

令和 元年 9 月 11 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00890

研究課題名(和文)炎症抑制効果を有する乳清タンパク質分解ペプチドによるサルコペニアの予防と改善

研究課題名(英文)Prevention of the onset and development of sarcopenia by using a whey protein-derived peptide mixture that suppresses inflammation

研究代表者

佐々木 一 (Sasaki, Hajime)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：80747634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニア(加齢性筋肉減弱症)の予防に、乳清たんぱく質分解ペプチドが有効であることを検討した。

乳清たんぱく質分解ペプチドが、損傷を誘発したマウス腓腹筋の炎症を抑制する効果を確認した。たんぱく質合成制御因子であるmTORの遺伝子発現量とリン酸化mTOR量を指標とし、さらにそれらの遺伝子発現量を検討し、同ペプチドが骨格筋のたんぱく質合成制御を正に促進する効果を確認した。これらの結果は、同ペプチドがサルコペニアの発症予防および進行遅延に有効であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の慢性炎症は、骨格筋のたんぱく質分解系を活性化し筋分解を促進する。そのため、慢性炎症抑制およびたんぱく質合成促進は、サルコペニアの予防・進行抑制のために必要な課題である。乳清たんぱく質は、栄養学的に優れたアミノ酸供給源である。今回の研究で得られた結果(骨格筋の炎症抑制、たんぱく質合成促進)は、乳清たんぱく質(分解ペプチド)が、サルコペニアの栄養療法に機能性たんぱく質としても利用できることを示している。栄養価値の高い乳清たんぱく質にさらにサルコペニアの栄養療法に有効な機能を明らかにした点は、学術的および社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to know if whey protein-derived peptide is effective to prevent sarcopenia. Whey protein-derived peptide intakes suppressed the injury-induced inflammation in the gastrocnemius muscle of mice. Also, whey protein-derived peptide intakes upregulated the mRNA and protein expression of mTOR in the gastrocnemius muscle of mice. These results indicate that whey protein-derived peptide has beneficial properties for a nutritional therapy of sarcopenia. The results obtained by this study suggest that whey protein-derived peptide could be a candidate as a protein source to be utilized in nutrition therapy for patients of sarcopenia.

研究分野：応用栄養学

キーワード：サルコペニア 乳清たんぱく質 ペプチド 骨格筋 炎症 たんぱく質合成

1. 研究開始当初の背景

サルコペニア（加齢性筋減弱症）は、高齢者の重大な身体的問題である。サルコペニアの主症状は、骨格筋の委縮と機能低下である。筋量の低下は、身体活動量の低下を誘発し、免疫を含む身体機能の低下により健康寿命を短縮する。2013年に発表された調査では、地域在住の65歳以上の高齢者で、男性21.8%、女性22.1%がサルコペニアと診断され、発症頻度の高さが報告されている。

サルコペニア予防の基本は、栄養と運動の両面による筋の維持・増強である。しかし、これらに加え考慮すべき問題が存在する。サルコペニアの成因は複雑であり、さまざまな要因が関係し、高齢者の慢性炎症やたんぱく質合成能の低下なども含まれる。特に、慢性炎症については、サルコペニアの発症・進行との関係で特筆すべきであり、炎症の程度と筋肉減少量との関係が報告されている。しかし、サルコペニアに伴う炎症について、特に栄養面を関連付けた研究は見られない。

当申請の代表研究者（佐々木）は、牛乳中の乳清たんぱく質およびその分解ペプチドが炎症を強力に抑制することを見出した。この特性を応用して開発した炎症抑制効果を持つ栄養食品（流動食「メイン」、㈱明治）は臨床の現場で用いられている。内科領域では、COPD患者の慢性炎症の抑制や栄養状態の改善の効果が確認されている。また、外科領域では急性炎症や感染症罹患率の抑制が認められている。ともに、乳清たんぱく質は良質のたんぱく質供給源であると同時に、炎症を抑制する機能素材として働くことを示す結果である。

2. 研究の目的

当研究は、炎症を抑制する効果が動物および臨床レベルで確認された乳清たんぱく質分解ペプチドを、サルコペニアの予防・改善のための栄養療法に応用することを目指す。

当課題では、同ペプチドが、骨格筋の炎症を抑制し、また同時に筋たんぱく質合成を促進するかについて、動物モデルを用いて確認し、サルコペニアに対応した栄養療法の科学的基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 乳清たんぱく質分解ペプチド

