Shimizu M, Inoue J, et al. The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. *J Biol Chem* 2018;293:10322–32.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002733>.
- [3] Figueiredo VC, Nader GA. Ursolic acid directly promotes protein accretion in myotubes but does not affect myoblast proliferation 2012:432–7.
- [4] Kunkel SD, Suneja M, Ebert SM, Bongers KS, Fox DK, Malmberg SE, et al. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metab* 2011;13:627–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.020>.
- [5] Jie L. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995;49:57–68. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01310-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01310-5).
- [6] Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J Ethnopharmacol* 2005;100:92–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.024>.

表、図及び写真

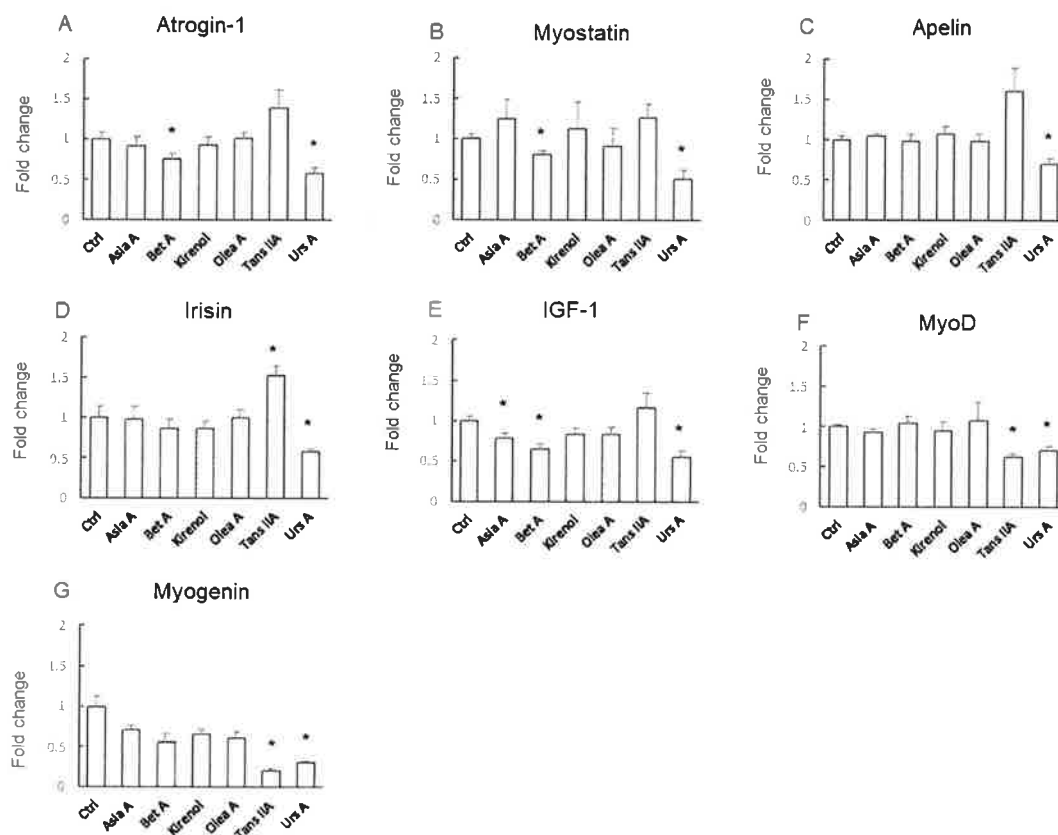


図1 筋萎縮または筋肥大関連遺伝子発現に及ぼす各種ファイトケミカルの影響の検討 (A-E) C2C12 myoblast cell を4日間分化培養後、各種ファイトケミカル (5  $\mu$ M) を添加し、2時間後の遺伝子発現を real time RT-PCR により評価した。Control には vehicle (0.05% DMF) を添加した。(F, G) C2C12 myoblast cell を播種し、分化と同時に各種ファイトケミカル (5  $\mu$ M) を添加し、2日後の遺伝子発現を real time RT-PCR により評価した。Asia A, Asiatic acid; Bet A, betulinic acid; Olea A, oleanolic acid; Tans IIA, tanshinone IIA; Urs A, ursolic acid. Data are expressed mean $\pm$ S.E (n=5). \* $p$  < 0.05 v.s. ctrl.

