

Title	糖尿病における白筋アミノ酸代謝とエピゲノムに着目したサルコペニア治療の開発
Sub Title	Development of the strategy to improve sarcopenia in streptozotocin-treated mice by modulation of amino acids in the white muscle.
Author	宮下, 和季(Miyashita, Kazutoshi) 久保, 亜紀子(Kubo, Akiko) 木内, 謙一郎(Kinouchi, Kenichiro)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	サルコペニアが肥満同様、心血管病の発症を予測し関連することから、医療・介護の幅広い分野で、サルコペニア予防の有用性と重要性が注目されている。 インスリン不足からサルコペニアが生じる機序の、代謝学的観点からの機序解明はこれまで不十分なので、1型糖尿病モデルマウスの骨格筋を質量分析イメージングで解析した。また、間欠絶食を施行したマウスの骨格筋において、脂肪酸化遺伝子群のエピゲノムを解析した。 その結果、1型糖尿病に伴うサルコペニアに骨格筋でのBCAA蓄積が、間欠絶食に伴う持久力の改善に、骨格筋ミトコンドリア関連遺伝子のヒストンアセチル化亢進が関与する可能性が見出された。 Sarcopenia predicts and is associated with the onset of cardiovascular disease, the importance of sarcopenia prevention is attracting attention in a wide range of medical and nursing care fields. Since the mechanism has not been fully elucidated at least from a metabolic perspective, the present study analyzed the skeletal muscle of type 1 diabetes model mice with streptozotocine using imaging mass spectrometry. In addition, in the skeletal muscle of mice subjected to intermittent fasting, we analyzed the epigenome of the fatty acid oxidation gene cluster. As a result, we found that BCAA accumulation in the skeletal muscle may be involved in sarcopenia that is associated with type 1 diabetes. Histone acetylation in skeletal muscle mitochondria-related genes may be involved in improving endurance associated with intermittent fasting
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2021～2023 課題番号：21K08583 研究分野：Endocrinology
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K08583seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 6 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：2 1 K 0 8 5 8 3

研究課題名（和文）糖尿病における白筋アミノ酸代謝とエピゲノムに着目したサルコペニア治療の開発

研究課題名（英文）Development of the strategy to improve sarcopenia in streptozotocin-treated mice by modulation of amino acids in the white muscle.

研究代表者

宮下 和季（Miyashita, Kazutoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：5 0 3 7 8 7 5 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：サルコペニアが肥満同様，心血管病の発症を予測し関連することから，医療・介護の幅広い分野で，サルコペニア予防の有用性と重要性が注目されている．インスリン不足からサルコペニアが生じる機序の，代謝学的観点からの機序解明はこれまで不十分なので，1型糖尿病モデルマウスの骨格筋を質量分析イメージングで解析した．また，間欠絶食を施行したマウスの骨格筋において，脂肪酸化遺伝子群のエピゲノムを解析した．その結果，1型糖尿病に伴うサルコペニアに骨格筋でのBCAA蓄積が，間欠絶食に伴う持久力の改善に，骨格筋ミトコンドリア関連遺伝子のヒストンアセチル化亢進が関与する可能性が見出された．

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病に伴うサルコペニアの改善に，骨格筋BCAA代謝変容の修正が有用である可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia predicts and is associated with the onset of cardiovascular disease, the importance of sarcopenia prevention is attracting attention in a wide range of medical and nursing care fields. Since the mechanism has not been fully elucidated at least from a metabolic perspective, the present study analyzed the skeletal muscle of type 1 diabetes model mice with streptozotocine using imaging mass spectrometry. In addition, in the skeletal muscle of mice subjected to intermittent fasting, we analyzed the epigenome of the fatty acid oxidation gene cluster. As a result, we found that BCAA accumulation in the skeletal muscle may be involved in sarcopenia that is associated with type 1 diabetes. Histone acetylation in skeletal muscle mitochondria-related genes may be involved in improving endurance associated with intermittent fasting.