乳清たんぱく質をたんぱく質分解酵素で分解し、限外濾過で得た濾液を噴霧乾燥した標品を乳清たんぱく質分解ペプチド（乳清ペプチド）として用いた。ゲル濾過法により求めた乳清ペプチドの平均分子量は、1,025Daであった（図1）。

2) 動物

マウス（C57BL/6、オス、6週齢（チャールズリバー））を用いた。

3) 飼育飼料

マウス用飼料AIN-93G中のたんぱく質源と

してカゼイン分解ペプチドまたは乳清ペプチドを20%（重量）配合し飼料として用いた（表1）。それぞれの飼料を、AIN-93G（CP）、AIN-93G（WP）とする。

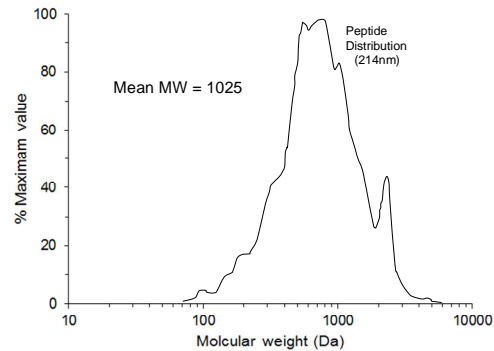


図1. 乳清ペプチドの分子量分布
ゲル濾過法による分析

表1. 飼料組成

成分	含有量（重量%）	
	AIN-93G (CP)	AIN-93G (WP)
カゼイン分解ペプチド	20	—
乳清たんぱく質分解ペプチド	—	20
L-シスチン	0.3	0.3
コーンスターチ	39.7	39.7
α-コーンスターチ	13.2	13.2
スクロース	10	10
大豆油	7	7
セルロースパウダー	5	5
AIN-93G ミネラル混合	3.5	3.5
AIN-93G ビタミン混合	1	1
重酒石酸コリン	0.3	0.3
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014
計	100	100

4) 骨格筋炎症・障害モデル

マウスの左脚腓腹筋にカルディオトキシン（CTX）（Sigma）を筋注することにより、骨格筋障害を誘発した。CTXは、コブラ毒に含まれるペプチド（分子量6,693Da）であり、骨格筋のNa/K ATPaseを阻害し骨格筋細胞に障害を誘発する。CTX投与量は、10μM/リン酸緩衝液溶液の100μLとした。

5) 骨格筋逸脱酵素の測定

CTX投与後にヘパリン存在下に採取した血液より血漿を採取し、富士ドライケム（3500V、富士フィルム）を用い活性を測定した。

血中炎症性サイトカインの測定

6) 各サイトカイン用のELISAアッセイキット（Quantikine ELISA Kit、R&D Systems）を用い血漿中の濃度を測定した。

7) RNA抽出

マウス腓腹筋を摘出し、組織保存液RNA Later（Ambion社、米国）に浸漬しRNA抽出まで冷凍保存した。RNA抽出には、RNA抽出キット（ReliaPrep RNA Tissue Miniprep、Promega）を用いた。

8) Real-Time PCR

抽出RNAから、逆転写酵素（ReverTra Ace、東洋紡）を用いサーマルサイクラー（GeneAmp

PCR System 9700、Applied Biosystems) 上で逆転写し cDNA を得た。目的遺伝子のプライマーを用い、RealTime PCR System 7300 (Applied Biosystems) 上で増幅し、遺伝子発現レベルを測定した。PCR 用酵素は、KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いた。

9) ウェスタンブロットング

腓腹筋 (5mg) からたんぱく質をプロテアーゼ・ホスファターゼ阻害剤存在下に抽出し、遠心分離 (4、15,000rpm、10分) により得られた上清を SDS 電気泳動試料緩衝液で 1mg/mL 濃度に調整し、冷凍保存した。10 μg のたんぱく質を電気泳動後、SDS-PAGE 中のたんぱく質を PVDF 膜にセミドライ法により転写した。転写後、抗 mTOR 抗体、抗リン酸化 mTOR 抗体 (Cell Signaling, USA) を用いて、mTOR およびリン酸化 mTOR を検出した。検出した mTOR、リン酸化 mTOR の相対的たんぱく質量を、画像解析ソフトウェア (Image-J) を用いて測定した。

