

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15379

研究課題名(和文)急性期筋萎縮時の脂質メディエーター網羅的解析とその制御

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of lipid mediators in acute muscle atrophy

研究代表者

三好 真琴(Miyoshi, Makoto)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：50433389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性筋萎縮モデルラットにおける骨格筋からの脂質メディエーター産生を網羅的に解析した。エンドトキシン(LPS)投与前には長趾伸筋よりヒラメ筋で脂質メディエーターが全体的に高濃度で、特にアラキドン酸由来炎症性代謝物PGE2、PGF2、EPA由来抗炎症性代謝物レゾルビンRvE3は有意であった。炎症収束性代謝物のRvD5とプロテクチンD1はヒラメ筋のみで測定可能であった。LPS投与後はいずれの筋でもPGE2が増加しており、筋萎縮への関与が示唆される。酪酸のprodrugであるトリブチリン経口投与は、LPS投与後に増加したLTB4産生を抑制しており、トリブチリンの筋萎縮抑制効果への関与が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋中の脂質メディエーター解析とそれを根拠にした研究が、侵襲下の急性期筋萎縮にとどまらず、多様な慢性病変や運動時などの広範な筋萎縮の病態や予防・治療法へ発展することが想定される。また、トリブチリンは食品成分であるため、安全に、しかも日常的に摂取することができ、サルコペニアを介する各種病態での予後改善にも作用しうると考えられ、幅広い臨床応用への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Polyunsaturated fatty acids and all lipid mediators measured were higher in soleus muscles than in extensor digitorum longus, especially pro-inflammatory prostaglandin (PG) E2 and anti-inflammatory resolvin (Rv) E3 ( $p < 0.01-0.05$ ) before lipopolysaccharide (LPS) injection. The anti-inflammatory lipid mediators from DHA, RvD5 and protectin D1, were only detected in soleus muscles. LPS injection changed lipid mediators, PGE2 were increased at 6 h after LPS injection in both muscles ( $p < 0.01$ ). The increased PGE2 may affect muscle atrophy. Tributyrin, a prodrug of butyrate, suppressed LPS-induced leukotriene B4 (LTB4). Oral tributyrin administration also improved LPS-induced muscle atrophy. Tributyrin may improve muscle atrophy through suppressed LTB4 in endotoxemic rats.

研究分野：農学

キーワード：筋萎縮 脂質メディエーター トリブチリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、急性の重症病態回復後に認められる筋力低下 intensive care unit acquired muscle weakness (ICU-AW)に対する骨格筋異化を抑制する介入の必要性が検討されている。急性炎症下では、運動は不可能であり、薬物と栄養投与による筋萎縮予防が重要である。Cyclooxygenase (COX)により生成する prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> 等の脂質メディエーターは運動負荷後の骨格筋萎縮に作用するとされるが、急性炎症下の骨格筋における脂質メディエーターの動態は不明である。また、骨格筋は lipoxygenase (LOX)の高発現臓器であり、LOX 由来脂質メディエーターは骨格筋機能調節に関与すると想定されるが、全く検討されていない。

トリブチリンは短鎖脂肪酸の中でも特に生理活性の高い酪酸の prodrug であり食品成分でもある。我々はこれまでに、酪酸による LOX 活性変化と脂質メディエーターを介した腸粘膜上皮の透過性抑制、炎症下末梢血単核球からの PGE<sub>2</sub> 産生を介した TNF-α 産生抑制など *in vitro* での脂質メディエーター変化を報告している。*in vivo* の実験では、トリブチリンを経口投与すると、血中酪酸濃度が *in vitro* での有効域にまで増加し、肝障害と脂質代謝異常を顕著に改善することを明らかにした。従って、トリブチリンは脂質メディエーターの制御を介して急性炎症下の筋萎縮を軽減できる可能性が想定され、本研究は酪酸の新しい生理活性研究に発展するものと考えられ学術的価値を有する。

### 2. 研究の目的

- (1) エンドトキシン投与による急性炎症下の骨格筋における脂質メディエーターの経時的な変動を網羅的解析により明らかにする。タイプ I 筋線維とタイプ II 筋線維を解析し、2 種の筋線維を比較する。
- (2) トリブチリン経口投与による脂質メディエーター変化を明らかにする。トリブチリンの有効性を検討することにより、ICU-AW を予防し、予後の改善を目指す。

