

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500021

研究課題名(和文) 分岐鎖アミノ酸の筋萎縮抑制作用の基盤を形成する成長ホルモンの役割

研究課題名(英文) GH plays a role in the protective effect of BCAA against muscle atrophy

研究代表者

置村 康彦 (OKIMURA, Yasuhiko)

神戸女子大学・家政学部・教授

研究者番号：30204100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖アミノ酸(BCAA)は筋萎縮抑制作用をもっている。BCAAはタンパク質を作る素材としてでなく、細胞間で情報を伝える物質として作用し、筋萎縮を抑制していることが知られている。今回、この作用を発揮するためには、成長ホルモンが必要であることが明らかとなった。成長ホルモンがないと、BCAAが作用を発揮するために必要なmTOR複合体1の作用が不十分となり、BCAAの作用が生じないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Branched-chain amino acid (BCAA) prevents muscle atrophy. mTOR complex 1 (mTORC1) plays a pivotal role in the protective actions of BCAA. GH is also known to have a protective effect against muscle atrophy. We examined whether BCAA exerts a protective effect against dexamethasone (Dex)-induced muscle atrophy independently of GH using GH-deficient spontaneous dwarf rats (SDRs). BCAA did not increase cross-sectional area (CSA) of the muscle fibers and did not stimulate the phosphorylation of p70S6K and 4E-BP1, both of which are phosphorylated by mTORC1 and stimulate protein synthesis. In contrast, after GH supplementation, muscle fiber CSA was decreased by Dex and BCAA prevented the Dex-induced decrease in CSA. BCAA increased p70S6K phosphorylation. These findings suggest that GH increases mTORC1 activity to recover the action of BCAA in SDRs and that GH is required for the actions of BCAA in muscles.

研究分野：病態栄養学

キーワード：分岐鎖アミノ酸 骨格筋 成長ホルモン mTOR

## 1. 研究開始当初の背景

不動、神経切断、炎症、腫瘍、糖尿病など種々の疾患、状況において、筋萎縮が発生する。加齢に伴い発症する筋萎縮はサルコペニアとよばれ、高齢者の運動能を低下させ、自立を阻害する大きな因子となっている。研究開始当初、これらの筋萎縮を抑制する方法の開発が望まれていた。この状況は現在も変わっていない。

筋萎縮抑制法の開発は重要な課題であるが、サルコペニアへの臨床応用をも考えた場合、長期にわたって安全に容易に投与できる薬物、食品で筋萎縮を抑制することが望ましいと。そこで、安全性が確立されている分岐鎖アミノ酸(BCAA)に着目し、研究に着手した。その結果、BCAA は、ラットにおいて、グルココルチコイド誘導性筋萎縮、および不動性筋萎縮を抑制することを報告した。また、このBCAAの作用はmTORを介して発揮され、筋蛋白合成の亢進のみならず、筋蛋白崩壊を促進するオートファジー系やユビキチンプロテアソーム系を抑制することを見出した。

サルコペニアは多数の因子が複合して発症に至るものと推測されるが、加齢に伴い出現する成長ホルモン(GH)分泌不全(ソマトポーズ)が大きく関与していると考えられている。GHにより分泌促進されたIGF-Iは、筋に作用し筋萎縮を抑制すると考えられているが、BCAAの細胞内情報伝達系は、IGF-Iのそれと共通する部分があるため、GH/IGF-I系の作用不全をBCAAで代替できるのではないかと考えた。しかし、予備実験では、グルココルチコイド誘導性筋萎縮に対するBCAAの抑制作用は、GH欠損ラットであるspontaneous dwarf rat (SDR)では観察できなかった。

## 2. 研究の目的

背景に記述した実験成績より、BCAAが筋萎縮作用を発揮するためには、GH/IGF-Iが必要であるという仮説を設けた。本研究はこの仮説を検証し、BCAA作用の基盤を形成するGHの役割を明確にすることを目的とした。具体的には、次の事項を検討することを目的とした。

(1) SDRにおけるBCAAの筋萎縮抑制作用の欠如が、GH投与によって回復するかどうか、組織学的に検討する。

(2) 筋蛋白合成に関わる細胞内シグナル分子であるmTOR活性化に及ぼす効果を、SDR、およびGHを補充したSDRの骨格筋で比較検討する。

(3) 筋蛋白分解に関与するユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系の活性化について、SDR、およびGHを補充したSDRの骨格筋で比較検討する。また、BCAAのそ

