

脂肪蓄積による筋障害に対する大豆イソフラボンダイゼイン
の効果とサルコペニア肥満への応用

お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系

飯田 薫子

近年、世界規模での高齢化進展に伴い、サルコペニアの罹患者数が増加している。サルコペニアとは加齢に伴い筋肉量、体力、身体能力が低下する状態で、European Working Group of Sarcopenia (EWGSOP)において骨格筋量・骨格筋力の低下を特徴とすると定義され(1)、要介護状態に至る重要な要因となる。さらに世界的に肥満の有病率が増加していることから、サルコペニアと肥満を合併した「サルコペニア肥満」の罹患者数もまた急速に増加している(2)。サルコペニア肥満では、肥満によって骨格筋への異所性脂肪沈着が生じ、筋内脂肪組織・筋内脂質代謝物がミトコンドリア脂肪酸酸化の障害、酸化ストレスの増加などを引き起こし、骨格筋の脂肪毒性、インスリン抵抗性、炎症を促進し、筋蛋白質分解や筋細胞死を生じることでサルコペニア病態が加速するとされる(2, 3)。

一方、大豆製品はヒトや動物モデルにおいて抗炎症作用を呈することなどが報告され、その高いたん白質含量と共にサルコペニアへの応用性が期待されるが、その効果やメカニズムについては未だ十分に検討がなされていない。我々はこれまで、大豆イソフラボンの一種 daidzein が筋細胞において、脂質酸化関連遺伝子の発現制御を担う転写因子 ERRA (estrogen-related receptor- α)を活性化し、脂質酸化関連遺伝子の発現を介して細胞内脂質蓄積を軽減することを明らかとしてきた(4)。このことから、大豆イソフラボンが筋内への脂質蓄積を改善し、サルコペニア肥満病態を改善することが予想される。

そこで本研究では daidzein 以外のイソフラボンの脂質酸化関連遺伝子発現に対する効果を検討するとともに、肥満サルコペニア動物モデルを作製し、daidzein が脂質蓄積による筋の病的変化に与える影響について検討した。

実験方法

1) 試薬、細胞、動物

Daidzein, genistein, biochanin A, formononetin, glysitein は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より入手した。マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞は、RIKEN Cell Bank (茨城) より入手した。6 週齢の雄性 C57BL6J マウスは三協ラボサービス (東京) より入手した。

2) 細胞培養条件

細胞実験には、C2C12 細胞を分化させた筋細胞を用いた。C2C12 細胞がコンフルエントに達した後、2%ウマ血清を含む DMEM 培地で培養することにより分化誘導を行い、分化 5 日目の細胞を実験に用いた。分化した筋細胞に各種イソフラボンを 24 時間負荷したのちに、セパゾール（ナカライテスク, 京都）を用いて RNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型にリアルタイム PCR を行い、遺伝子の発現量を比較した。

3) 肥満筋萎縮モデルマウスの作製

マウスを 2 群に割り付け、高糖高脂肪食を 12 週間投与することにより肥満を誘導した。さらに筋萎縮を誘導するために実験 12 週目にイソフルラン吸入麻酔下で、全マウスの右下肢に坐骨神経切除を行った。左下肢には皮膚のみを切開・縫合する偽手術を施した。その後、1 群はそのまま高脂肪高糖 (High-fat high-sucrose) 食にて飼育を継続し(HFHS 群, n=8)、もう 1 群のマウスには 0.2%w/w の daizein を添加した高脂肪高糖食を投与した (Daid 群, n=8)。2 週間の飼育後、下腿筋（ヒラメ筋、腓腹筋）を採取し解析に用いた。

4) 筋横断面積測定

マウス腓腹筋凍結切片を作製し、一次抗体に抗 laminin 抗体(Sigma-Aldrich, 東京)、抗 myosin heavy chain I 抗体 BA-F8、抗 myosin heavy chain II 抗体 SC-71(共に Development Studies Hybridoma Bank)を使用し、二次抗体に Alexa Fluoro488 で標識した抗ウサギ IgG 抗体もしくは Rhodamine で標識した抗ヤギ IgG 抗体(共に Life Technologies)を用いて蛍光免疫染色を行なった。蛍光顕微鏡 (BZ-X7000, キーエンス, 東京) を用いて、各組織切片あたり無作為に 5 視野を選択し、視野内の筋線維の横断面積を顕微鏡付属の専用ソフトウェアで計測した。

5) 遺伝子発現解析

マウスヒラメ筋組織よりセパゾール（ナカライテスク, 京都）を用いて RNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型にリアルタイム PCR

