

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02942

研究課題名（和文）ビタミンD不足による骨格筋萎縮のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms responsible for skeletal muscle atrophy induced by vitamin D deficiency

研究代表者

下村 吉治（SHIMOMURA, Yoshiharu）

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：30162738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンD（VD）は骨格筋を維持する生理機能を持つがそのメカニズムは不明である。デキサメタゾン（DEX）は過剰投与により筋萎縮を誘発する合成ホルモンであるが、本研究ではDEX投与による筋萎縮に対するVDの作用についてラットを用いて検討した。

通常タンパク質含有飼料で飼育したラットにDEXを投与すると主に速筋線維で構成される下肢筋（前脛骨筋重量など）重量が低下したが、主に遅筋線維で構成されるヒラメ筋重量に影響はなかった。一方、低タンパク質飼料で飼育したラットにDEXを投与するとヒラメ筋重量も低下した。よって、低タンパク質栄養の状態ではVDが遅筋を維持する機能を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは加齢に伴い血中ビタミンD（VD）濃度は低下し、高齢者ではVD不足の割合が高い。この所見に加えて、高齢者では血中VD濃度と身体運動機能は密接に関係することが知られており、VD不足がサルコペニアの重要な要因の一つであるとされている。これらの所見を反映してVDを運動機能の改善薬とするための研究が進行しているが、VDの骨格筋に対する作用機構は不明である。本研究の結果は、サルコペニアを含む筋萎縮の予防法の開発に繋げるためのVDの生理機能を明らかにした所見として重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Vitamin D (VD) plays a role to maintain skeletal muscles, but the mechanisms responsible for the physiological function of VD are not known. Dexamethasone (DEX) is a synthetic hormone that induces muscle atrophy by an overdose administration. The present study examined the action of VD on the muscle atrophy induced by DEX administration in rats.

In the rats raised with the diet containing the regular protein content, DEX administration induced muscle atrophy in hindlimb muscles (for example, plantaris muscle) that are constructed with mainly fast-twitch muscle fibers, but not in soleus muscle that is constructed with slow-twitch muscle fiber. On the other hand, in the rats raised with the low-protein diet, DEX administration induced muscle atrophy both fast-twitch as well as slow-twitch muscle fibers. These findings suggest that VD has a function that maintains slow-twitch muscle fibers in rats with protein malnutrition.

研究分野：栄養生化学

キーワード：筋タンパク質 ビタミンD 食餌タンパク質 グルココルチコイド BCAA ラット

1. 研究開始当初の背景

ビタミンD (VD) は、ヒトを含む哺乳動物においてカルシウム代謝を調節して健康な骨の形成に必須のビタミンであることは古くから知られているが、近年の研究によりVDの生理作用は極めて多様であり種々の生理機能に関与することが明らかにされてきた。その一つに骨格筋に対する作用がある。VDは体内で活性型 ($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$) に変換され、その作用は細胞内のVD受容体に結合し細胞核内で遺伝子発現を調節して発揮される。VD受容体を欠損したマウスでは、骨格筋の発達が悪化して筋線維の縮小が見られると共に運動能力の低下が観察されている[1]。ヒトでは加齢に伴い血中VD濃度は低下するため、高齢者ではVD不足の割合が高い[2]。このため、特に高齢者では血中VD濃度と身体運動機能は密接な関係にあることが知られるようになり、VD不足がサルコペニアの重要な要因の一つであるとされている[3]。現在では、VDを運動機能の改善薬とするための研究が進行しており、高齢男性へのVDと乳清タンパク質投与が筋タンパク質合成促進と下肢筋肉量を増大することが報告された[4]。しかし、VDの骨格筋に対する作用機構はほとんど不明なままである。

