

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13047

研究課題名(和文) 骨格筋機能の低下が認知機能やうつ症状悪化の原因となるか

研究課題名(英文) Whether reduction of skeletal muscle function causes deterioration of cognitive function or depression symptoms

研究代表者

三浦 進司 (Miura, Shinji)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10342932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：キヌレニン( kynurenine )はストレス曝露により末梢で産生され、脳でうつ症状を引き起こす。運動は骨格筋でのKAT発現を高め、末梢でのキヌレニン分解を促進してストレス性のうつ症状を抑制すると報告された。そこで本研究では「不活動により骨格筋機能が衰えるとキヌレニン分解能が低下し、脳へのキヌレニン流入を亢進させ、うつ症状を悪化させる」という仮説を検証した。その結果、骨格筋のKAT発現量が低下しても、うつ症状への影響が少なく、筋萎縮モデルマウス(FOXO1Tgマウス)の骨格筋ではKATの発現量に変化は認められず、FOXO1Tgマウスにキヌレニンを投与しても、海馬のうつ関連遺伝子の発現量に悪影響は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Kynurenine is produced peripherally by stress exposure and causes depression symptoms in the brain. It was reported that exercise increases KAT expression in skeletal muscle, promotes degradation of kynurenine in the periphery and suppresses stress induced-depression. Therefore, in this study, we examined the hypothesis that "if the skeletal muscle function declines due to inactivity, the degradation of kynurenine is decreased, kynurenine influx into the brain is accelerated, and depressive symptoms worsen". As a result, even if the expression level of KAT of skeletal muscle was decreased, there was little effect on depressive symptoms. Any change in expression level of KAT was not observed in skeletal muscle of muscle atrophy model mouse (FOXO 1 Tg mouse). Injection of kynurenine into FOXO 1 Tg mouse caused no adverse effect on the expression level of hippocampal depression related genes.

研究分野：栄養化学

キーワード：加齢 老化 筋萎縮 認知機能 うつ ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋機能の衰えは不活動や筋萎縮、ひいては寝たきりの原因となる。寝たきり状態は認知症発症と進行にもつながると言われており、骨格筋機能を維持することは、超高齢化社会における重要な課題のひとつと言える。また、ストレスの多い現代社会において、うつ病も大きな問題となっているが、うつ状態の悪化は摂食障害（低栄養）や不活動を引き起こすため、骨格筋を萎縮させる原因となっている。さらに、ストレスはグルココルチコイドの分泌を亢進するため、筋萎縮を促進させることもわかっている。

一方、運動トレーニングが、骨格筋での転写調節因子 PGC-1 $\alpha$  の発現量を増加させ、生理活性物質“ Irisin ”（遺伝子名：FNDC5）の産生・分泌を促進することが報告されている（*Nature* 2012）。この Irisin は、脳内の神経成長因子産生を増加する働きがあることも報告されている（*Cell Metab* 2013）。さらに骨格筋での PGC-1 $\alpha$  の発現増加が、うつ原因物質“キヌレニン”を分解する酵素の発現を促進し、慢性的なストレスによるうつ病発症を抑制することが報告された（*Cell* 2014）。運動トレーニングが、認知機能やうつ症状を改善することは従来から言われてきたが、その理由は生理学的に説明されるものではなかった。しかし、これまで述べたいくつかの報告を考え合わせると、運動トレーニングによる PGC-1 $\alpha$  を介した骨格筋機能の改善が、認知機能やうつ症状の改善につながるのではないかと仮説が立つ。

申請者らは PGC-1 $\alpha$  が筋持久力を向上すること（申請者研究成果 *J Biol Chem* 2003, *Am J Pathol* 2006, *PLoS ONE* 2011 & 2012, *J Lipid Res* 2015）、不活動や絶食などにより骨格筋で発現量が増加する転写因子 FOXO1 が筋萎縮を引き起こすことをこれまでに明らかにした（申請者研究成果 *FEBS Lett* 2003, *J Biol Chem* 2004）。また、PGC-1 $\alpha$  が骨格筋において Irisin およびキヌレニン分解酵素の発現量を増加させるのに対し、FOXO1 は骨格筋におけるこれら発現量を低下させることを見出している。

