

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22270

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を活用した筋萎縮抑制食品成分の探索

研究課題名（英文）Identification of food factors that prevent skeletal muscle atrophy using human iPS cells

研究代表者

山内 祥生（Yamauchi, Yoshio）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：00444878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：加齢性筋萎縮症（サルコペニア）は、高齢者の寝たきりや要介護状態につながる主要な危険因子となっており、高齢者の筋量維持は健康寿命延伸の実現に向けた最重要課題の一つである。骨格筋量を負に制御する最も主要な因子として、骨格筋から分泌されるマイオスタチンが知られている。したがって、マイオスタチンシグナルの抑制はサルコペニアに対する予防効果が期待できるが、そのシグナルを抑制する食品由来成分は同定されていない。本研究では、ヒトiPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞に対してマイオスタチンシグナル抑制活性を有する複数の食品由来成分を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは、高齢者の寝たきりや要介護状態につながる主要な危険因子となっており、健康寿命延伸の実現には高齢者の筋量維持が重要である。マイオスタチンは骨格筋量を負に制御する最も主要な因子であり、マイオスタチンシグナルの阻害は筋ジストロフィーやサルコペニアの治療標的として着目されている。一方、サルコペニアを予防するには運動による筋力の維持・増強だけでなく、食が果たす役割も小さくない。本研究では、ヒトに対して真に有効性を発揮する食品成分を探索するため、ヒトiPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞を用いて、マイオスタチンシグナルを抑制する食品成分を同定した。

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia, age-associated skeletal muscle atrophy is a major risk factor leading to disability for the elderly. Its prevention is one of the most important issues for extending healthy life expectancy. Myostatin is the most important factor that negatively regulate skeletal muscle mass. Therefore, inhibiting myostatin signal is a plausible strategy to prevent sarcopenia. In this study, I attempted to identify food-derived factor that prevent myostatin signal and found several food-derived chemicals that protect human iPS cell-derived myocytes from myostatin.

研究分野：食品科学

キーワード：サルコペニア iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

体重の約 40%を占める骨格筋は、運動機能を発揮する上で必須の役割を果たしているほか、血中の糖質の 70~80%を取り込む代謝臓器としても極めて重要な役割を担っている。したがって、骨格筋量の減少を防ぐことは、運動機能だけでなく代謝恒常性を維持する上でも重要である。

超高齢社会に突入したわが国において、高齢者の Quality of Life の向上を実現する上で、健康寿命の延伸は極めて重要な課題となっている。加齢製筋萎縮症(サルコペニア)は高齢者の寝たきりや要介護状態につながる主要な危険因子となっており、高齢者の身体機能維持、つまり筋量の維持は、健康寿命の延伸を実現する上で重要な課題である。筋萎縮を予防するには、日常的な運動のほか、適切な食習慣も重要な役割を果たしている。日常的な運動が困難な高齢者にとって、食による筋萎縮の予防は特に重要である。また、医療費を抑制するためにも、薬に頼らない日常生活における「食」による筋量維持は魅力的な筋萎縮予防戦略と考えられる。

骨格筋量を制御する重要な因子として、骨格筋自身が分泌する TGFβファミリー因子のマイオスタチン(MSTN)が知られている(1)。MSTNは骨格筋量を負に制御する最も主要な調節因子であり、筋ジストロフィーやサルコペニアなどの患者に認められる筋萎縮を抑制する治療標的の一つとして注目されている(2)。MSTNの血中レベルと筋量が逆相関することや、高齢者で血中MSTNレベルが高いことが報告されている(3,4)。近年、MSTNとアミノ酸配列の相同性の高く、TGFβファミリーに属するGDF11も筋萎縮やフレイルを促進することが報告されている(5)。したがって、MSTNシグナルを抑制することは筋萎縮を抑制する魅力的な戦略であると考えられる。