研究分野：Endocrinology

キーワード：サルコペニア BCAA ミトコンドリア エピゲノム ヒストンアセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアが肥満と同様、心血管病の発症を予測し関連することから、医療・介護の幅広い分野で、サルコペニア予防の有用性と重要性が注目されている。1 型糖尿病の原因となるインスリン不足は、筋肉の蛋白同化障害を惹起し、サルコペニアの代表的な原因となる。しかしながら、インスリン不足からサルコペニアが生じる機序の、代謝学的観点からの機序解明と、原因に則した治療法の開発は、これまで不十分である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではストレプトゾトシン(STZ)投与 1 型糖尿病モデルマウスにおける、骨格筋の代謝変容を明らかにし、その補正によるサルコペニア治療法の開発を目指す。
(2) サルコペニアが固着/改善する過程でエピゲノムが関与する。サルコペニアとの関連が知られている間欠絶食のマウスモデルにて、サルコペニア関連遺伝子の発現と、遺伝子発現の制御に関与するエピゲノムを評価する。

3. 研究の方法

(1) 強いサルコペニアをきたす、ストレプトゾトシン(STZ)投与によるインスリン欠損 1 型糖尿病モデルマウス(STZ マウス)の骨格筋において、代謝産物を可視化する質量分析イメージング(Imaging MS)を実施し、白筋、赤筋のサルコペニア進展と関連したアミノ酸の変容を検討した。
(2) マウスに 4 週間の間欠絶食(Intermittent Fasting: IF)を施行後、4 週間自由摂食で観察して IF の効果を調べた。24 時間の絶食とその後 24 時間の自由摂食を繰り返すことによる、従来からの隔日絶食(24hIF)よりも高い絶食効果を引き起こす目的で、1 週間を 1 サイクルとし、最初の 72 時間は絶食、残りの 96 時間は自由摂食とする、72 時間絶食(72hIF)を 4 サイクル行った。72hIF 終了後 4 週間自由摂食を続けたマウスの骨格筋において、ミトコンドリア関連遺伝子とその発現を制御するエピゲノムについて検討した。

4. 研究成果

(1) 血糖値 400~600mg/dl の高血糖をきたした STZ マウスの筋肉では、白筋、赤筋ともに分枝鎖アミノ酸(BCAA)であるバリン、ロイシン、イソロイシンの増加が顕著であった。BCAA を筋肉に取り込むことのできる L 型アミノ酸トランスポーター(LAT)について、赤筋と白筋における発現量を調べたところ、糖尿病マウスでは LAT の発現が LAT1,2,3 すべてにおいて減少していた。このことより、糖尿病マウスでは BCAA の取込低下にもかかわらず筋肉分解が亢進することで、骨格筋 BCAA が増加すると示唆された。

図 1a に示した 8 つの図は Imaging MS によって得られたものであり、左の 4 つが正常マウス、右の 4 つが糖尿病マウスのもので、上段は赤ければ赤いほど $^{15}\text{NLeu}$ (BCAA の一つであるロイシン)が多量に存在していることを表している。下段の Anserine は白筋に特異的に検出されるジペプチドで、Anserine が少ない部分は、赤筋であるヒラメ筋を示している。また、図 1b,c のグラフでは、アミノ酸定量によって得られた、赤筋および白筋に存在している BCAA の量を正常マウスと糖尿病マウスで比較した。

