

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	小林 恭之
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	Physiological function of dietary oleamide in the regulation of skeletal muscle mass (骨格筋量調節におけるオレアミドの生理機能に関する研究)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	阪本 龍司
	副査	渡邊 義之

## 論文要旨

### 序章

骨格筋は運動機能や姿勢の保持だけでなく、糖や脂質の代謝も担う組織である。現代社会におけるデスクワーク中心のライフスタイルは運動不足を引き起こし、年齢に関わらず骨格筋の量的・質的な低下をもたらす。骨格筋量の低下は運動機能の低下だけでなく、代謝性疾患に罹患するリスクを増大させる。骨格筋量は筋線維におけるタンパク質の合成と分解のバランスで制御されており、運動などの刺激にตอบสนองしてタンパク質の合成の割合が分解を上回るとき、筋線維は肥大し、骨格筋量が増加する。近年、骨格筋の健康を維持する有効な手段として機能性食品成分の活用に期待が寄せられている。摂取された機能性食品成分は吸収後、標的組織に適切な濃度で到達し、作用する必要がある。生体内における食品成分の機能性を正しく理解するために食品成分の吸収過程、代謝機構、生体利用率を考慮した考察が必要である。オレアミド (*cis*-9,10-octadecenamide) は代表的な一級脂肪酸アミドである。オレアミドは生体内で合成され、運動後のラットの骨格筋細胞間質液において濃度が3倍まで上昇する。一方で、オレアミドは食品成分に含まれ、外因的に体内へと取り込まれる。しかし、オレアミドが骨格筋のホメオスタシスを維持する脂質メディエーターとして機能性を発揮するかは不明である。またオレアミドの内因性の血中濃度に関しては統一した見解はなく、さらにオレアミドを外因的に経口摂取した際の吸収過程、代謝機構も不明である。そこで本研究では代表的な一級脂肪酸アミドであるオレアミドの骨格筋量へ与える影響とその詳細な分子機構、さらにオレアミドの腸管における吸収過程と代謝機構について解明することを目的とした。

## 第1章 行動範囲制限マウスで誘発される前脛骨筋萎縮に対するオレアミドの影響

7週齢 ddY オスマウスにおいて内因性のオレアミドの血中濃度は約 30 nM であった。オレアミドを経口摂取した際に外因性と内因性のオレアミドを区別するために、分子量が 2 異なる安定同位体標識オレアミド (SIL-オレアミド) を合成した。SIL-オレアミド (50 mg/kg) をマウスへ経口投与した結果、投与後 1 時間で SIL-オレアミドの血中濃度が約 170 nM に達し、投与後 6 時間まで維持された。したがって、内因性オレアミドの濃度を考慮すると、外因性オレアミドが投与された際のオレアミドの血中濃度は約 200 nM にまで達すると予想された。次に現代人の運動不足なライフスタイルを模倣するために、通常のケージの床面積を 1/6 サイズにしたケージで飼育することで行動範囲を制限したマウスへのオレアミドの投与実験を行った。通常のケージで飼育する control 群、通常のケージの床面積を 1/6 サイズにしたケージで飼育する sedentary 群、sedentary 群へオレアミド (50 mg/kg/day) を経口投与する sedentary-oleamide 群の全 3 群を 4 週間飼育した。飼育期間中に全身の運動性を示すマウスの前肢の握力を測定した結果、行動範囲を制限することで低下する前肢の握力がオレアミドを経口投与することによって抑制された。4 週間後のオレアミドの血中濃度は control 群と sedentary 群の間で有意な差はなく、30—40 nM であった。一方で sedentary-oleamide 群のオレアミドの血中濃度は約 120 nM であった。骨格筋量に関しては瞬発的な動きを担う前脛骨筋において行動範囲を制限することによって筋重量が減少し、オレアミドを摂取することでその減少が抑制された。骨格筋を構成する筋線維の断面積を測定したところ、行動範囲を制限することで筋断面積の大きい筋線維の割合が減少し、筋断面積の平均値も減少したが、オレアミドを摂取することによって筋断面積の低下は抑制された。骨格筋でのタンパク質合成系の主要なシグナル経路である mTOR 経路について評価した結果、前脛骨筋において Akt (mTOR の上流因子)、mTOR、p70S6K (mTOR の下流因子) のリン酸化レベルがオレアミドを摂取することで上昇した。タンパク質分解系として凝集タンパク質などのクリアランスを担うオートファジーについて評価した。オートファジー不全を起こしたマウスは筋萎縮を呈し、オートファジーマーカーである LC3-II と選択的基質である p62 が蓄積する。行動範囲制限マウスの前脛骨筋において、LC3-II と p62 のタンパク質レベルが増加したが、オレアミドの摂取によりその増加が抑制された。以上の結果から、オレアミドは行動範囲を制限したマウスが呈する前脛骨筋の萎縮を抑制した。また前脛骨筋においてオレアミドの摂取は mTOR 経路を活性化させ、行動範囲制限マウスが呈するオートファジーの低下を抑制すると示唆された。