2. 研究の目的

筋萎縮の予防において、食の果たす役割は小さくない。現在のところ、MSTNシグナル阻害活性を有する食品成分は報告されていない。そこで、本研究課題では食による筋萎縮の予防を目指し、MSTNシグナルを抑制する食品成分を同定すること目的とした(図1)。また、ヒトに対して真に筋萎縮予防効果を発揮する食品成分を探索するため、スクリーニングではヒトiPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞を活用し、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS (hiPS) 細胞の骨格筋細胞への分化誘導

hiPS細胞(hiPSC409B2^{tet-MyoD}及びhiPSC414C2^{tet-MyoD})は、京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門・櫻井英俊博士よりご供与いただいた。hiPS細胞の骨格筋細胞への分化誘導は、既報に従った(6)。

(2) レポーターアッセイ

Smad2/Smad3応答配列を含むpCAGA12-Luc(7)及びpCMV-βgalをHEK293T細胞に導入し、標準的な方法に従ってホタルルシフェラーゼ活性とβgal活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性は、βgal活性で補正した。

(3) MSTN 依存的な Smad2/Smad3 の活性化

Smad2/Smad3の活性化は、抗Smad2/Smad3抗体(#5678, Cell Signaling Technology)及び抗リン酸化Smad2/Smad3抗体(#8828, Cell Signaling Technology)を用いて、ウエスタンブロットによるSmad2/Smad3のリン酸化で評価した。また、Smad2/Smad3の細胞内局在を抗Smad2/Smad3抗体(#5678, Cell Signaling Technology)を用いて免疫蛍光染色した後、共焦点顕微鏡にて観察し、Smad2/3の核内移行を評価した。

Smad2/3標的遺伝子(*SERRPINE1*, *CDKN2B*, *CXCR4*)の発現は、リアルタイムPCR(StepOnePlus, Applied Biosystems)にて解析した。ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて抽出したRNAよりHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を使ってcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型にSmad2/Smad3標的遺伝子の発現を解析した。各遺伝子のmRNAレベルは18S rRNA量で補正した。

(4) 細胞傷害アッセイ

24-ウェルプレートに播種し、分化誘導したhiPSC409B2^{tet-MyoD}及びhiPSC414C2^{tet-MyoD}由来骨格筋細胞をMSTN(富士フィルム和光純薬)もしくはGDF11(PeproTech)とともに培養した

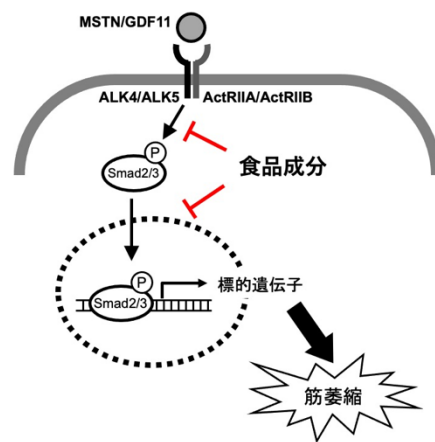


図1. マイオスタチン及びGDF11による筋萎縮シグナルと食品由来成分によるその抑制

後、Cell Counting Kit-8（同人化学）を用いて生細胞数を測定した。

(5) 食品由来成分のスクリーニング

本実験で使用した食品成分ライブラリーは、所属研究室が保有する 293 種類の食品由来化合物から構成されている。一次スクリーニングは上述のレポーターアッセイを用いて行なった。pCAGA12-Luc 及び pCMV-bgal を導入した HEK293T 細胞を MSTN (20 ng/ml) 及び食品成分 (50 μM) と 16 時間培養した後、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。二次スクリーニングは、hiPSC414C2^{tet-MyoD} 由来骨格筋細胞を用いて、上述の細胞傷害アッセイにて行った。