を行い、各種遺伝子の発現量を比較した。データは HFHS 群の偽手術側の発現量を 1 とした際の発現量を相対値で示し、2 群間の発現量を比較した。

6) タンパク質発現解析

マウス前脛骨筋組織をタンパク抽出バッファー中でホモジナイズし、遠心した上清をタンパク質サンプルとして得た。サンプルは Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (ナカライテスク) で希釈し、95°Cで5分加熱したのち、SDS-PAGE ゲル上で泳動・分離した。その後 PVDF 膜(GE Healthcare)に転写し、一次抗体として抗 LC3B 抗体、二次抗体に HRP で標識した抗ウサギ IgG 抗体(共に Cell Signaling Technology, MA, USA)を用いてインキュベーションし、ECL Prime Western Blotting Detection System(GE healthcare)を用いてタンパク量を可視化した。

7) 統計処理

統計解析には SPSS Ver.24 (日本 IBM, 東京) を用いた。細胞実験における群間の検討にはスチューデントの T 検定を、動物実験における群間の検討には二元配置分散分析を用いた。有意水準は 0.05 とした。

実験結果

1) 筋細胞の遺伝子発現に与えるイソフラボンの効果

イソフラボンの負荷濃度について MTT 試薬を用いた毒性試験を行い、daidzein, genistein, biochanin A については 50 μ M, formononetin, glycitein については 12.5 μ M の濃度で負荷することとした (データ未掲載)。各イソフラボンを筋細胞に負荷した結果、daidzein, genistein 負荷により ER α の代表的な標的遺伝子である pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) および medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) の遺伝子発現が有意に増加した。また biochanin A では有意差はなかったものの、PDK 4 の発現が上昇する傾向が認められた。一方で、formononetin, glycitein の負荷では、これらの遺伝子発現に有意な差は認められなかった (図 1)。

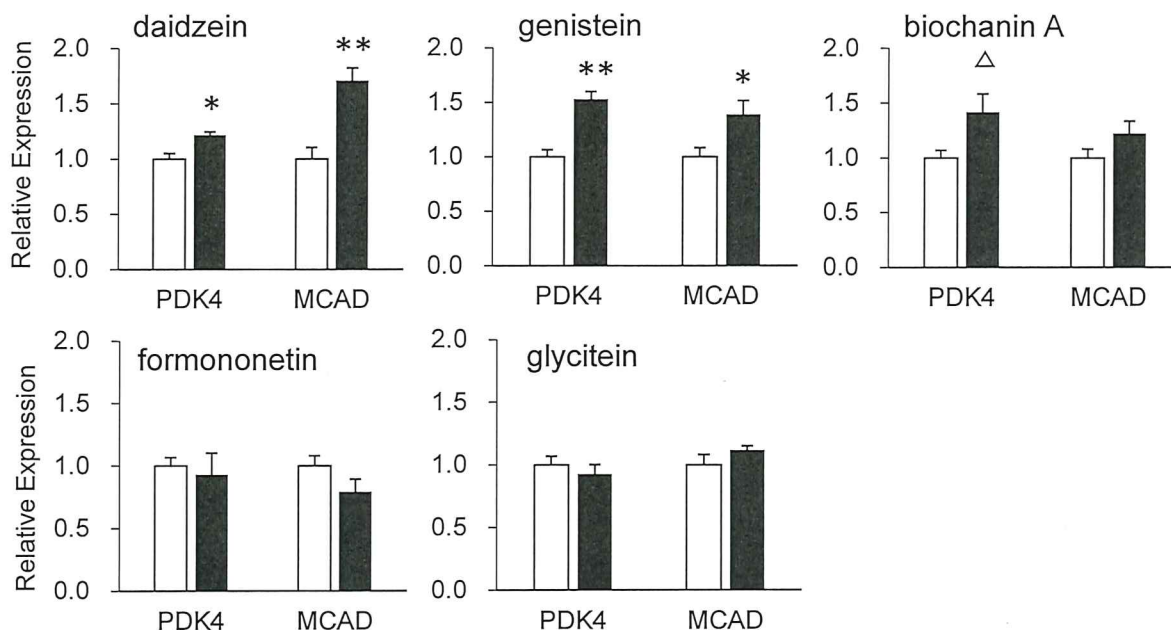


図 1. イソフラボンが筋細胞の脂質代謝関連遺伝子に与える影響。

□, Control; ■, Isoflavone. Mean ± S.E. ^, P<0.1; *, P<0.05; **, P<0.01 vs Control. PDK4, Pyruvate dehydrogenase kinase 4; MCAD, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase.