以上のことから、不活動、ストレス、低栄養状態下で起こる、FOXO1 を介した骨格筋機能低下が、認知症発症やうつ症状悪化に何らかの形で関与しているという仮説に至っ

た。

## 2. 研究の目的

FOXO1 による骨格筋機能の低下が、認知症発症やうつ症状悪化に寄与するか否かを明らかにする。また、FOXO1 の発現量や活性を抑制する化合物を探索し、骨格筋の FOXO1 機能の調節がこれら疾病を予防できるのか否かを検証する。そのために、筋萎縮モデル動物の認知機能やストレス耐性の変化とその作用機序を明らかにする。さらに、FOXO1 の働きを調節する化合物をデータベース上の情報、および既存の化合物ライブラリーから探索し、その有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

すべての動物実験は、静岡県立大学動物実験委員会の承認（第 165124）を得て実施した。

### （1）除神経処置

C57BL/6J マウスをイソフルラン麻酔下で、左足の大腿四頭筋付近の皮膚を切開し、座骨神経を 5 mm 程度切除し縫合した（Denervation, Den 群）。同様に切開と縫合のみ行ったマウスを Sham 群とした。コントロール群のマウスは処置を行わなかった（Cont 群）。処置から 2 週間後にスクロース水嗜好性試験、3 週間後に骨格筋の摘出、4 週間後にキヌレニン投与と海馬の摘出を行った。

### （2）FOXO1Tg マウス

骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウス（FOXO1Tg マウス）の作製方法は既報（*J Biol Chem* 2004）の通りであり、human  $\alpha$ -skeletal actin promoter を用いて、FOXO1 を骨格筋に発現させた。実験には、この過剰発現マウスと C57BL/6J マウスを掛け合わせるにより得られた雄の仔を用いた。

### （3）キヌレニン投与

キヌレニン硫酸塩（Sigma-Aldrich）を、2 mg/kg 体重（pH 8.1-9.0）となるように調製し、マウス腹腔内に投与した。対照には生理食塩水を同量投与した。投与から 3 時間後に海馬の摘出を行った。

### （4）スクロース水嗜好性試験

マウスを 16 時間絶食・絶水させた後に、キヌレニン硫酸塩または生理食塩水を腹腔内投与し、その 2 時間後に 1%スクロース水を 1 時間自由摂水させた。

### （5）RNA 抽出・リアルタイム PCR

採取した腓腹筋または海馬より、RNAiso Plus (Takara) を用いて RNA を抽出した。PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara) を用いて gDNA 除去と逆転写反応を行い、cDNA を作製した。この cDNA サンプルに、プライマーと SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を加え、リアルタイム PCR 反応を行った。

#### (6) 血中キヌレニン濃度の測定

血漿 10 µL に氷冷メタノール 50 µL を添加し、-30°C で 30 分間静置した。遠心分離後、上清 50 µL を遠心エバポレーターで乾固させた。これを水:メタノール (50:50, v/v) で再溶解させた。これを、TSQ Quantum™ Access MAX に Accela HPLC (Thermo Fisher Scientific) を接続した LC/MS システムに供した。分析には、Discovery® HS F5-3 カラム (Sigma-Aldrich) を用い、移動相 A は 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B はメタノールとした。キヌレニンは、positive mode の selected reaction monitoring 法により測定した ( $m/z$  209.0 > 146.0)。

#### (7) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

レポーターには、Gal4-DBD タンパク質が結合する UAS (Upstream Activator Sequence) が 9 回繰り返される 9×UAS 配列の下流に、ホタル由来のルシフェラーゼ (FF-Luc) 遺伝子が結合したプラスミド (pGL4.35, Promega) を用いた。FOXO1 発現プラスミド (pM-FOXO1) は、京都府立大学亀井康富教授より分与して頂いた。内部標準には、PGK プロモーターの下流に深海エビ由来のルシフェラーゼ (Nano-Luc) が結合したプラスミド (pNL1.1.PGK, Promega) を用いた。

HEK293T 細胞を 96 well プレートに播種し、レポータープラスミド、FOXO1 発現プラスミド、内部標準プラスミドを、

Lipofectamine®3000 Transfection kit を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を 24 時間培養後、培地に溶解した被験化合物を添加し、さらに 24 時間培養後、Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System を用いて FF-Luc と Nano-Luc の発光量を測定した。FF-Luc/Nano-Luc を算出し、これを FOXO1 活性とした。