### 3. 研究の方法

いずれの実験系も Wistar 系雄性ラットを使用した。

(1) 急性炎症下の骨格筋脂質メディエーターの経時的な変化  
エンドトキシン(LPS; lipopolysaccharide)10 mg/kg を腹腔内投与し、0, 6, 24 時間後に犠死せしめた。筋線維タイプの差を想定し、タイプ I 線維が主のヒラメ筋 (Soleus、遅筋) とタイプ II 線維が主の長趾伸筋 (EDL、速筋) を採取した。脂質メディエーターは LC-MS/MS を用いて経時的かつ網羅的に解析した。また、脂質メディエーターの原料となるリン脂質中の遊離脂肪酸は GC-MS 法にて測定した。なお、筋萎縮の程度を筋蛋白分解と合成の両経路から評価した。

(2) トリブチリン経口投与による脂質メディエーター変化  
トリブチリン 1.0 g/kg の経口投与後、LPS を腹腔内投与し、エンドトキシン血症を誘発した。(1)と同様に、LPS 投与後 0, 6, 24 時間後にヒラメ筋と長趾伸筋を採取し、脂質メディエーターおよび遊離脂肪酸濃度を測定し、また筋萎縮の程度を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 急性炎症下の骨格筋脂質メディエーターの経時的な変化  
多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)のいずれもヒラメ筋では EDL よりも 3~6 倍と顕著に高値であった( $p < 0.05 \sim 0.01$ 、図 1)。各遊離脂肪酸もヒラメ筋で高濃度であった。脂質メディエーター濃度はヒラメ筋で高く、特に AA 由来炎症性脂質メディエーターである PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、EPA 由来抗炎症性脂質メディエーターであるレゾルビン(Rv) E3 は有意に高濃度であった( $p < 0.05 \sim 0.01$ 、図 2, 3)。また、DHA 由来の炎症収束性代謝物 RvD5 とプロテクチン D1 はヒラメ筋のみで測定可能であった(図 4)。

LPS 投与後には、AA、EPA、DHA はヒラメ筋で減少していた( $p < 0.05 \sim 0.01$ 、図 1)。脂質メディエーター濃度は、両筋繊維で PGE<sub>2</sub> の増加が特徴的であった ( $p < 0.01$ 、図 2)。PGE<sub>2</sub> は 6 時間で増加し、24 時間後も同様の値であった。PGE<sub>2</sub> 以外の脂質メディエーターは増加せず、減少するかあるいは変化しなかった。

LPS 投与後の AA、EPA、DHA の減少と脂質メディエーター産生増加の関連が示唆される。また、LPS 投与後 6 時間で筋萎縮に関連するユビキチンリガーゼである atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 発現は増加しており、エンドトキシン血症の早期から筋萎縮が生じることも明らかにしており、骨格筋における PGE<sub>2</sub> 増加の筋萎縮への関与が示唆される。