4. 研究成果

1) 骨格筋損傷および炎症を再現する動物モデルの構築

カゼインをたんぱく質源とした通常の精製飼料 (AIN-93G) で飼育したマウスの左脚腓腹筋に 100 μL の 10 μM CTX (リン酸緩衝液溶液) を筋注し、骨格筋障害を誘発した。

CTX 投与前の腓腹筋は対照 (Day 0) として使用し病理組織標本を作製した。病理組織標本の観察では、CTX 投与 1 日後に骨格筋の傷害が誘発されたことが確認された。傷害により筋細胞が消失し細胞を取り巻く細胞間組織のみが保持されている状態が観察された。また傷害部位と残余骨格筋との境界が不明瞭な部位が観察された (図 2、Day 1)。

CTX 投与 3 日後には、筋細胞が消失した部位に細胞間組織は残るものの、残余筋細胞との境界は明瞭になっていた (図 2、Day 3)。CTX 投与 5 日後には、傷害部位と筋細胞の境界部位に線維質の組織形成が観察された (図 2、Day 5)。

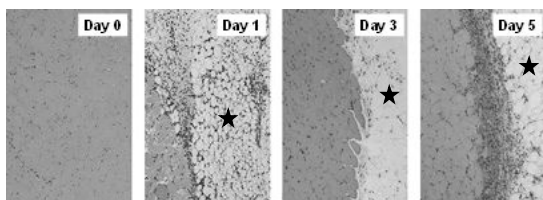


図 2. CTX 投与後の筋損傷の病理学的観察像
星印：骨格筋損傷部位

これらの観察像から、CTX 投与 1 日以内に筋が傷害され、投与 3 日後には損傷部位の修復が開始しているものと考えられる。投与 5 日後には、修復過程の進行が観察された。

これらの結果から、筋損傷の過程を観察するには、CTX 筋注後 1 日以内の観察時間が適していると考えられた。

2) 骨格筋損傷・炎症に対する乳清ペプチドの効果についての検討

CTX 筋注により誘発した筋損傷の 24 時間以内の変化を、血中の筋逸脱酵素 (クレアチンキナーゼ (CPK)、乳酸脱水素酵素 (LDH)) により観察した。カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群を摂取した群で、CPK、LDH とともに有意に低いレベルで推移することを確認した (図 3)。

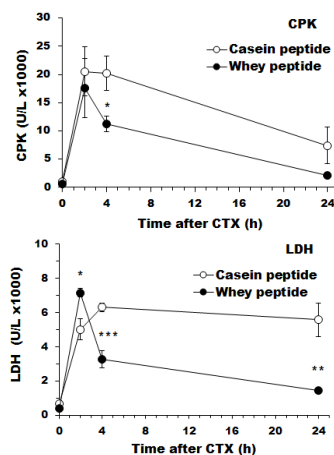


図 3. CTX 投与後の血中骨格筋逸脱酵素の変化
(* : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)

炎症発症に関係する炎症性サイトカインの血中濃度を測定し、炎症発症過程を解析した。その結果、カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群では IL-6 は有意に低いレベルであった。一方、TNF-α レベルは、両群とも CTX 筋注後の上昇は認められなかった (図 4)。

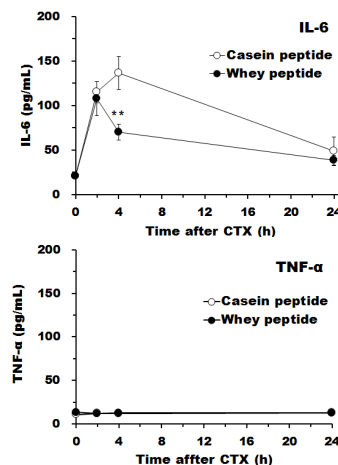


図 4. CTX 投与後の血中炎症性サイトカイン濃度の変化 (** : p<0.01)

血中のサイトカインと比較し、サイトカイン遺伝子の発現パターンは異なる様相を示した。CTX 投与後の骨格筋の IL-6 遺伝子の発現は、血中 IL-6 とは異なる時間推移を示し、乳清ペプチド摂取群でより顕著な低下を示した。一方、TNF-α 遺伝子の発現は、全時間で IL-6 の場合よりも低い値で推移したが、乳清ペプチド摂取群の TNF-α 遺