れらのシステムに及ぼす効果についても比較検討する。

(4) mTORC1の上流にありBCAAの作用発揮に関わる因子であるアミノ酸トランスポーターがGHの標的である可能性がある。そこで、BCAAトランスポーターのmRNA量をSDR、およびGHを補充したSDRで比較検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 合成副腎皮質ホルモンであるデキサメサゾンによる筋萎縮に及ぼすBCAAの効果を、SDRとGHを補充したSDRと比較した。SDRを、デキサメサゾン(600 µg/kg/day)腹腔内投与群、BCAA(リーバクト 600 mg/kg/day)経口投与群、デキサメサゾン+BCAA投与群、対照群の4群に分け、5日間それぞれの投与を行った。第6日にヒラメ筋、長趾伸筋を採取、ATPase染色を行い、筋線維断面積を計測した。デキサメサゾン、BCAA投与の9日前より第5日まで、浸透圧ポンプでGH(5 µg/h、14日間)を持続補充投与したSDRでも同様の投与を行った。

(2) 上記各処置を施したSDR骨格筋、およびGHを補充したSDR骨格筋において、mTORの下流に位置するS6K、4EBP1リン酸化に及ぼすBCAAの効果をウェスタンブロットで調べ、mTORの活性化を評価した。

(3) 各処置を施したSDR骨格筋、およびGHを補充したSDR骨格筋において、筋萎縮時に増加する筋特異的なユビキチンリガーゼであるatrogen-1、MuRF1 mRNA量をRT-PCRで測定した。オートファジー系に関わるBnip3、mTOR活性を抑制するREDD1、デキサメサゾンによって発現が増加するとされているFoxO1、FoxO3、FoxO4のmRNA量をも、RT-PCRで測定した。

(4) SDR骨格筋、およびGHを補充したSDR骨格筋において、BCAAを含む中性アミノ酸のトランスポーターであるLAT1 mRNA量をRT-PCRで測定した。

(5) 当初、予定しなかった研究であるが、(4)の結果から、LAT1発現がGHにより増加したことから、C2C12細胞を使用してGHの作用機構についてさらに検討した。C2C12細胞を筋管細胞に分化させた後、培養液にGH(100 ng/mL)、IGF-I(100 ng/mL)を添加し、6時間後に総RNAを抽出、RT-PCRでLAT1 mRNA量を測定した。

## 4. 研究成果

(1) GH欠損のないラットでは、BCAAの投与は筋線維断面積を増加させ、デキサメサゾンの筋線維減少効果を抑制する。しかし、SDRの骨格筋においては、BCAAの筋線維

断面積に及ぼす効果は明確ではなかった。デキサメサゾンにはむしろ増加させ、BCAA はその効果に拮抗的に作用した。一方、GH を補充した SDR では、GH 欠損のないラットと同様、デキサメサゾンは筋線維断面積を減少させ、BCAA はその効果を抑制した。この成績は、一部予想外のものであり、GH が存在しない時、デキサメサゾンは筋線維断面積を若干ではあるが増加させる結果となった。デキサメサゾンは、筋線維断面積を増加させる作用と筋線維断面積を減少させる作用の両者を併せ持ち、筋線維断面積減少作用は GH の作用を阻害することにより生じると解釈すれば、この成績の説明は可能であるかもしれない。

(2) SDR 骨格筋では、デキサメサゾンの存在に関らず、BCAA は S6K、4EBP1 のリン酸化を促進しなかった。一方、GH を補充した SDR 骨格筋では、BCAA は S6K、4EBP1 のリン酸化を促進した。この成績は、BCAA の mTOR 活性化には GH が必要であることを示唆する。

(3) SDR 骨格筋において、デキサメサゾンは atrogin-1、MuRF1 mRNA 量を増加させなかった。Bnip3 mRNA 量はデキサメサゾンにより増加するものの、BCAA により抑制されなかった。デキサメサゾンおよび BCAA は、REDD1、FoxO1、FoxO3、FoxO4 mRNA 量に影響を及ぼさなかった。一方、GH を補充した SDR 骨格筋では、atrogin-1、Bnip3 mRNA 量は、ヒラメ筋と長趾伸筋では若干差異があるものの、概ねデキサメサゾンにより増加し、BCAA でその増加が抑制された。また、REDD1、FoxO1、FoxO3、FoxO4 mRNA 量はデキサメサゾンにより増加し、BCAA はその増加を抑制、あるいは抑制する傾向を示した。以上のように、SDR に GH を補充した時初めて、通常のラットで観察されるデキサメサゾン、BCAA に対するこれらの mRNA の増減反応が再現できた。