4. 研究成果

(1) hiPS 細胞由来骨格筋細胞を用いた MSTN および GDF11 の活性評価

MSTN は、筋量を負に制御することが広く知られている (1)。GDF11 は MSTN と非常に高い相同性を有する TGFβスーパーファミリー分子であり、筋萎縮に関与することが近年明らかにされた (5)。そこで、まず hiPSC 由来骨格筋細胞を用いて、MSTN 及び GDF11 による Smad2/Smad3 活性化を解析した。hiPSC409B2^{tet-MyoD} 及び hiPSC414C2^{tet-MyoD} 由来骨格筋細胞を MSTN もしくは GDF11 と 45 分間インキュベートし、Smad2/Smad3 のリン酸化をウエスタンブロットにて評価した。その結果、両者の骨格筋細胞において、MSTN もしくは GDF11 による Smad2/Smad3 のリン酸化が惹起されることが明らかになった (図 2)。Smad2/Smad3 のリン酸化は、MSTN 及び GDF11 のレセプターである ALK4/ALK5 阻害剤 (SB431542) で抑制された。Smad2/Smad3 の活性をさらに評価するため、その核内移行についても解析した。その結果、MSTN 及び GDF11 刺激によって Smad2/Smad3 が核内に蓄積する様子が観察された。また、MSTN 及び GDF11 は、Smad2/Smad3 標的遺伝子である *SERRPINE1* や *CDKN2B*, *CXCR4* の遺伝子発現を誘導することが示された。以上の結果から、hiPSC 由来骨格筋細胞において、MSTN 及び GDF11 は Smad2/Smad3 を活性化することが明らかとなり、以下で述べる MSTN 活性を抑制する食品成分の探索に適していると判断した。

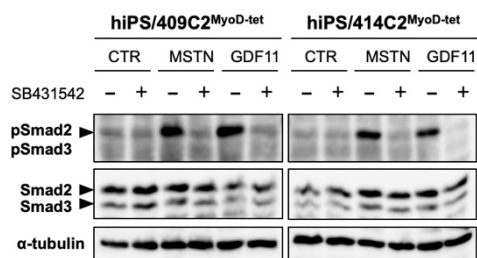


図 2. MSTN 及び GDF11 による Smad2/Smad3 の活性化
hiPSC409B2^{tet-MyoD} 及び hiPSC414C2^{tet-MyoD} 由来骨格筋細胞を SB431542 (5 μM) 存在下もしくは非存在下で MSTN (50 ng/ml) 及び GDF11 (50 ng/ml) で 45 分間刺激した後、細胞ライセートを調製し、Smad2/Smad3 のリン酸化をウエスタンブロットで解析した。

(2) MSTN シグナルを抑制する食品成分の同定

MSTN シグナルを抑制する食品成分を探索するため、一次スクリーニングでは HEK293T 細胞を用いて、Smad2/Smad3 応答配列から構成される CAGA12 レポーターアッセイを行なった。まず、HEK293T 細胞における MSTN 依存的な CAGA12 レポーター活性を測定した。その結果、HEK293T 細胞を MSTN 存在下で 16 時間処理することでそのレポーター活性が 20~30 倍程度上昇することが確認された。また、この MSTN 依存的なレポーター活性の上昇は SB431542 によって 90%以上阻害されることが確認された。

以上のことから、HEK293T 細胞を用いた CAGA12 レポーターアッセイによって、MSTN シグナル阻害活性を有する食品成分の探索が可能であると判断し、293 種類の食品由来成分を用いた一次スクリーニングを実施した。その結果、MSTN 依存的な CAGA12 レポーター活性を 70%以上抑制する食品成分として、34 種類の食品成分が同定された。続いて、hiPSC 由来骨格筋細胞を用いた二次スクリーニングを行なった。二次スクリーニングでは、MSTN による細胞傷害を指標に一次スクリーニングで得られた 34 化合物について評価した。その結果、MSTN による細胞傷害を 20%以上阻害する食品成分が 5 種類同定された。その中の 3 種類の化合物は、MSTN による細胞傷害を 50%以上阻害する活性を有していた。

(3) 食品成分による MSTN シグナルの抑制

同定された食品成分の中で hiPS 細胞由来骨格筋細胞に対する MSTN 依存的な細胞障害を軽減する活性が特に強く認められた食品成分 X について、さらに解析を進めた。その結果、食品成分 X は MSTN 依存的な Smad2/Smad3 のリン酸化と Smad2/Smad3 標的遺伝子の発現を顕著に抑制した。また、MSTN 依存的な細胞障害を濃度依存的に軽減する効果を有していた。

(4) 総括

健康寿命の延伸を実現する上で、サルコペニアの予防は極めて重要な課題である。本研究では、サルコペニアを含む筋萎縮を促進する効果を有する MSTN の活性を抑制する効果を有する食品成分の探索を hiPS 細胞由来骨格筋細胞を用いて実施した。その結果、hiPS 細胞由来骨格筋細胞において、MSTN シグナルを抑制する複数の食品成分の同定に成功した (図 1)。特に強い活性が認められた食品成分 X は、MSTN 依存的な Smad2/Smad3 のリン酸化や