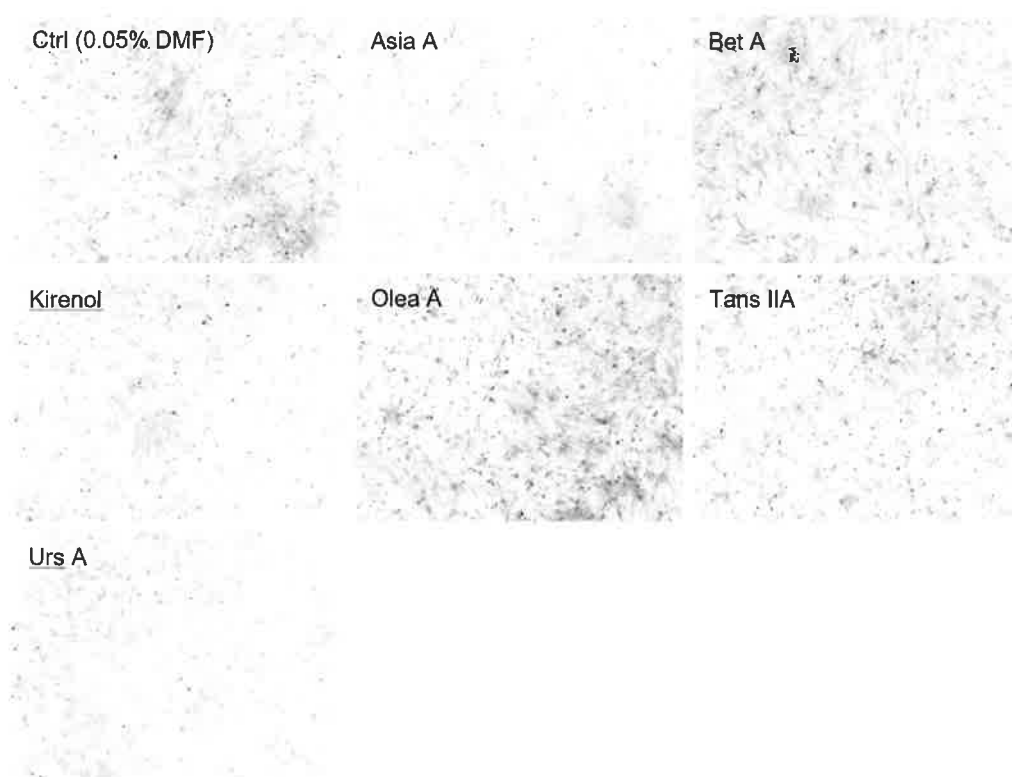


図2 ファイトケミカルの C2C12 myotube 形態に及ぼす各種ファイトケミカルの影響の検討

C2C12 myoblast cell の分化開始と同時に各種ファイトケミカル (5  $\mu$ M) を添加し、4日間分化培養後、myosin heavy chain antibody を用いて蛍光免疫染色法により評価した。Control には vehicle (0.05% DMF) を添加した。Asia A, Asiatic acid; Bet A, betulinic acid; Olea A, oleanolic acid; Tans IIA, tanshinone IIA; Urs A, ursolic acid.



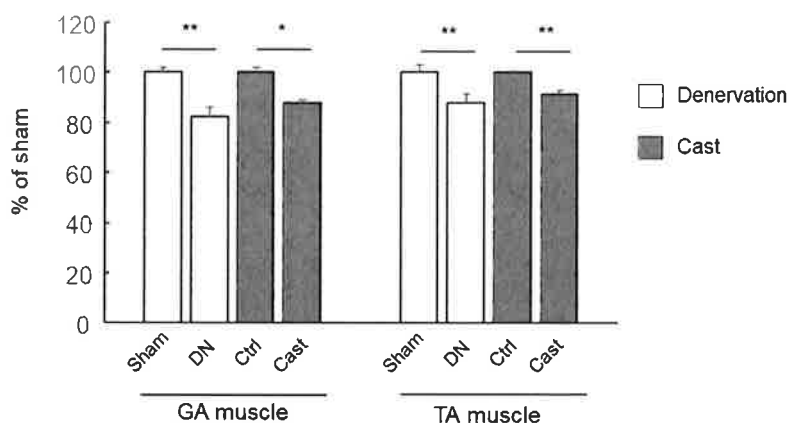


図3 坐骨神経切断またはギプス固定モデルにおける骨格筋萎縮の評価

左坐骨神経切断 (DN) また右足ギプス固定 (cast) 処置 1 週間後に腓腹筋 (GA) および前脛骨筋 (TA) を回収し骨格筋重量を評価した。DN モデルの sham は表皮および大腿部の切開のみ施した。ギプス固定モデルは無処置マウスを control に用いた。Data are expressed mean  $\pm$  S.E (n=3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 v.s. sham or ctrl.