伝子の発現レベルは、カゼインペプチド摂取群と比較し、有意に低い結果となった(図5)。

CTX 投与後の腓腹筋の炎症性サイトカインの遺伝子発現の解析結果は、血中濃度とは異なり、IL-6 および TNF- α とともに、乳清ペプチド摂取により遺伝子発現レベルが低下すること、すなわち、炎症レベルが抑制されたことを示している。

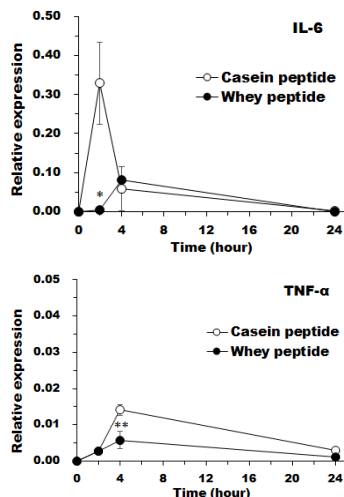


図5. CTX 投与後の骨格筋の炎症性サイトカイン遺伝子の発現の変化 (* : p<0.05、** : p<0.01)

病理組織学的観察および生化学的測定値の結果は、CTX 投与後数時間以内に骨格筋が損傷され、同時に炎症反応が誘発されることを示している。乳清ペプチドは、この時間軸で発生する筋障害および炎症の両反応を抑制する効果を持つことが明らかになった。

3) 骨格筋のたんぱく質合成能に対する乳清ペプチドの効果についての検討

カゼインペプチド摂取群と乳清ペプチド摂取群の体重変化と摂取飼料量を比較した。

飼育7日後のマウス平均体重に有意な差は見られなかった。飼料摂取量と摂取エネルギー量に有意な差が見られた。カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群は、有意に少ない飼料摂取量(エネルギー量)であった(表2)。乳清たんぱく質は、カゼインよりもエネルギー効率が高いと考えられる。

表2. マウスの体重と飼料摂取量

	AIN-93G (CP) 摂取群	AIN-93G (WP) 摂取群
体重平均値 (g)	21.7 \pm 0.37	22.0 \pm 0.25
飼料摂取量 (g/日/匹)	4.3 \pm 0.29	3.1 \pm 0.17 **
摂取エネルギー量 (kcal/日/匹)	17.1 \pm 1.17	12.3 \pm 0.68 **

平均 \pm SE ** : p<0.01

mTOR (mammalian target of rapamycin) は、細胞のたんぱく質合成や細胞質の機能維持の中心的制御因子である。mTOR 複合体はサブユニット構成が異なる2種類が存在し、mTOR Complex 1 (mTORC1) と mTOR Complex 2 (mTORC2) と呼ばれる。mTOR は、mTOR 本体のたんぱく質がリン酸化されることにより活性化される。

mTORC1 は、たんぱく質合成を制御し、Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) を特異的サブユニットとして構成される。mTORC2 は、細胞機能や代謝を制御し、Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) を特異的サブユニットとして構成される。mTORC1 の検出には、Raptor を、mTORC2 の検出には Rictor を指標とした。

カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群では、腓腹筋の mTOR 本体の遺伝子発現レベルは、有意に高い結果であった(図6)。Raptor (mTORC1 のサブユニット) の遺伝子発現レベルは、カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群で高い結果であった(図1b)。一方、Rictor (mTORC2 特異的サブユニット) の遺伝子発現レベルは、カゼインペプチド摂取群と乳清ペプチド摂取群との間で、差は認められなかった(図6)。すなわち、乳清ペプチドを摂取したマウスの骨格筋では、mTORC1 の発現が高まり、たんぱく質合成が促進されていると考えられる。

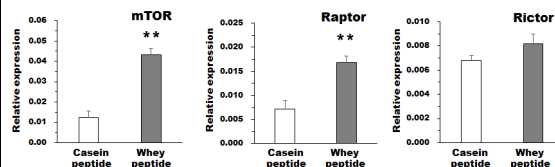


図6. mTOR、mTORC1 (Raptor)、mTORC2 (Rictor) の発現量の比較 (** : p<0.01)

mTOR およびリン酸化 mTOR の相対的たんぱく質量を、それぞれのたんぱく質に特異的な抗体を用い検出した。検出した mTOR の相対的たんぱく質量を比較した結果、カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群の mTOR 検出量が有意に高かった(図7)。また、カゼインペプチド摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群のリン酸化 mTOR の検出量も高かった(図7)。