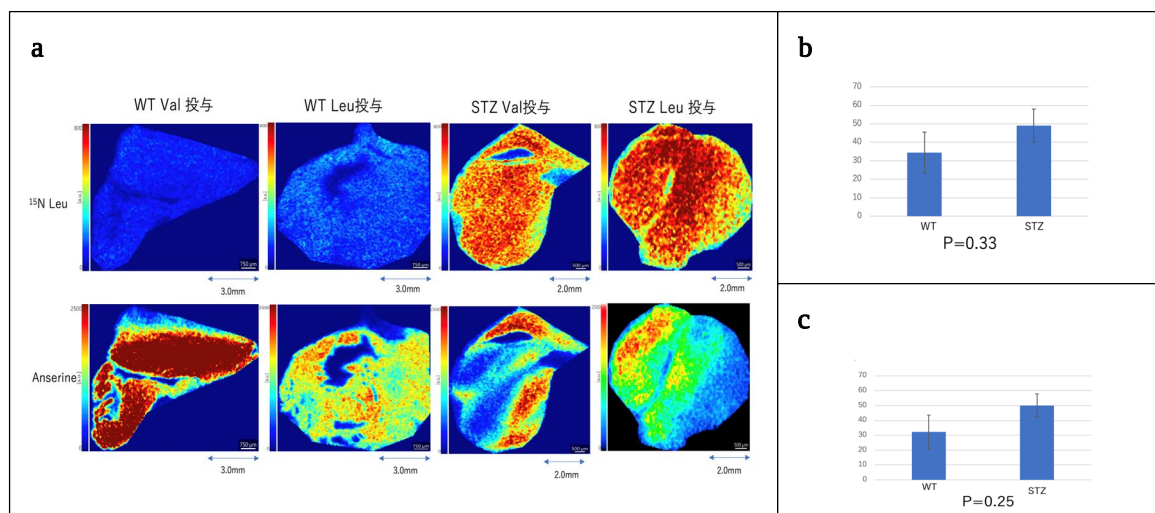


図 1 下腿三頭筋の Imaging MS と定量値

(a) 下腿三頭筋のイメージング (b) 赤筋に存在する BCAA (c) 白筋に存在する BCAA

(2) 72hIF により耐糖能の改善、脂肪利用の促進ならびに酸素消費の増加を認めた。更には持久力が改善し、電子顕微鏡にて骨格筋ミトコンドリアの増大を認めた。骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織では、脂質酸化を促進する遺伝子の発現亢進を認めた。72hIF 終了後の自由摂食期間において 72hIF 群で自由摂食群と比べて有意な体重増加の抑制を認めた。また、72hIF 終了後も、4 週間にわたり骨格筋の脂質酸化遺伝子の発現亢進を認め、耐糖能と持久力が向上した。これらより 72hIF に伴うミトコンドリア関連遺伝子の持続的な発現変化が、体重抑制ならびに耐糖能と持久力の改善に寄与する可能性が示唆された。同時に、長期間の IF (72hIF) は頻繁な IF (24hIF) よりも肥満、糖尿病、運動持久力に関連したより強い代謝効果をもたらすことを見出した。脂質酸化関連遺伝子の発現亢進と酸素消費の増加は、72hIF 中止後 4 週間にわたり持続していた。持久力の改善を伴うサルコペニアの改善において、同様の変化が起こる可能性が示唆された。骨格筋における脂質酸化関連遺伝子である脱共役タンパク質 3 型 (*Ucp3*) とカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1b (*Cpt1b*) において、遺伝子発現に関与するプロモーター領域のヒストンアセチル化を解析したところ、ヒストン H3 ならびに H4 のアセチル化が亢進していた。絶食後の骨格筋メタボローム解析にて、絶食による筋分解に起因するアミノ酸である、ロイシンによるヒストンアセチル化の促進が示唆された。低糖・低血清培地で培養した骨格筋細胞 C2C12 を用いた間欠絶食を模倣する検討では、ロイシンの投与により *Ucp3* ならびに *Cpt1b* 遺伝子のプロモーター領域ヒストンアセチル化が促進し、遺伝子発現が亢進することを見出した。これらの知見は、IF ならびに IF 後の筋肉や脂肪組織の脂質酸化遺伝子における持続的なヒストンアセチル化の亢進が、IF の持続的な代謝効果に寄与している可能性があるという、これまで認識されていなかった概念を明らかにしたものである。

図 2a に 72hIF のプロトコルを示す。72 時間絶食-96 時間自由摂食の 1 週間を 1 サイクルとし、4 サイクルの 72hIF を実施した。そのあとの 4 週間を観察期間として、観察期間の終わりに骨格筋等の組織回収と、遺伝子発現やエピゲノムの解析を行った。図 2b, c, d のグラフではそれぞれ単回 72 時間絶食、4 サイクルの IF 後、4 週間の観察期間後の、骨格筋 *Ucp3* ならびに *Cpt1b* 遺伝子プロモーター領域の、ヒストン H3, H4 のアセチル化 (H3Ac, H4Ac) を示す。