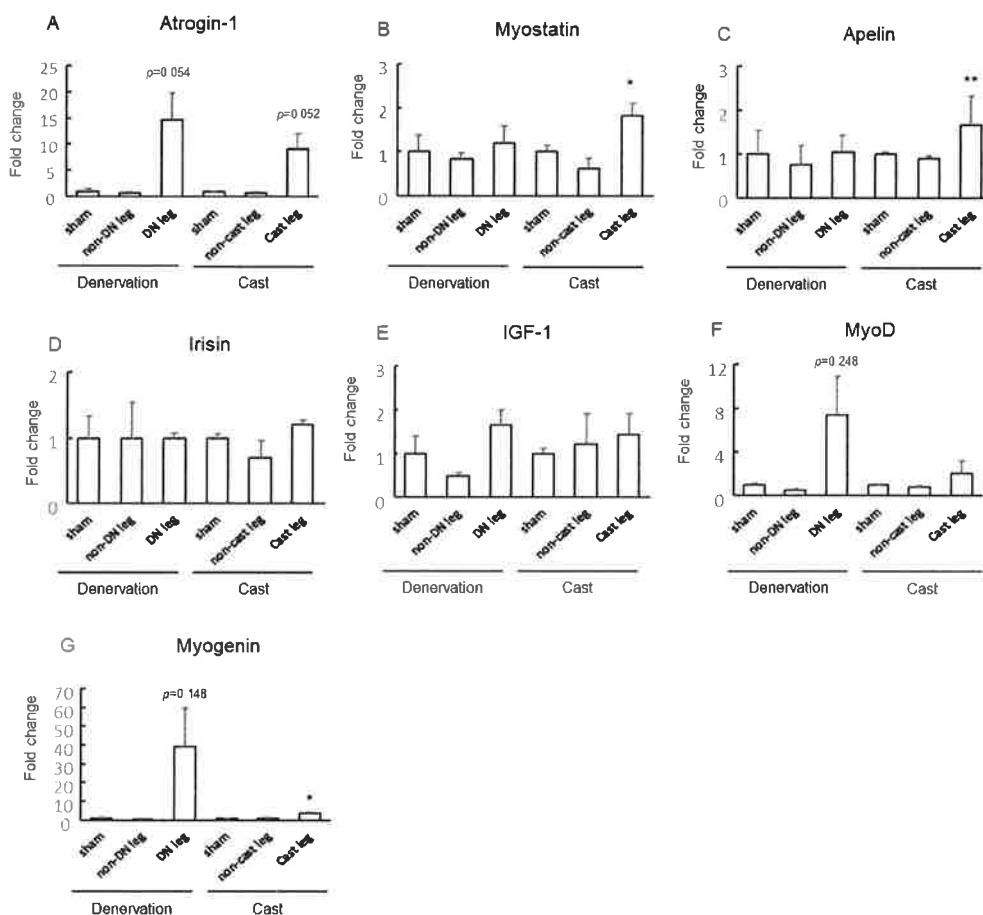


図4 坐骨神経切断またはギプス固定モデルにおける骨格筋遺伝子発現変動の評価  
 左坐骨神経切断 (DN) また右足ギプス固定 (cast) 処置 1 週間後における GA muscle の各種遺伝子発現変動を real time RT-PCR により解析した。Data are expressed mean  $\pm$  S.E (n=3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 v.s. sham.

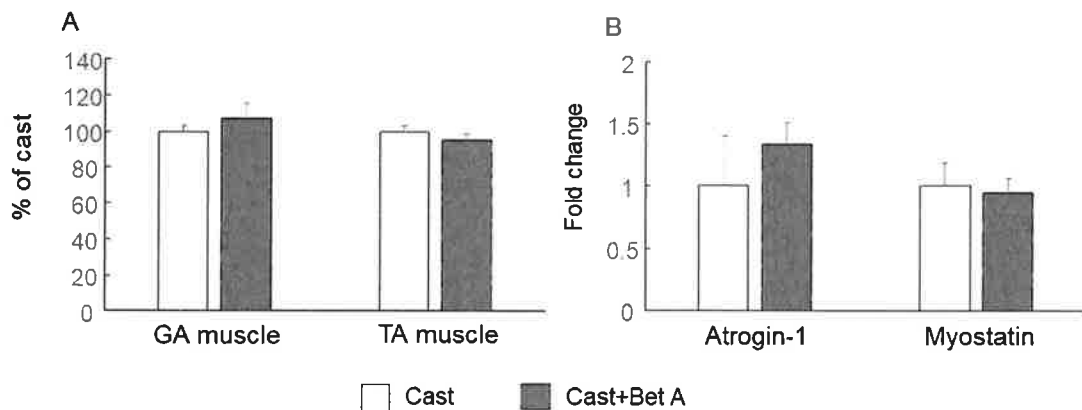


図5 ギプス固定誘発筋萎縮に対する betulinic acid の影響

右足ギプス固定処置初日から betulinic acid (Bet A, 100 mg/kg, i.p.) を 1 日 1 回投与した。Vehicle 投与群には corn oil を同量投与した。ギプス固定 1 週間後にサンプルを回収し解析した。(A) 骨格筋重量および (B) 筋萎縮関連遺伝子発現への影響。Data are expressed mean  $\pm$  S.E. (n=3).