BCAA (ロイシン、イソロイシン、バリン) は、ヒトを含む哺乳動物の必須 (不可欠) アミノ酸である。BCAAは、筋タンパク質を構成する必須アミノ酸の約35%を占めるため、ヒトは多くのBCAAを体内に保有している。しかし、タンパク質を構成するアミノ酸は生理的には不活性であり、体内の遊離アミノ酸としてのBCAAが強い生理作用を発揮する。BCAAの中でも特にロイシンのタンパク質代謝に対する作用は強く、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) を活性化してmRNAの翻訳 (タンパク質合成) を促進し、オートファジー (タンパク質分解) を抑制する。すなわち、ロイシンは筋タンパク質同化作用の強いアミノ酸である。よって、体内におけるBCAA分解の調節は体内のタンパク質代謝の調節に重要である。体内のBCAA分解の調節は、その分解系の2番目の酵素である分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) によって達成されており、さらにBCKDHの活性調節はその酵素の特異的キナーゼ (BCKDH kinase: BDK) に強く依存している[5]。

ラット・マウスにグルココルチコイド (GC) を投与すると骨格筋が萎縮することが古くから知られており、筋萎縮のモデル動物として用いられている。GCは異化作用の強いホルモンであるが、同化作用の強いロイシンの作用と拮抗することが考えられる。最近の研究[6]において、GCによるmTORC1阻害は、BCAA代謝系のアミノ基転移酵素 (BCAT) の発現増加とBDKの発現抑制により、BCAA (ロイシン) 分解を促進することにより達成されることが判明した。よってGCによる筋萎縮には、BCAA分解亢進と筋タンパク質分解促進の両方が作用していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、サルコペニアの予防法の開発に繋げるために骨格筋に対するVDの作用機構を解明することを目的とし、そのために実験動物の主に骨格筋に対するVDとGCの作用を対比して検討した。

3. 研究の方法

マウスまたはラットを実験動物として用いた本研究計画は、実験開始前に中部大学動物実験委員会専門委員会で審議され、承認された。

研究を開始した当初では、実験等物としてマウスを使用して、骨格筋に対する飼料中のVD不足の影響を検討したが、マウスにおいてはVD不足による骨格筋の萎縮が顕著でなかったため、以降の研究ではラットを実験動物として使用した。

[実験1] 精製食であるAIN-93Gを与えた9週齢の雄性SDラットに生理食塩水またはDEX (0.6 mg/kg 体重、1日に1回投与) を5日間連続腹腔内投与した。実験最終日の投与後、6時間食餌を除いて絶食状態にしたのち、イソフルラン麻酔下にて屠殺して血液と組織を採取した。血液からは血漿を分離し、骨格筋および肝臓の重量を測定した。血漿と肝臓は -80°C にて分析まで凍結保存した。[実験2] 5週齢の雄性SDラットを2群に分け、対照食 (AIN-93G) またはVD欠乏食 (AIN93GからVDを除去した食餌) のいずれかを7週間与えた。13週齢で各群をさらに2群に分け、実験1と同様に生理食塩水またはDEXを投与し、実験最終日に同様にラットを処理した。

[実験3-1] 5週齢の雄性SDラットに低タンパク質 (LP: タンパク質を8%に調整したAIN-93G) 食を4週間与えた。9週齢で2群に分け、実験1と同様に生理食塩水またはDEXを投与し、実験最終日に同様にラットを処理した。[実験3-2] 5週齢の雄性SDラットにLP-VD欠乏食 (LP食からVDを除去した食餌) を4週間与えた。9週齢で2群に分け、実験1と同様に生理食塩水またはDEXを投与し、実験最終日に同様にラットを処理した。[実験4] LP食摂取ラットのVD摂取量を対照的な条件にして実験を行った。すなわち、5週齢の雄性SDラットを2群に分け、LP-高VD食 (AIN93-Gに含まれるVDを3倍量に調整したLP食) またはLP-VD欠乏食 (AIN93-Gに含まれるVDを除去したLP食) のいずれかを7週間与えた。13週齢で各群をさらに2群に分け、実験1と同様に生理食塩水またはDEXを投与し、実験最終日に同様にラットを処理した。