## 第2章 オレアミドの筋肥大作用に対する G タンパク質共役型受容体 CB1 の関与

第 1 章で行動範囲制限マウスで誘発される筋萎縮をオレアミド摂取が抑制することを明らかとした。本章ではオレアミドが骨格筋量を調節する分子機構を解析した。マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を分化させた筋管細胞において、オレアミドを外因的に経口摂取した際の生理的濃度範囲内である 100 nM のオレアミド存在下で培養を行った。その結果、オレアミドはタンパク質合成を促進し、筋肥大の指標である筋管細胞の短径を有意に上昇させた。さらにオレアミドは筋管細胞において Akt、mTOR、

p70S6K のリン酸化レベルを上昇させた。また mTOR の阻害剤あるいは p70S6K の阻害剤はオレアミドがもたらす筋肥大作用を抑制した。次にオレアミドの標的タンパク質として G タンパク質共役型受容体である cannabinoid receptor 1 (CB1) に着目した。オレアミドは脳において数  $\mu\text{M}$  の濃度範囲で CB1 を活性化させるが、生理的濃度範囲内である 100 nM でのオレアミドによる筋肥大作用に CB1 が関与するのかは不明である。siRNA を用いて CB1 をノックダウンした筋管細胞においてオレアミド存在下で培養を行った結果、オレアミドがもたらす p70S6K のリン酸化レベルの上昇、タンパク質合成の促進、筋肥大の促進が CB1 ノックダウンによって抑制された。さらに CB1 のノックダウンに対するレスキュー実験を行うため、siRNA 耐性 CB1 を高発現させた細胞で、内因性 CB1 の発現を siRNA によってノックダウンさせた。その結果、オレアミドによる p70S6K のリン酸化レベルの上昇が CB1 ノックダウン下においてその作用が抑制された一方で、siRNA 耐性 CB1 を高発現することでオレアミドの p70S6K のリン酸化レベルの上昇が回復した。CB1 を含む G タンパク質共役型受容体は細胞内 G タンパク質と共役することで下流のシグナル伝達を制御し、生理機能を発揮する。そこで 4 つの主要な G タンパク質である Gas、Gai、Gaq、G $\alpha$ 12/13 に関連する転写活性に及ぼすオレアミドの影響を評価した。その結果、CB1 高発現下においてオレアミドは Gas、Gai、Gaq、G $\alpha$ 12/13 に関連するいずれの転写活性にも影響を及ぼさなかった。CB1 は G タンパク質非依存的にチロシンキナーゼである Src を活性化させることから、Src について評価した。その結果、オレアミドは筋管細胞において Src のリン酸化レベルを上昇させた一方で CB1 ノックダウン下においてその作用が抑制された。さらに Src 阻害剤はオレアミドがもたらす p70S6K のリン酸化レベルの上昇を抑制した。以上の結果から、オレアミドは CB1/Src/mTOR 経路を活性化させ、筋肥大をもたらすことが示唆された。