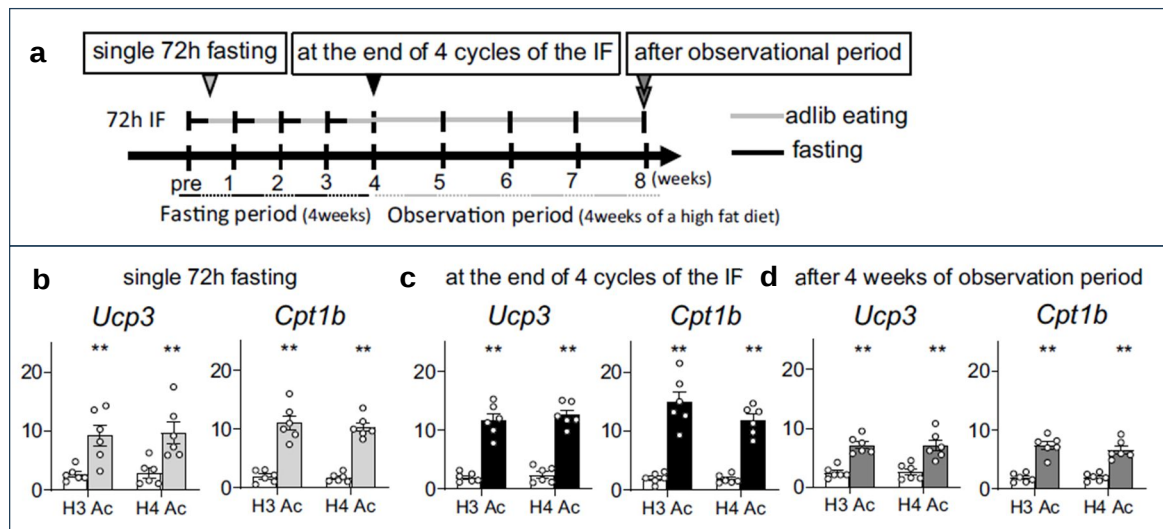


図 2 マウス間欠絶食(72hIF)のプロトコルと、
骨格筋における *UCP3*, *Cpt1b* プロモーター領域のヒストンアセチル化 (H3Ac, H4Ac)
(a) 72hIF のプロトコル (b) 単回 72 時間絶食後 (c) 4 サイクルの IF 後 (d) 4 週間の観察期間後

Endo S et al. Intermittent Fasting Sustainably Improves Glucose Tolerance in Normal Weight Male Mice Through Histone Hyperacetylation. J.Endocr Soc. 17;7(7):bvad082, 2023. doi: 10.1210/jendso/bvad082. より引用

これらの研究成果により、1 型糖尿病に伴うサルコペニアに骨格筋での BCAA 蓄積が、間欠絶食に伴う持久力の改善に、骨格筋ミトコンドリア関連遺伝子のヒストンアセチル化亢進が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagahisa T, Yamaguchi S, Kosugi S, Homma K, Miyashita K, Irie J, Yoshino J, Itoh H.	4. 巻 163
2. 論文標題 Intestinal Epithelial NAD+ Biosynthesis Regulates GLP-1 Production and Postprandial Glucose Metabolism in Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqac023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endocr/bqac065.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Adachi K, Uchiyama K, Muraoka K, Nakayama T, Yasuda M, Miyashita K, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Home-Based Exercise Program Ameliorates Renal Function Decline in Patients With CKD Stage 4.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep.	6. 最初と最後の頁 809-903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2022.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Endo S, Uto A, Miyashita K, Sato M, Inoue H, Fujii K, Hagiwara S, Ryuzaki M, Oshida T, Kinouchi K, Itoh H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intermittent Fasting Sustainably Improves Glucose Tolerance in Normal Weight Male Mice Through Histone Hyperacetylation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J.Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 bvad082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvad082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	久保 亜紀子 (Kubo Akiko) (50455573)	神戸大学・医学研究科・特命講師 (14501)	

6．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	木内 謙一郎 (Kinouchi Kenichiro) (50528578)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------