2) 肥満筋萎縮モデルマウスの体重に対する daizein の効果

実験期間における各群のマウスの体重を図 2 に示した。高脂肪高糖食摂取により、実験 12 週まで、マウスの体重は順調に増加したが、神経切除術後は 2 群とも体重が一貫して減少を示した。HFHS 群と Daid 群との間に有意な体重変化は認められなかった。

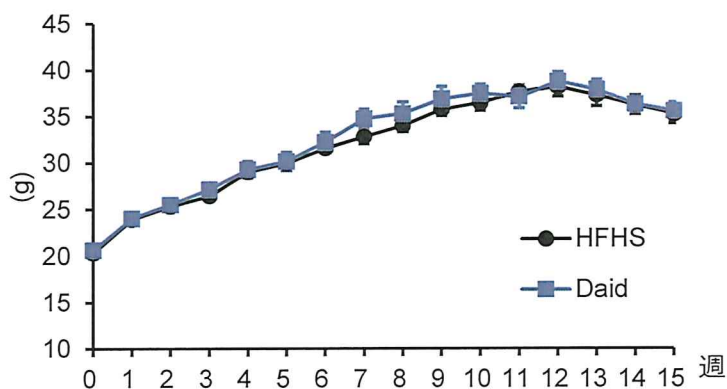


図 2. 実験期間中の体重変化
Mean ± S.E.

3) 肥満筋萎縮モデルマウスの筋横断面積に対する daidzein の影響

2週間の実験終了時における腓腹筋における筋線維の横断面積 (cross sectional area; CSA) を比較した。筋線維タイプ毎に CSA を測定したところ、Daid 群では除神経による I 型筋線維の萎縮の程度が有意に抑制された (図 3)。一方で、II 型線維の萎縮の程度については2群間で有意な差は認められなかった (結果未掲載)。

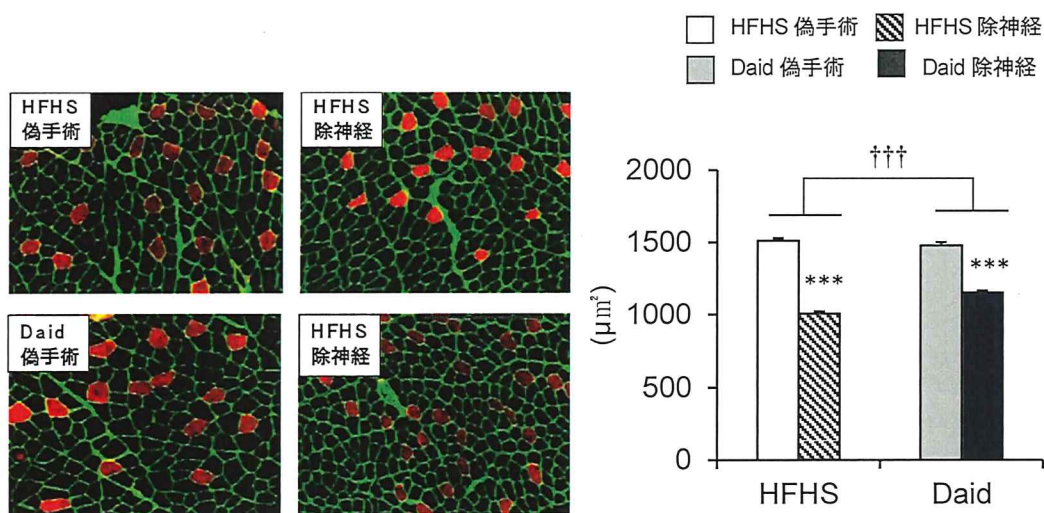


図 3. Daidzein が肥満筋萎縮モデルの I 型筋線維萎縮に与える影響.

Mean ± S.E. ***, P<0.0001 vs 偽手術群 ; †††, P<0.0001 vs HFHS 群

4) 肥満筋萎縮モデルマウスの筋遺伝子発現に対する daizein の効果影響

実験終了時のヒラメ筋における遺伝子発現量を検討した。脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子などの発現について広く検討を行なったが、HFHS 群と Daid 群との間にこれらの遺伝子発現に有意な差は認めなかった (データ未掲載)。一方で、アポトーシス経路の関連遺伝子について検討をおこなったところ、daidzein はアポトーシス経路を制御する転写因子である Puma の遺伝子発現を有意に抑制した (図 4)。