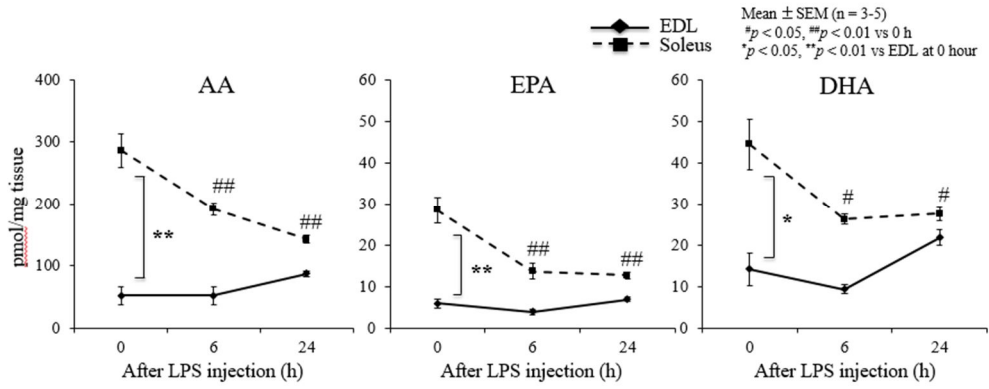


図1. 多価不飽和脂肪酸濃度

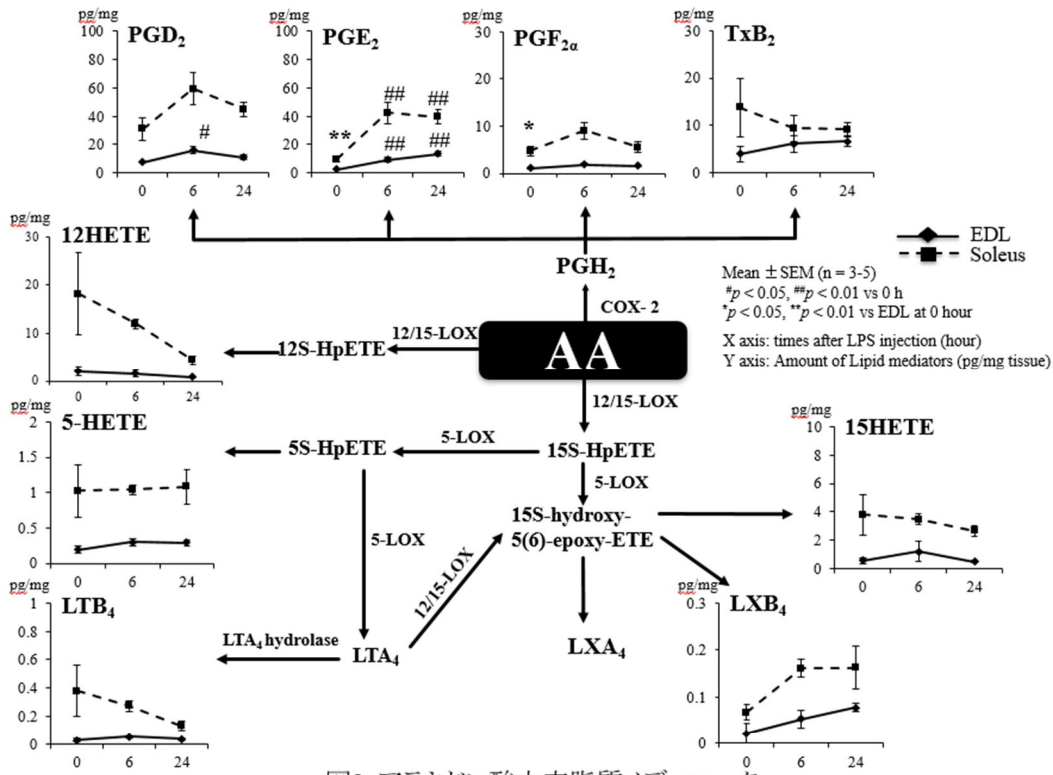


図2. アラキドン酸由来脂質メディエーター

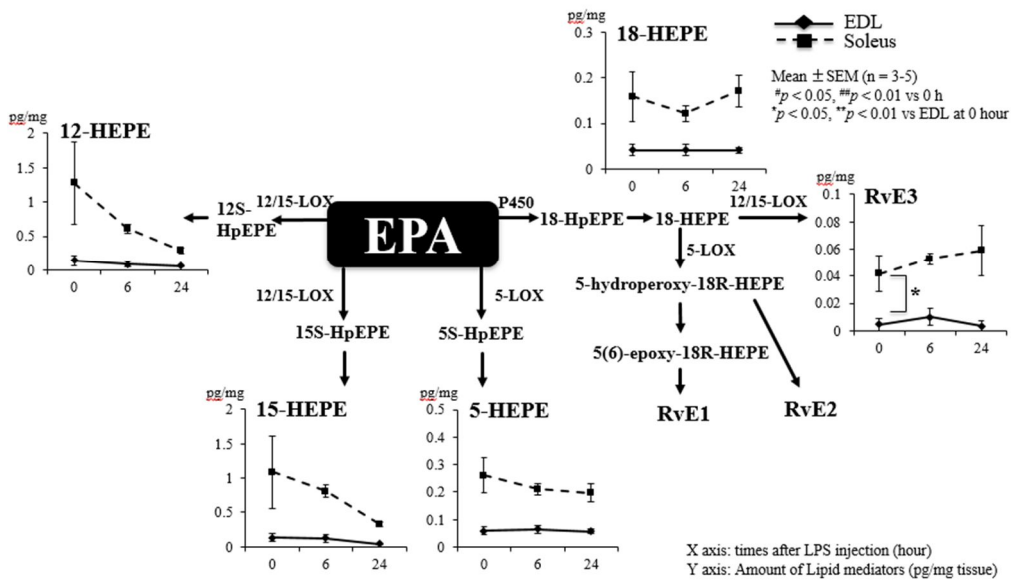


図3. エイコサペンタエン酸由来脂質メディエーター

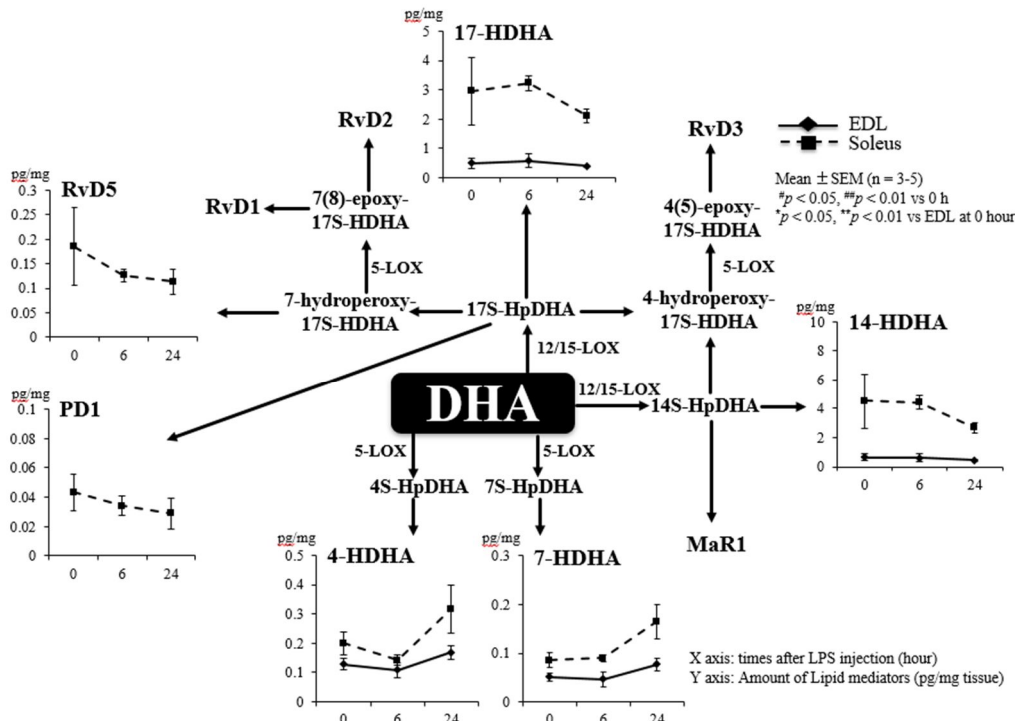


図4. ドコサヘキサエン酸由来脂質メディエーター

## (2) トリブチリン経口投与による脂質メディエーター変化

トリブチリンは、両筋繊維での AA 由来の leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) と EPA 由来の 5-HEPE を抑制したが ( $p < 0.05 \sim 0.01$ )、その他の脂質メディエーター変動には効果が無かった。トリブチリンの筋萎縮への効果として、LPS により増加した atrogin-1 と MuRF1 mRNA 発現を抑制し、筋横断面積の減少を軽減する結果も得ている。今回は定量性のある介入法としてトリブチリン投与を選択したが、酪酸は腸内細菌叢によって生成され、腸内細菌叢による宿主への病態改善効果に敷衍できる研究結果と解釈される。

以上より、多価不飽和脂肪酸濃度が筋繊維タイプによって異なることが明らかになり、またエンドトキシン誘発急性炎症の 6 時間という早期からの脂質メディエーター変化が明らかになった。本モデルでの筋萎縮を確認しており、脂質メディエーター変化との関連が示唆される。炎症性脂質メディエーターの PGE<sub>2</sub> と筋萎縮との関連は運動後、筋虚血、除神経の病態で報告されているが、今回明らかにしたタイプ 繊維のヒラメ筋で高値であった抗炎症性脂質メディエーターの RvE3, RvD5, プロテクチン D1 の関与は病態によって大きく異なるものと想定される。