Smad2/Smad3 標的遺伝の発現を顕著に抑制した。本研究では hiPS 細胞由来骨格筋細胞を用いていることから、ヒト骨格筋においても同様の活性を有することが期待される。

【引用文献】

- 1) Lee S-J. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20. 61-86.
- 2) Garber K. (2016) No longer going to waste, *Nature Biotechnol.* 34. 458-461.
- 3) Egerman MA, Glass DJ. (2019) The role of GDF11 in aging and skeletal muscle, cardiac and bone homeostasis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 54. 174-183.
- 4) Walker RG, Poggioli T, Katsimpardi L, Buchanan SM, Oh J, Wattus S, Heidecker B, Fong YW, Rubin LL, Granz P, Thompson TB, Wagers AJ, Lee RT. (2016) Biochemistry and biology of GDF11 and myostatin. *Circ. Res.* 118. 1125-1142.
- 5) Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, Mallozzi C, Jacobi C, Jennings LL, Clay I, Laurent G, Ma S, Brachat S, Lach-Trifilieff E, Shavlakadze T, Trendelenburg AU, Brack AS, Glass DJ. (2015) GDF11 increases with ages and inhibits skeletal muscle regeneration. *Cell Metab.* 22. 164-174.
- 6) Uchimura T, Otomo J, Sato M, Sakurai H. (2017) A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. *Stem Cell Res.* 25. 98-106.
- 7) Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17. 3091-3100.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Chikazawa M, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R	4. 巻 522
2. 論文標題 Bridging molecules are secreted from the skeletal muscle and potentially regulate muscle differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 113-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.010	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 -
1. 著者名 Chikazawa Miho, Moriwaki Yoshitaka, Uramoto Mari, Yamauchi Yoshio, Shimizu Makoto, Shimizu Kentaro, Sato Ryuichiro	4. 巻 529
2. 論文標題 Functional effect of nobiletin as a food-derived allosteric modulator of mouse CRFR2 in skeletal muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.189	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 -
1. 著者名 Sasaki Takashi, Watanabe Yuichi, Kuboyama Ayane, Oikawa Akira, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 296
2. 論文標題 Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100131 ~ 100131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.016203	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 Suzuki Toshihide, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Polymethoxyflavones in orange peel extract prevent skeletal muscle damage induced by eccentric exercise in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 440 ~ 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa036	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 山内 祥生、佐々木 崇、佐藤 隆一郎	4. 巻 93
2. 論文標題 ステロール代謝と骨格筋機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 15～23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930015	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 コレステロール恒常性維持機構とその生理的な役割
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshio Yamauchi, Hodaka Saito, Ryuichiro Sato
2. 発表標題 Role of endogenous oxysterols in cellular cholesterol homeostasis
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 Regulation of cellular sterol homeostasis by endogenous oxysterols
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を活用した食品機能性研究の基盤構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤 優里、櫻井 英俊、佐藤 隆一郎、山内 祥生
2. 発表標題 ヒトおよびマウス骨格筋細胞が分泌するエクソソームの生化学的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 悠馬、佐々木 崇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 摂食応答性骨格筋E3ユビキチンリガーゼTrim7の発現制御機構と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 趙堯琳，久保 美遥、櫻井英俊、佐藤隆一郎、山内祥生
2. 発表標題 メバロン酸経路はヒトiPS細胞由来骨格筋細胞においてタンパク質恒常性を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺祥、須藤優里、櫻井英俊、佐藤隆一郎、山内祥生
2. 発表標題 ヒト及びマウス骨格筋由来細胞外小胞のプロテオミクス解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多美香子、櫻井英俊、佐藤隆一郎、山内祥生
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来骨格筋細胞を利用したmyostatinとGDF11の活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 崇、渡邊 雄一、久保山 文音、及川 彰、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 骨格筋特異的な胆汁酸受容体TGR5の過剰発現はグルコースクリアランスを改善する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------