血漿グルコースとインスリン濃度の測定は市販のキットを用いて実施した。肝臓組織における BCKDH 活性は Nakai et al. の方法 [7] を用いて測定した。酵素活性は 1 U を 1 μ mol NADH 生成/min として表した。BCKDH は in vivo において活性型とリン酸化された不活性型が存在するので、in vivo での活性型のみでの酵素活性、および全ての酵素を市販のホスファターゼで活性化し、のちに分析した総酵素活性（酵素量に対応する酵素活性）を測定した [7]。前者を actual 活性、後者を総活性として表した。

研究中で用いた組織特異的 BDK 欠損マウスの調製は原則として Ishikawa et al. の報告 [8] に準じた。

結果の測定値は全て平均値 \pm SE で表した。2 群間の差の検定には *t* 検定を用いた。

4. 研究成果

[実験 1]

DEX 投与により、体重、前脛骨筋重量と足底筋・腓腹筋重量が低下したが、ヒラメ筋重量には影響がなかった (表 1)。前脛骨筋重量と足底筋・腓腹筋 (主に速筋) 重量の減少の原因として、GC 受容体発現量が速筋線維に高いことが考えられる。

血漿成分の分析では、グルコース濃度が Saline 群で 159 ± 6 、DEX 群で 620 ± 28 mg/dl、インスリン濃度がそれぞれ 1.9 ± 0.2 、 7.2 ± 1.1 ng/ml であった。すなわち、DEX 群は高血糖および高インスリン血症の状態にあり、インスリン感受性が著しく低下した状態であることが判明した。

肝 BCKDH 総活性は Saline 群で 0.94 ± 0.08 、DEX 群で 1.12 ± 0.07 U/g 肝組織、actual BCKDH 活性はそれぞれ 0.36 ± 0.07 、 0.45 ± 0.10 U/g 肝組織であり、DEX 投与による有意な変化は認められなかった。DEX 投与は actual BCKDH 活性を上昇することが予測されたが、高インスリン血症は逆の作用を及ぼす可能性が考えられるので、DEX の作用が高インスリン血症により相殺された可能性が考えられる。したがって、筋萎縮と BCAA 代謝との関係性は低いと推察されるので、以下に記載の実験ではそのデータを割愛した。

[実験 2]

実験 1 と同様に DEX 投与による体重の減少傾向および前脛骨筋重量と足底筋・腓腹筋重量の減少、すなわち筋萎縮が認められたが、ヒラメ筋には影響はなかった (表 2)。よって、DEX 投与による筋萎縮に対して通常タンパク質量を含む VD 欠乏食による影響は認められなかった。

血糖値と血漿インスリン濃度は、餌中の VD 量に関係なく実験 1 と同様に DEX 投与により有意な高値を示した。

表 2. 実験 2 における体重および下肢筋重量

測定項目 (g)	Control \cdot Saline	Control \cdot DEX	低 VD \cdot Saline	低 VD \cdot DEX
最終体重	460 ± 14	411 ± 13	461 ± 11	$387 \pm 10^*$
肝臓	15.6 ± 1.19	$21.3 \pm 1.49^*$	15.5 ± 0.34	19.8 ± 0.78
前脛骨筋	0.68 ± 0.02	$0.56 \pm 0.01^*$	0.70 ± 0.03	$0.57 \pm 0.02^*$
足底筋・腓腹筋	2.47 ± 0.09	$2.05 \pm 0.05^*$	2.46 ± 0.06	$2.07 \pm 0.05^*$
ヒラメ筋	0.160 ± 0.001	0.150 ± 0.007	0.160 ± 0.004	0.168 ± 0.006

* $P < 0.05$ vs 同 VD 含有食摂取ラットの Saline 群

[実験 3]

LP 食を与えたラットでも実験 1 および実験 2 と同様に DEX 投与により前脛骨筋重量と足底筋・腓腹筋重量が低下した (表 3 <実験 3-1>)。一方、LP-VD 欠乏食摂取ラットでは DEX 投与により前脛骨筋重量と足底筋・腓腹筋重量の低下に加えてヒラメ筋重量も有意に低下した (表 3 <実験 3-2>)。これまでの報告では、主に遅筋線維で構成されているヒラメ筋では DEX 投与による筋萎縮は認められなかったため、この結果は DEX 投与による筋萎縮における新たな所見である。これらの結果より、低タンパク質栄養の状態では VD が遅筋を維持する機能を担っている可能性が示唆された。