### 第 3 章 オレアミドの腸管における吸収経路と機構

経口摂取したオレアミドの機能性を正しく理解する上で、オレアミドの吸収経路や吸収機構に関する情報は不可欠である。そこで初めに、内在性オレアミドと区別できる SIL-オレアミドを用いて、小腸で吸収された食品成分が輸送される門脈あるいは胸管リンパ管への SIL-オレアミドの輸送について評価した。門脈あるいは胸管リンパ管へカテーテルを挿入したラットの十二指腸内へ SIL-オレアミドを投与した結果、SIL-オレアミドは主に門脈へと輸送され、体内循環することが判明した。小腸上皮モデル Caco-2 細胞において、SIL-オレアミドの細胞内への取り込みについて評価した結果、オレイン酸または脂肪酸輸送体 CD36 阻害剤によって SIL-オレアミドの取り込みが抑制された。オレアミドの腸管吸収を評価するためトラスウェル上で Caco-2 細胞を SIL-オレアミド存在下で培養した結果、SIL-オレアミドが細胞内へと取り込まれた後、基底膜側（下層）へと透過した。一方で、細胞内と基底膜側の SIL-オレアミドの総量は、頂端側（上層）で減少した SIL-オレアミド量の  $2.3 \pm 0.3\%$  と極めて低かった。そこでオレアミドが細胞内で脂肪酸アミド加水分解酵素 FAAH により分解されていると仮説を立てた。トラスウェル上で Caco-2 細胞を SIL-オレアミドと FAAH 阻害剤存在下で培養した。その結果、FAAH 阻害剤非存在下において、細胞内と基底膜側の SIL-オレ

アミドの総量は、頂端側で減少した SIL-オレアミド量の  $7.0 \pm 1.8\%$  だったが、FAAH 阻害剤共存下において、細胞内と基底膜側の SIL-オレアミドの総量は  $45.0 \pm 6.9\%$  にまで増加した。さらにオレアミドの血中濃度に及ぼす FAAH 阻害の影響を評価するため、FAAH 阻害剤を投与したマウスへ SIL-オレアミドを投与した。SIL-オレアミドの単独投与時には SIL-オレアミドの血中濃度は約 160 nM に達したが、FAAH 阻害剤の投与によって SIL-オレアミドの血中濃度は約 910 nM に達した。以上の結果より、腸管で吸収されたオレアミドは主に門脈を経て体内循環することが明らかとなった。また、オレアミドは CD36 を介して小腸上皮細胞内へと取り込まれ、細胞内で FAAH により分解されると示唆された。

## まとめ

本研究をまとめると、オレアミドは行動範囲制限マウスが呈する前脛骨筋萎縮を抑制することが明らかとなった。さらに筋管細胞において、オレアミドは CB1 を介して Src/mTOR 経路を活性化させることで筋肥大を誘発することが示唆された。また経口摂取されたオレアミドは主に門脈へと輸送され、体内循環することが明らかとなり、オレアミドは CD36 を介して小腸上皮細胞へと取り込まれ、細胞内で FAAH によって分解されていることが示唆された。

## 審査結果の要旨

骨格筋は運動機能や姿勢の保持だけでなく、糖や脂質の代謝も担う組織である。現代社会におけるデスクワーク中心のライフスタイルは身体活動量を低下させ、年齢を問わず骨格筋の量的・質的な低下をもたらす。骨格筋量の低下は運動機能の低下だけでなく、代謝異常症候群に関連した疾病に罹患するリスクを増大させる。骨格筋量は筋線維におけるタンパク質の合成と分解のバランスで制御されており、運動などの刺激に応答してタンパク質の合成が分解を上回るとき、筋線維は肥大し、骨格筋量が増加する。近年、骨格筋の健康を維持する有効な手段として機能性食品成分の活用に期待が寄せられている。摂取された機能性食品成分は吸収後、標的組織に適切な濃度で到達し、作用する必要がある。生体内における食品成分の機能性を正しく理解するために食品成分の吸収機構、代謝機構、そして生体利用率を考慮した考察が必要である。一級脂肪酸アミドであるオレアミド (*cis*-9,10-octadecenamide) は、生体内で合成され、運動後のラットの骨格筋細胞間質液においてその濃度が 3 倍に上昇する。一方で、オレアミドは食品に含まれており、食品成分として生体内へと取り込まれる。しかし、オレアミドが脂質メディエーターとして骨格筋の恒常性の維持に機能するかは不明である。また内因性のオレアミドの血中濃度に関しては統一した見解はなく、さらに外因的に経口摂取したオレアミドの吸収機構や代謝機構も不明である。そこで本研究ではオレアミドが骨格筋量におよぼす影響を評価し、さらにその分子機構を検討すると