また、酪酸製品に含まれるトリブチリンによる LTB<sub>4</sub> 産生抑制と筋萎縮の抑制を明らかにすることもできた。今後、脂質メディエーターがどのように筋萎縮に作用するのかを解析していく必要がある。全身性炎症反応は、癌、心不全、外傷、火傷、出血、各種の臓器不全などの多くの疾患における筋萎縮の発生に中心的な役割を果たしている可能性があり、骨格筋における脂質メディエーター変化の同定は、二次性筋萎縮の病因解明と新しい予防と治療法の開発につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto Miyoshi, Yuya Nishiyama, Motoki Kai, Noriaki Maeshige, Masakazu Shinohara, Yuri Fueda, Makoto Usami
2. 発表標題 Soleus muscle contains higher lipid mediators than extensor digitorum longus: slow/fast fiber-specific analysis in endotoxemia using LC-MS/MS
3. 学会等名 The 41th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好真琴、西山雄也、甲斐元規、前重伯壮、篠原正和、宇佐美眞
2. 発表標題 エンドトキシン血症下の骨格筋における脂質メディエーター変化
3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好真琴、西山雄也、甲斐元規、前重伯壮、宇佐美眞
2. 発表標題 Tributylin経口投与によるエンドトキシン血症誘発筋萎縮抑制効果は骨格筋により異なる
3. 学会等名 第33回日本静脈経腸栄養学会学術集会（パシフィコ横浜）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----