表 3. 実験 3-1 と実験 3-2 におけるラット体重と下肢筋重量

測定項目 (g)	<実験 3-1>		<実験 3-2>	
	Saline	DEX	Saline	DEX
最終体重	351 ± 18	$312 \pm 8^*$	364 ± 11	$287 \pm 26^*$
肝臓	13.7 ± 1.1	17.3 ± 0.85	14.2 ± 1.4	14.9 ± 0.66
前脛骨筋	0.64 ± 0.02	$0.57 \pm 0.01^*$	0.65 ± 0.03	$0.52 \pm 0.02^*$
足底筋・腓腹筋	1.87 ± 0.05	$1.51 \pm 0.04^*$	1.84 ± 0.06	$1.47 \pm 0.05^*$
ヒラメ筋	0.112 ± 0.008	0.122 ± 0.004	0.122 ± 0.005	$0.106 \pm 0.004^*$

* $P < 0.05$ vs. Saline 群

血糖値と血漿インスリン濃度は、餌中の VD 量に関係なく上記の実験と同様に DEX 投与により有意な高値を示した。

[実験4] LP食摂取ラットのVD摂取量を対照的な条件にした本実験では、LP-VD欠乏食摂取ラットへのDEX投与の影響として、前脛骨筋、足底筋・腓腹筋重量だけでなく、ヒラメ筋重量も低下した(表4)。よって、実験3と同様にVDが遅筋を維持する役割を担っている可能性が示唆された。このラットのヒラメ筋筋線維数を免疫染色により解析した結果、総筋線維数(速筋と遅筋の筋線維数の合計)および速筋線維の割合ともに全ての実験群(4群)間で差がなかった。よって、本実験におけるDEX投与によるヒラメ筋萎縮は、筋線維タイプの変化によってもたらされたとは考えにくい。

表4. 実験4におけるラット体重と下肢筋重量

測定項目(g)	高VD・Saline	高VD・DEX	低VD・Saline	低VD・DEX
解剖時体重	434 ± 10	390 ± 15	438 ± 17	387 ± 16
肝臓	14.2 ± 0.56	21.0 ± 1.6*	14.3 ± 0.56	19.3 ± 1.5*
前脛骨筋	1.16 ± 0.03	0.94 ± 0.06*	1.10 ± 0.04	0.97 ± 0.05
足底筋・腓腹筋	2.39 ± 0.06	1.95 ± 0.11*	2.35 ± 0.07	1.97 ± 0.05*
ヒラメ筋	0.163 ± 0.014	0.153 ± 0.010	0.158 ± 0.009	0.122 ± 0.010*

*P<0.05 vs 同VD含有食摂取ラットのSaline群

血糖値と血漿インスリン濃度は、上記の実験と同様に餌中のVD量に関係なくDEX投与により有意な高値を示した。

本研究と関連するBCAA代謝の調節に関する研究において、前脳部特異的にBCAA代謝を亢進させたマウス(BDK-Emx1-KOマウス)において、低タンパク質食(5%タンパク質食)を摂取させると脳神経機能異常が認められること、およびこのマウスでは走運動トレーニング後の走運動持久力が有意に上昇することが観察された[9]。さらに、BCAA代謝調節の基礎的な研究において、高血圧症薬であるvalsartanはBDKの特異的阻害剤であり、valsartanをラットに投与するとBCAA代謝が促進されることを見出した[10]。また、BCKDH活性の調節にCaイオンが関与する所見がin vitroの研究において報告されているが[11]、ラットにビタミンD欠乏食を長期に摂取させることにより血漿Caイオン濃度をわずかではあるが低下させると、肝BDK活性の抑制と共にBCKDH活性が有意に上昇することを見出した[12]。この所見は、BCKDH活性がCaイオンにより調節されることを示唆するin vivoにおける重要な所見である。