(4) GH を補充した SDR 骨格筋における LAT1 mRNA 量は、SDR 骨格筋のそれと比べて、明らかに増加していた。

(5) C2C12 筋管細胞において、GH は LAT1 mRNA 量に影響を及ぼさなかった。一方、IGF-I は LAT1 mRNA 量を増加させた。SDR でみられた GH による LAT1 増加作用は、GH の直接作用でなく、IGF-I の増加を介する間接作用であることが推測された。

(6) 以上の成績から、これまで BCAA の筋萎縮抑制作用における主要な機構であると報告されている mTOR 活性化には、GH の存在が必要であることが明らかとなった。LAT1 ノックアウトマウスでは、BCAA による S6K のリン酸化が欠けているという報告

があるが、この報告を併せて考えると、GH は LAT1 の発現増加を介して、BCAA 作用を回復させる可能性も示唆された。これについては、さらに検討中である。

私の知る限りでは、これまで GH/GF-I 系と BCAA の作用連関についての報告はなく、本研究のインパクトは大きいものとする。この 2 者にとどまらず、ホルモンと栄養素の共同作用という新たな分野の展開が期待される。

当初予期しなかった成績として、GH が存在しない時、デキサメサゾンは筋線維断面積を若干ではあるが増加させたことが挙げられる。この機序については、さらに検討を必要とする。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Bando H, Iguchi G, Okimura Y, Odake Y, Yoshida K, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Fukuoka H, Mokubo A, Tojo K, Maniwa Y, Ogawa W, Takahashi Y. A novel thymoma-associated autoimmune disease: Anti-PIT-1 antibody syndrome. *Sci Rep.* 2017 7:43060. doi: 10.1038/srep43060 査読あり

Nishida H, Ikegami A, Kaneko C, Kakuma H, Nishi H, Tanaka N, Aoyama M, Usami M, Okimura Y. Dexamethasone and BCAA Failed to Modulate Muscle Mass and mTOR Signaling in GH-Deficient Rats. *PLoS One.* 2015 10(6):e0128805. doi: 10.1371/journal.pone.0128805. eCollection 2015. 査読あり

Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Yamamoto M, Hidaka-Takeno R, Okimura Y, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Tojo K, Takahashi Y. Involvement of PIT-1-reactive cytotoxic T lymphocytes in anti-PIT-1 antibody syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(9):E1744-9. doi: 10.1210/jc.2014-1769. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

山本優、澤蘭、森元彩馨、和気郁実、置村康彦、C2C12 細胞においてグルコースは AMPK 活性を抑制して LAT1 mRNA 量を減少させる、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017 年 4 月 20~22 日、みやこメッセ(京都府・京都市)

西田ひかる、池上彩香、金子千晶、角間瞳、西寿乃野、田中紀子、青山倫子、宇佐美眞、置村康彦、GH/IGF-I 系は筋におけるデ

キサメサゾン(Dex)および分岐鎖アミノ酸(BCAA)の作用に關与している、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 4 月 21~23 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

高橋路子、置村康彦、小武由紀子、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衛、福岡秀規、井口元三、北沢理子、小川涉、高橋裕、新規アディポカイン、ケマリンは副腎髓質を介して褐色脂肪機能を抑制する、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 4 月 21~23 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

西田ひかる、相原愛、梶原絵美、池上彩香、角間瞳、金子千晶、西寿野、田中紀子、置村康彦、分岐鎖アミノ酸経口投与の筋萎縮抑制作用における成長ホルモンの關与、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24~26 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

Okimura Y. Branched chain amino acids and muscle atrophy protection In Branched Chain Amino Acids in Health and Disease volume 2 edited by Profs. Rajkumar Rajendram, Victor R. Preedy and Vinood B. Patel. 49-63. Humana Press, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

置村 康彦 (OKIMURA, Yasuhiko)  
神戸女子大学・家政学部・教授  
研究者番号：30204100

### (4) 研究協力者

西田 ひかる (NISHIDA, Hikaru)  
神戸女子大学大学院・家政学研究科・院生  
山本 優 (YAMAMOTO, Yu)  
神戸女子大学大学院・家政学研究科・院生  
和気 郁実 (WAKE, Ikumi)  
神戸女子大学大学院・家政学研究科・院生