ともに、オレアミドの腸管における吸収機構と代謝機構を解明することも目的とした。

第1章では、オレアミドを経口摂取した際の生理的濃度を評価した。その結果、マウスにおいて内在性オレアミドの血中濃度は約 30 nM であった。内在性のオレアミドと区別するため、安定同位体標識オレアミド (SIL-オレアミド) を合成し、マウスへ経口投与 (50 mg/kg) したところ、投与後 1 時間で SIL-オレアミドの血中濃度は約 170 nM に達し、オレアミドの血中濃度が約 200 nM の範囲内であることを明らかにした。身体活動量の低下により瞬発性の骨格筋の量が低下することから、狭小ケージで飼育することで行動範囲を制限したマウスの骨格筋量におよぼすオレアミドの効果を検証した。その結果、狭小ケージ飼育により誘発された前脛骨筋の萎縮がオレアミドを経口投与することにより抑制された。さらにオレアミドによって前脛骨筋での主要なタンパク質合成経路である mTOR シグナルの関連因子が活性化され、また細胞内凝集タンパク質などの分解系であるオートファジーの関連因子の蓄積が抑制させることを明らかにした。以上の結果より、オレアミド摂取が行動範囲制限により誘発される前脛骨筋の萎縮を抑制することを明らかにした。

第2章では、オレアミドが筋量を調節する分子機構をマウス由来 C2C12 筋管細胞で評価した。その結果、オレアミドを経口摂取した際の生理的濃度範囲内である 100 nM の濃度で、オレアミドが Src と mTOR シグナルを活性化して、筋肥大を促進した。一方で、カンナビノイド受容体 1 (CB1) をノックダウンした筋管細胞ではオレアミドによる Src と mTOR シグナルの活性化と肥大が抑制された。以上の結果から、オレアミドは CB1 に作用して Src を活性化させ、mTOR シグナルを介して筋肥大を誘発することが示唆された。

第3章では、オレアミドの腸管吸収経路と機構について SIL-オレアミドを用いて評価した。その結果、ラットの腸管で取り込まれたオレアミドは主に門脈を介して末梢血へと運搬されることが明らかとなった。またオレアミドの腸管吸収機構を小腸上皮モデル Caco-2 細胞で評価した結果、脂肪酸輸送体 CD36 に対する阻害剤によってオレアミドの吸収は阻害され、脂肪酸アミド加水分解酵素 FAAH に対する阻害剤によってオレアミドの吸収が高まることを明らかにした。さらにマウスに経口投与した SIL-オレアミドの血中濃度は、事前に FAAH 阻害剤を経口投与することで 5 倍以上に増加することを明らかにした。以上の結果から、小腸上皮細胞においてオレアミドは CD36 を介して取り込まれ、FAAH によって代謝される可能性が示された。

以上、本研究は、行動範囲を制限したマウスで惹起される前脛骨筋の萎縮をオレアミドが抑制することを証明し、さらにオレアミドによる筋管細胞の肥大に CB1-Src-mTOR シグナルの活性化が関与する可能性を示すことで、骨格筋の健康におけるオレアミドの新規機能を明らかにした。またオレアミドの腸管における吸収機構と代謝機構を検証することで、オレアミドの生体利用率を向上させるための情報を提供した。これらの成果は、栄養化学、生化学、生理学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。