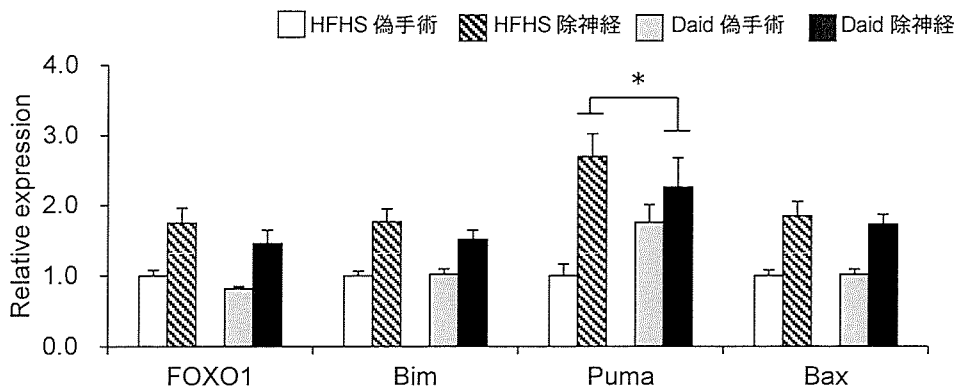
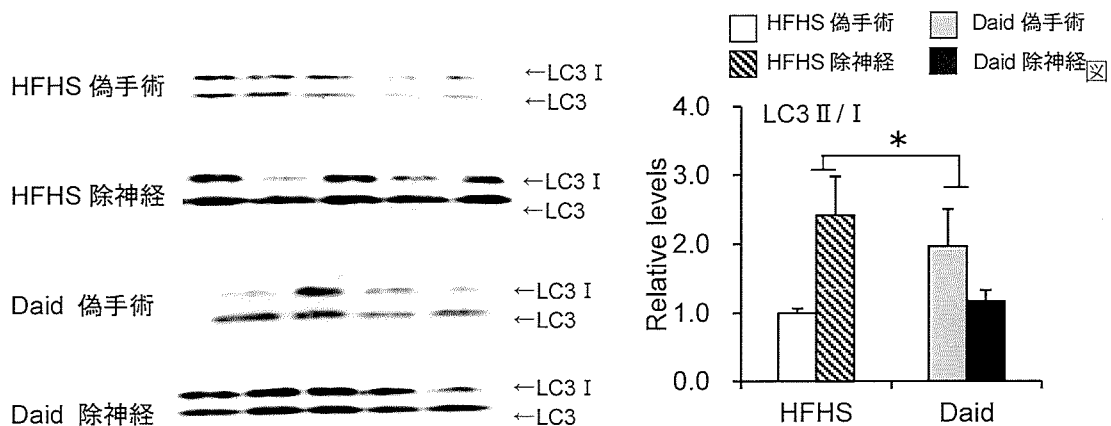


図4. Daidzein が肥満筋萎縮モデルの骨格筋アポトーシス関連遺伝子発現に与える影響.

Mean \pm S.E. *, P<0.05. FOXO1, Forkhead Box 1; Bim, Bcl2 interacting mediator of cell death; Puma, P53 up-regulated modulator of apoptosis; Bax, Bcl-2- associated X protein.

4) 肥満筋萎縮モデルマウスの筋タンパク質分解に対する daizein の効果影響

実験終了時の腓腹筋を用い筋タンパク質分解に関わるシグナル分子の発現量を検討した。タンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム経路に関わる Atrogin1、MuRF1 の遺伝子発現には2群間で有意差は認められなかった (データ未掲載)。一方で、オートファジー経路に関わる LC3 のタンパク質発現を検討したところ、オートファジーの指標となる LC3 II/I の発現比が daidzein で有意に低下していた (図5)。



5. Daidzein が肥満筋萎縮モデルの骨格筋のオートファジーに与える影響

Mean ± S.E. *, P<0.05.

考察

本研究では、各種のイソフラボンが ERR α の代表的な標的遺伝子である PDK4, MCAD の遺伝子発現に与える影響を検討するとともに、イソフラボンの一種である daidzein が肥満モデル動物の筋萎縮に与える影響について検討を行なった。その結果、genistein および daidzein は培養筋細胞において PDK4, MCAD の遺伝子発現を増強すること、また daidzein は肥満筋萎縮マウスの筋組織においてオートファジーを抑制し、I 型筋線維の萎縮を改善する可能性を見出した。