#### (8) 統計解析

統計処理ソフト JMP (JMP 5.1.2; SAS, Cary, NC, USA) を用い、一元もしくは多元配置分散

分析を行った。多元配置分散分析で有意差が認められた場合は、Student の t 検定によって、群間比較を行った。P<0.05 を有意差ありとし、データは Mean±SE で表示した。

## 4. 研究成果

### (1) 除神経処置による骨格筋 KAT 発現とうつ症状への影響

除神経処置をしたマウスの骨格筋において、キヌレニン分解酵素である KAT の発現量が変化するかを検討した。骨格筋で発現する 3 種類の KAT (KAT1, KAT3, KAT4) は、除神経処置により有意に発現低下した。KAT 群の遺伝子発現を促進させる転写共役因子である PGC-1 $\alpha$  も、除神経処置により発現低下した。FOXO1 の発現は、除神経処置による影響を受けなかった (図 1A)。

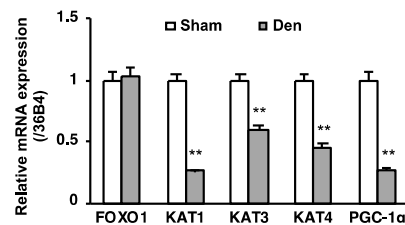


図1A 除神経処置による骨格筋キヌレニン分解遺伝子の発現とうつ症状への影響  
The expression of KATs in sham and denervated (Den) muscle (n = 5 - 6). Values are means  $\pm$  SE. \*\*, p < 0.01.

次に、除神経処置マウスにキヌレニンを腹腔内投与し、不活動がストレス性のうつ症状を悪化させるか否かを検証した。本研究では、スクロース水嗜好性試験を行い、マウスが好むスクロース水の飲水量からうつ症状を評価した。図 1B に示したとおり、キヌレニン

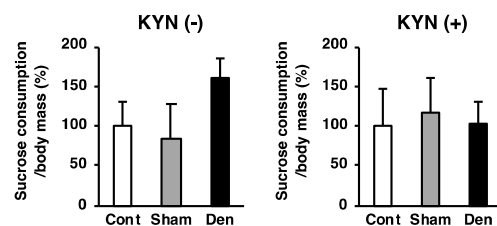


図1B 除神経処置による骨格筋キヌレニン分解遺伝子の発現とうつ症状への影響  
The amount of sucrose consumption in control (Cont), sham and denervated (Den) mice before (-) and after (+) kynurenine (KYN) administration (n = 4-5). Values are means  $\pm$  SE.

投与前、投与後ともに、群間でスクロース水の飲水量に差は認められなかった。慢性的な軽度ストレス曝露や末梢からのキヌレニン投与は、海馬において神経活性マーカー (ARC, GluA2, CamKII) の発現低下、炎症マーカー (MCP-1, TNA- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) の発現増加を誘

導することが報告されている (Cell 2014)。ところが本研究の結果では、キヌレニン投与による発現への影響は、いずれの遺伝子に関しても既報と一致しなかった。除神経処置も、これら遺伝子の発現を悪化方向に変動させなかった(図 1C)。

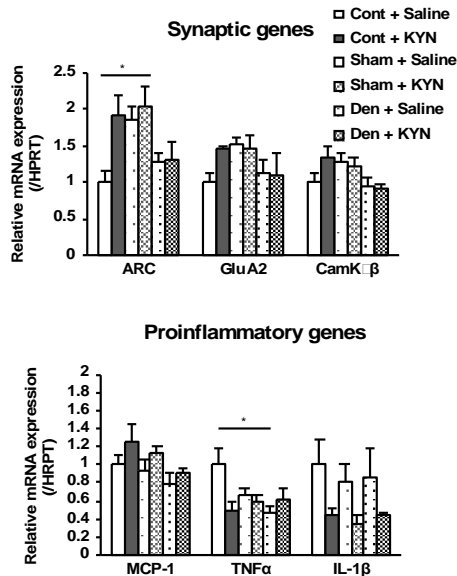


図1C 除神経処置による口格筋キヌレニン分解遺伝子の発現とうつ症状への影響  
The expression of synaptic and proinflammatory genes in hippocampus from control (Cont), sham and denervated (Den) mice with or without kynurenine (KYN) administration. Values are means  $\pm$  SE. \*,  $p < 0.05$ .