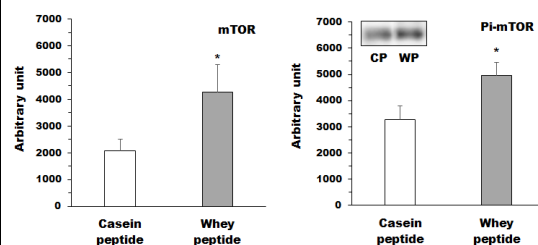


図7. mTOR、リン酸化 mTOR (Pi-mTOR) のたんぱく質量の比較 (* : p<0.05)

飼料摂取期間3日と7日後のmTOR遺伝子発現量をした結果、乳清ペプチドの効果が現れるには、7日間の摂取が必要であった。3日間の摂取では、乳清ペプチドによる腓腹筋のmTOR遺伝子の発現促進効果は現れなかった(図8)。

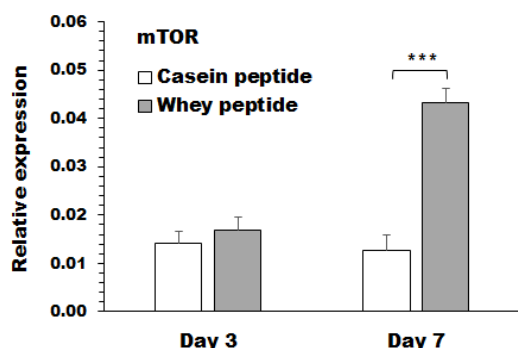


図8. 飼料摂取期間の相違によるmTOR発現量の変化 (***) : p<0.001)

骨格筋のmTOR、Raptorの遺伝子発現量は、WP摂取群において有意に高い値を示した。また、mTORたんぱく質量も乳清ペプチド摂取群において高い値を示し、リン酸化mTORたんぱく質量も乳清ペプチド摂取群において高い値を示した。すなわち、乳清ペプチド摂取群のマウスの骨格筋では、mTORC1を介してたんぱく質合成が促進されていると考えられる。

従来は、レジスタンス運動後の乳清たんぱく質摂取により、運動により促進された骨格筋たんぱく質合成がさらに促進されることが報告されてきた。レジスタンス運動負荷後の投与は、単回投与によるもので、一時的なたんぱく質合成促進効果(急性効果)である。

今回の実験結果は、乳清たんぱく質の一定期間(7日)の摂取により、レジスタンス運動などの負荷を受けていない骨格筋において、たんぱく質合成が促進された状態に変化することを示している。すなわち、乳清たんぱく質が、たんぱく質合成を促進する体質に変化させる効果を持つと考えられる。

サルコペニアは、高齢者の加齢性筋減弱症であり、加齢に伴うたんぱく質合成抑制と慢性炎症が、その発症と進行に関係すると考えられている。そのため、サルコペニアの予防と進行遅延には炎症抑制およびたんぱく質合成促進が必要である。

当研究の目標は、サルコペニア対応食品を開発し、栄養療法の立場から高齢者の慢性炎症を抑制し、同時にたんぱく質合成能を改善することである。

今回得られた研究結果は、乳清たんぱく質分解ペプチドが、サルコペニアの発症と進行の抑制に必要な上記の要件を満たしていることを示しており、当初の目的とした

サルコペニアに対応した栄養食品の科学的基盤を提供するものである。

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)

[発表論文] (計3件)

1. Hajime Sasaki (2019). Consecutive-day intake of whey protein upregulates mTOR mRNA and protein expression in resting skeletal muscle of mice. *Food Nut Sci.* 10:1035-1044.
Doi:10.4236/fns.2019.109074.
2. Hajime Sasaki (2019). Whey protein intake modulates lipid metabolism by transcriptionally affecting PPARs and SREBP1c and their downstream enzymes in mice. *Food Nut Sci.* 10. 1045-1055.
Doi:10.4236/fns.2019.109075.
3. Hajime Sasaki (2017). Protective effect of ethanolamine on hepatic preneoplastic alterations induced by the administration of N-nitrosodiethylamine in rats. *Food Nut Sci.* 8:936-945.
Doi:10.4236/fns.2017.810067

[産業財産権](計1件)

出願状況

名称: サルコペニアの予防改善用栄養組成物

発明者: 佐々木 一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-013702

出願年月日: 平成 30 年 1 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 一 (SASAKI, Hajime)

神奈川工科大学、栄養生命科学科・教授

研究者番号: 80747634