Daidzein を含むイソフラボンはこれまで多くの疫学研究において、糖・脂質代謝の改善や肥満抑制作用をもたらすことが報告されている(5, 6)が、その分子メカニズムは未だ不明の点が多い。我々は先行研究において daidzein が転写因子 ERR α を活性化することにより、骨格筋において脂肪酸酸化に関わる遺伝子の発現を増強し、筋細胞内の脂質蓄積を軽減することを報告してきた(4)。ERR α はその名称の示す通り、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) と類似した構造をもつ核内受容体型転写因子で、心筋や骨格筋に多く発現し、脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の調節に重要な働きを有している(7)。イソフラボン類の ER に対する結合性を検討した先行研究においては、genistein や formononetin が ER への結合活性が強いとされているが(8)、一方で ERR に結合するイソフラボンとしては genistein, daidzein, biochanin A などが報告されている(9)。これらのことから genistein や daidzein はエストロゲン作用とは独立して、ERR α の活性化を介して脂質酸化を改善する可能性が示唆される。

肥満者においては肝臓や骨格筋などに異所性脂肪蓄積が生じ、インスリン抵抗性を介して様々な代謝疾患を引き起こすことが知られる(10)。特に骨格筋へ蓄積した脂肪はインスリン抵抗性ととも炎症や酸化ストレスの原因となり、筋細胞のタンパク分解を生じ、いわゆるサルコペニア肥満の原因となることが明らかとなっている(2)。そこで次に我々

は、daidzein が ER α の活性化を介して筋組織内の脂質蓄積を軽減し、肥満に合併する筋萎縮を改善するかを検討した。げっ歯類は肥満のみでは筋萎縮はきたしにくいいため、今回は食事誘導性肥満マウスに筋萎縮を誘導することとし、サルコペニアのモデルとしても利用される坐骨神経切除(11)を施すこととした。

筋線維の CSA を比較した結果、両群において、神経切除を行った右側腓腹筋の CSA は左側腓腹筋にくらべて有意に低下し、神経切除による萎縮が生じたことが確認された。さらに 2 群間の比較では daidzein の投与が、神経切除による I 型筋線維の萎縮を軽減する可能性が示唆された。筋線維には I 型と II 型の 2 種類があり、I 型筋線維は遅筋線維とも呼ばれ、ミトコンドリアに富み好気性代謝を主とする筋線維である。古典的な研究によると、肥満者においては I 型筋線維の比率低下や萎縮が見られることが知られており(12)、daidzein は肥満により生じる代謝障害としての筋萎縮を軽減する可能性が考えられる。そのメカニズムとして遺伝子発現変化を検討したが、daidzein 投与群では PDK4 や MCAD を含む脂質代謝関連遺伝子の発現には変化が認められず、先行の細胞実験とは異なる結果となった。一方で daidzein 群ではオートファジーマーカーが低下していた。イソフラボンによるオートファジー制御についての報告は数少ないが、近年 daidzein の 8-C-グルコシドである puerarin がラットの心筋障害やラット筋細胞株 L6 細胞においてオートファジーを抑制することが報告されている(13, 14)。これらの結果と今回の報告との類似性は興味深く、今後はそのメカニズムについて検証を行う必要があると考えられた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りましたタカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyere O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(1):16-31.

2. Batsis JA, Villareal DT. Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(9):513-37.
3. Kalinkovich A, Livshits G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev*. 2017;35:200-21.
4. Kitamura K, Erlangga JS, Tsukamoto S, Sakamoto Y, Mabashi-Asazuma H, Iida K. Daidzein promotes the expression of oxidative phosphorylation- and fatty acid oxidation-related genes via an estrogen-related receptor alpha pathway to decrease lipid accumulation in muscle cells. *J Nutr Biochem*. 2020;77:108315.
5. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(6):1191-201.
6. Akhlaghi M, Zare M, Nouripour F. Effect of Soy and Soy Isoflavones on Obesity-Related Anthropometric Measures: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Adv Nutr*. 2017;8(5):705-17.
7. Giguere V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev*. 2008;29(6):677-96.
8. Beck V, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;84(2-3):259-68.
9. Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan YC, Chen S. Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res*. 2003;1(13):981-91.
10. Lara-Castro C, Garvey WT. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(4):841-56.
11. Baek KW, Jung YK, Kim JS, Park JS, Hah YS, Kim SJ, et al. Rodent Model of Muscular Atrophy for Sarcopenia Study. *J Bone Metab*. 2020;27(2):97-110.
12. Wade AJ, Marbut MM, Round JM. Muscle fibre type and aetiology of obesity. *Lancet*. 1990;335(8693):805-8.
13. Tang H, Song X, Ling Y, Wang X, Yang P, Luo T, et al. Puerarin attenuates myocardial hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy via the Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;15(6):3747-54.
14. Chen X, Yi L, Song S, Wang L, Liang Q, Wang Y, et al. Puerarin attenuates palmitate-induced mitochondrial dysfunction, impaired mitophagy and inflammation in L6 myotubes. *Life Sci*. 2018;206:84-92.