## (2) 骨格筋への FOXO1 過剰発現による骨格筋 KAT 発現とうつ症状への影響

FOXO1Tg マウスにおいて KAT の遺伝子発現量を測定した結果、3 種類の KAT すべてにおいて、WT と Tg の間に差は認められなかった (図 2A)。

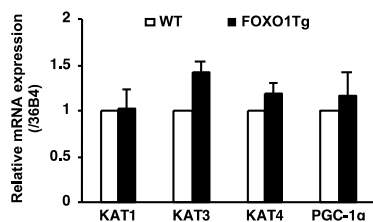


図2A 骨格筋へのFOXO1過剰発現によるキヌレニン分解遺伝子の発現とうつ症状への影響  
The expression of KATs in muscle from wild-type (WT) and FOXO1Tg mice. Values are means  $\pm$  SE (n = 2 - 3).

海馬のうつ関連遺伝子発現量はいずれも、WT と Tg の間に違いは認められなかった (図 2B)。

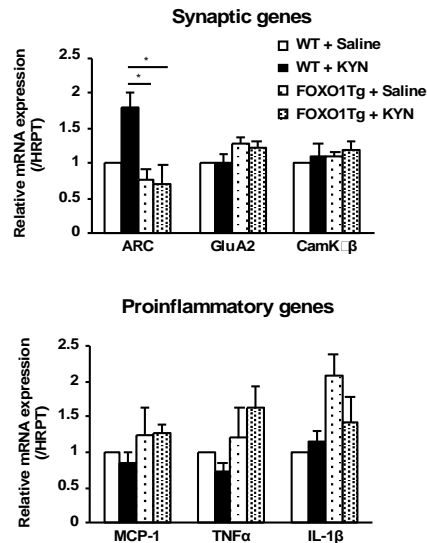


図2B 口格筋へのFOXO1過剰発現によるキヌレニン分解遺伝子の発現とうつ症状への影響  
The expression of synaptic and proinflammatory genes in hippocampus from wild-type (WT) and FOXO1Tg mice with or without kynurenine (KYN) administration. Values are means  $\pm$  SE (n = 2 - 3). \*,  $p < 0.05$ .

## (3) キヌレニン血中濃度の経時的推移

末梢へのキヌレニン投与が血中キヌレニン濃度に反映されているかを確認するため、キヌレニン投与後の血中キヌレニン濃度を経時的に測定した (図 3)。キヌレニンの血中濃度は、投与後 0.5 時間でピークに達した。その後、経時的に推移し 1.5 時間後には定常レベルまで低下した。この結果より、今回実施したキヌレニン投与は、血中キヌレニン濃度を上昇させることが示された。

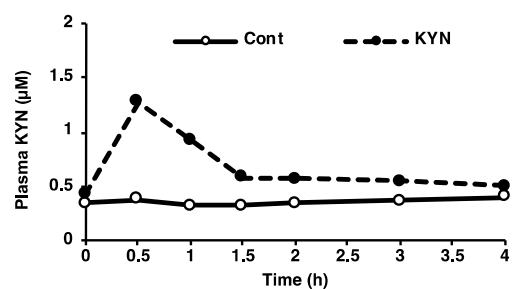


図3 キヌレニン単回投与後の血中キヌレニン濃度の推移

## (4) FOXO1 活性評価系の構築

FOXO1 活性を抑制する化合物の探索を目的とし、簡便な FOXO1 評価系を構築した。本評価系が FOXO1 活性を調節する既知化合物に反応するかを検証した。インスリンは、IGF-1/Insulin シグナルを介して Akt をリン酸化する。FOXO1 は、Akt によるリン酸化を受けると核外へ排出され、分解される。

AS1708727 (AS17)は、レポーターアッセイにより FOXO1 活性を阻害することが見出された化合物である (*Eur J Pharmacol* 2010)。本評価系において、インスリンと AS17 は、どちらも FOXO1 活性を有意に低下させたことから (図 4)、評価系の妥当性が示された。本評価系は操作が簡便であり、多検体の評価を一斉に行うことができる。今後、本評価系を用いて多検体のスクリーニングを行うことにより、FOXO1 活性を抑制する化合物を見出すことができるかもしれない。