引用文献

1. Girgis et al. *Endocr Rev.* 34:33-83, 2013.
2. Holick. *N Engl J Med.* 357:266-281, 2007.
3. 増田 他, *食と医療.* 5:50-57, 2018.
4. Chaner et al. *J Nutr.* 147:2262-2271, 2017.
5. Shimomura et al. *J Nutr.* 136:250S-253S, 2006.
6. Shimizu et al. *Cell Metab.* 13:170-182, 2011.
7. Nakai et al. *Methods Enzymol.* 324:48-62, 2000.
8. Ishikawa et al. *Sci Rep.* 7:39825, 2017.
9. Mizusawa et al. *Nutrients.* 12:2267, 2020.
10. Kitaura et al. *Pharmacol Res.* 167:105518, 2021.
11. Noguchi et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 504:916-920, 2018.
12. Yoshida et al. *J Nutr Sci Vitaminol.* 69:490-492, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 YOSHIDA Natsuko, OI Yuna, KITAURA Yasuyuki, SHIMOMURA Yoshiharu	4. 巻 69
2. 論文標題 Activation of Hepatic Branched-Chain α -Ketoacid Dehydrogenase Complex by Vitamin D Deficiency in Rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 490 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.69.490	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 Nakai N, Iida N, Kitai S, Shimomura Y, Kitaura Y, Higashida K.	4. 巻 86
2. 論文標題 BDK knockout skeletal muscle satellite cells exhibit enhanced protein translation initiation signal in response to BCAA in vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 610-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac021.	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 Mizusawa A, Watanabe A, Yamada M, Kamei R, Shimomura Y, Kitaura Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 BDK deficiency in cerebral cortex neurons causes neurological abnormalities and affects endurance capacity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12082267.	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 該当する
1. 著者名 Kitaura Y, Shindo D, Ogawa T, Sato A, Shimomura Y.	4. 巻 167
2. 論文標題 Antihypertensive drug valsartan as a novel BDK inhibitor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 105518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phrs.2021.105518.	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大井優奈、吉田奈津子、橋村香穂、北浦靖之、下村吉治
2. 発表標題 ビタミンD不足によるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の促進
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田奈津子、大井優奈、橋村香穂、北浦靖之、下村吉治
2. 発表標題 デキサメタゾン投与によるラット後肢筋の萎縮における週齢およびビタミンD不足の影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiharu Shimomura
2. 発表標題 Branched-chain amino acids as functional foods
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuna Oi, Natsuko Yoshida, Kaho Hashimura, Yasuyuki Kitaura, Yoshiharu Shimomura
2. 発表標題 Dexamethasone-induced muscle atrophy in rats: effects of age and vitamin D deficiency
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北浦 靖之、清河 碧、下村 吉治
2. 発表標題 BCAA代謝を促進すると白色脂肪組織のベージュ化が促進される
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第15回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 奈津子、橋村 香穂、大井 優奈、北浦靖之、下村 吉治
2. 発表標題 ラットにおけるBCAA代謝に対するデキサメタゾン投与の影響
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第15回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 奈津子、橋村 香穂、大井 優奈、北浦靖之、下村 吉治
2. 発表標題 ビタミンD欠乏ラットの骨格筋に対するデキサメタゾン投与の影響
3. 学会等名 第79回日本栄養・食糧学会中部支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村吉治
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の多様な生理作用
3. 学会等名 令和3年度日本栄養・食糧学会、日本栄養改善学会「若手フォーラム」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水澤杏南、山田みのり、亀井里奈、下村吉治、北浦靖之
2. 発表標題 走運動持久力に対する前脳部特異的 BCAA代謝亢進の影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村友紀、井上智也、下村吉治、北浦靖之
2. 発表標題 BCAA誘発性mTORC1活性化に対する食事組成の影響
3. 学会等名 第14回日本アミノ酸学会学術大会（オンライン開催）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	津田 孝範 (TSUDA Takanori) (90281568)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	
研究 分担者	北浦 靖之 (KITAURA Yasuyuki) (90442954)	名古屋大学・生命農学研究科・講師 (13901)	

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