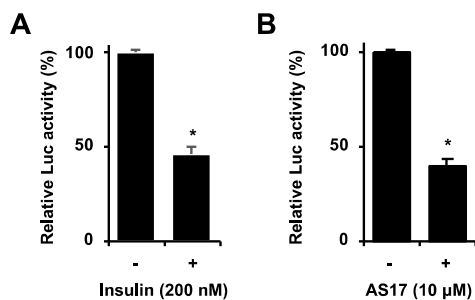


図4 被験化合物によるFOXO1活性への影響  
HEK293T cells were co-transfected with pM-FOXO1, pGL4.35 and pNL1.1.PGK. At 24 hours after transfection, the cells were treated for further 24 hours with or without, (A) Insulin (200 nM), (B) AS17 (10 μM). Values are means ± SE (n = 3). \*, p < 0.01 (vs vehicle).

#### (5) 総括

本研究では「不活動により骨格筋機能が衰えるとキヌレニン分解能が低下し、脳へのキヌレニン流入を亢進させ、うつ症状を悪化させる」という仮説を設定した。この仮説のもと、不活動モデルマウスを用いて、KATの発現変化を指標とした骨格筋のキヌレニン分解能と、スクロース水嗜好性試験および海馬のうつ関連遺伝子の発現変化を指標としたうつ症状の評価を行った。さらに、不活動による筋萎縮に中心的な役割を果たす転写因子 FOXO1 に着目し、FOXO1 の働きを抑制する可能性のある化合物の探索を目指したスクリーニング系の構築を試みた。

不活動モデルの一つとして除神経処置マウスを用いた。除神経処置マウスでは骨格筋の KAT 発現量は減少し、骨格筋のキヌレニン分解能が低下していることが示唆された。キヌレニンは、末梢においてストレス条件下で産生され血中を循環する。また、末梢からのキヌレニン投与はうつ症状を誘発することが報告されている (*Cell* 2014)。そこで、不活動にストレス負荷によるキヌレニン産生亢進が加わった状況を模倣するため、除神経処

置マウスにキヌレニンを投与した。しかし、これらマウスにおいて、海馬のうつ関連遺伝子発現量に悪影響は認められなかった。スクロース水嗜好性試験においても、群間で飲水量に差は認められなかった。これらの結果から、除神経処置により骨格筋のキヌレニン分解能が低下しても、うつ症状に影響する可能性は小さいと考えられた。

骨格筋において FOXO1 は、不活動により発現増加し筋萎縮を引き起こす。FOXO1Tg マウスの骨格筋では KAT の発現量に変化はなかったことから、骨格筋のキヌレニン分解能に FOXO1 は影響を及ぼさないことが示唆された。また、FOXO1Tg マウスにキヌレニンを投与しても、海馬のうつ関連遺伝子の発現量に悪影響は認められず、骨格筋の FOXO1 は、うつ症状の悪化にも関与しないことが示唆された。

末梢へのキヌレニン投与は、海馬の神経活性マーカーの発現低下および炎症マーカーの発現増加を引き起こすことが報告されている (*Cell* 2014)。本研究では、この報告に従ってマウスにキヌレニンを投与したが、無処置のコントロール群マウスにおいてさえ、これら遺伝子の発現変動は既報に一致しなかった。同条件でマウスにキヌレニンを投与し血中キヌレニン濃度の推移を調べたところ、キヌレニン濃度は投与後 0.5 時間でピークに達し、1.5 時間後には定常レベルまで低下していた。本研究では、投与 2 時間後にスクロース水嗜好性試験、3 時間後に採血と海馬の摘出を行ったが、どちらもうつ症状を評価するタイミングとして適切ではなかったことが推察される。また、キヌレニンとうつ症状との関係についての報告は複数あるが、一貫していない。Varga らは、キヌレニン投与により神経活性マーカーである c-Fos レベルが低下すると報告している (*Front Behav Neurosci* 2015)。一方、神経変性モデルに対してキヌレニンが神経保護作用を示すという報告もある (*Eur J Pharmacol* 2007, *Neurobiol Dis* 2008)。すなわち、キヌレニンはうつ症状を誘発する、うつの原因物質の一つであるという前提自体が不安定である可能性がある。しかしながら、本研究の行動実験には、対象数が少ない、バッテリーテストを実施していない等の問題点がある。今後、これらの点を考慮した更なる検討を進めたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Hirose, Y., Onishi, T., Miura, S., Hatazawa, Y., and Kamei, Y., Vitamin D attenuates FOXO1-target atrophy gene expression in C2C12 muscle cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, 64, 230-233 (2018).
2. Yoshida, T., Kakizawa, S., Totsuka, Y., Sugimoto, M., Miura, S., and Kumagai, H., Effect of endurance training and branched-chain amino acids on the signaling for muscle protein synthesis in CKD model rats fed a low protein diet. *Am J Physiol Renal Physiol*, 313, F805-F814 (2017).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Watanabe, Y., Nakagawa, T., Morita, A., Ogo, N., Asai, A., Kamei, Y., and Miura, S., KIS-154, a FOXO1 inhibitor, is one of the candidate compounds to prevent skeletal muscle atrophy. The 22nd Shizuoka Forum on Health and Longevity.
2. Nakagawa, T., Takeuchi, A., Nagaïke, Y., Morita, A., Ogo, N., Asai, A., Kamei, Y., and Miura, S., Screening of functional ingredient for preventing muscle atrophy., The 21st Shizuoka Forum on Health and Longevity.
3. 安島晴香、渡辺優衣、中川匠、佐山音緒、竹内彩夏、長池祐太、守田昭仁、小郷尚久、浅井章良、亀井康富、三浦進司：「Protein kinase inhibitor による筋萎縮予防作用」、第 72 回日本栄養・食糧学会大会
4. 渡辺優衣、三浦進司：「FOXO1 を阻害する KOS-154 の筋萎縮予防の可能性」、第 6 回骨格筋生物学会
5. 石野真悠、守田昭仁、三浦進司：「骨格筋の機能低下がキヌレニン代謝および「うつ」症状に与える影響」、第 7 2 回日本体力医学会大会
6. 渡辺優衣、中川匠、守田昭仁、小郷尚久、浅井章良、亀井康富、三浦進司：「Foxo1 を標的とした筋萎縮抑制化合物の探索」、第 71 回日本栄養・食糧学会大会
7. 中川匠、守田昭仁、竹内彩夏、長池祐太、佐山音緒、渡辺優衣、小郷尚久、浅井章良、亀井康富、三浦進司：「Protein kinase inhibitor による筋萎縮抑制作用」、日本農芸化学会 2017 年度大会
8. 石野真悠、三浦進司：「骨格筋機能低下によるうつ症状への影響」、第 5 回骨格筋生物学会、2017 年 3 月
9. 中川匠、竹内彩夏、長池祐太、守田昭仁、小郷尚久、浅井章良、亀井康富、三浦進司：「筋萎縮予防に働く機能性成分の探索」、第 7 1 回日本体力医学会大会

〔図書〕(計 1 件)

1. 畑澤幸乃、三浦進司、亀井康富：「非栄養素の分子栄養学」芦田均、薩秀夫、中野長

久編、建帛社 2017; pp 230-244 の転写調節因子 FOXO1、PGC-1 $\alpha$  による骨格筋機能の遺伝子発現制御の項を分担執筆

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 進司 (MIURA SHINJI)  
静岡県立大学 食品栄養科学部 教授  
研究者番号：10342932

(2)研究分担者

守田 昭仁 (MORITA AKIHITO)  
静岡県立大学 食品栄養科学部 助教  
研究者番号：40239653

(3)連携研究者

亀井 康富 (KAMEI YASUTOMI)  
京都府立大学 生命環境科学研究科 教授  
研究者番号：70300829

浅井 章良 (AKIRA ASAI)

静岡県立大学大学院 薬学研究科 教授  
研究者番号：60381737

海野 けい子 (KEIKO UNNO)

静岡県立大学 薬学部 准教授  
研究者番号：10106437

吉田 卓矢 (TAKUYA YOSHIDA)

静岡県立大学 食品栄養科学部 助教  
研究者番号：80622448

(4)研究協力者

佐藤 友紀 (SATO TOMOKI)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学  
府 博士後期課程、日本学術振興会特別研究  
員 DC1

妹尾 奈波 (SENOO NANAMI)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学  
府 博士後期課程、日本学術振興会特別研究  
員 DC2

石野 真悠 (MAYU ISHINO)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学  
府 博士前期課程