

令和元年6月19日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03033

研究課題名(和文)炎症とミトコンドリア不全を標的としたサルコペニア予防のための新たな栄養戦略

研究課題名(英文) Development of novel dietary therapy for sarcopenia focusing on inflammation and mitochondrial dysfunction in muscles

研究代表者

飯田 薫子 (Iida, Kaoruko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：50375458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではサルコペニアの根源となる代謝不全や炎症に対する食品・栄養因子の効果を検討した。細胞における検討では、イソフラボンの一種daidzeinが転写因子ERRを介して脂質酸化に関わる遺伝子発現を増強すること、ポリフェノールの一種、没食子酸が転写因子NF- κ B及びNrf2が関わるシグナルを制御し抗炎症・抗酸化作用を発揮することを明らかとした。動物における検討では、糖質制限食の摂取によって、筋の解糖系遺伝子発現が抑制される一方で、運動がその抑制を解除することや、運動時の糖代謝産物である乳酸が筋分化制御因子であるMyoDの発現を増強し、筋の分化・肥大を促進することなどを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアと高齢者の身体機能低下を引き起こし要介護の要因となるため、その予防は健康長寿社会の実現のための危急の課題である。本研究では骨格筋での「炎症」や「ミトコンドリア機能不全」といった病態をターゲットに、サルコペニアの病態の改善に働きかけるような食品・栄養因子を明らかとし、サルコペニア予防のための新たな食の提案を行うことを目的とした。本研究で得られた知見はいずれも新規性が高く、またサルコペニアの予防・改善のための戦略を構築する上で、その一端を担う知見であると考えられる。食事や食品という身近な因子でその病態を改善し得る可能性を提唱できれば、その研究的、社会的意義は極めて大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to assess the effect of food factors and nutrients on metabolic dysfunction and inflammation those causes sarcopenia. In the cell experiments, we found that isoflavone daidzein enhanced the expression of genes related to fatty acid oxidation via ERR-involved pathway, and that a food-derived polyphenol, gallic acid exerted antioxidative and anti-inflammatory property by regulating Nrf2/NF- κ B activity. In the animal experiments, we demonstrated that ketogenic diet (KD) consumption and exercise in addition to KD affected expression profiles of metabolic genes in heart and skeletal muscle. We also found that lactate, one of the major glucose metabolite mainly produced during exercise, modulated myoblast differentiation by regulating transcription factor MyoD thereby enhancing myofiber hypertrophy in vitro and in vivo.

研究分野：応用栄養学 代謝学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 食品因子 栄養代謝 ミトコンドリア エネルギー代謝 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアとは進行性・全身性の筋量の低下と筋機能の低下を主症状とする症候群であり、加齢により発症するものが多くを占める。高齢者の身体機能低下を引き起こし要介護の要因となるため、その予防は健康長寿社会の実現のための危急の課題であるが、未だその効果的な予防法については確立されていない。サルコペニアは加齢による様々な要因をきっかけに、骨格筋で「蛋白質の合成低下・分解亢進」というバランス破綻や、「ミトコンドリアの数的・質的低下による機能不全」などが起こり発症する。そこでこれまでは主に、筋蛋白質の合成促進を目的とした食品・栄養研究が国内外でなされてきた。なかでも高蛋白質食の摂取は筋蛋白質の合成に促進的に働くことが知られ、このためサルコペニア対策には蛋白質の摂取が有用であると言われてきた。しかしながら近年、高齢者における蛋白摂取は筋量増加にはつながらないという報告も少なくなく、新たな栄養的アプローチが強く求められている。

これまで我々は「食因子による疾患制御」をテーマに研究を行い、食品から派生する種々の成分が生体分子の活性を制御し、病態を制御する可能性を示してきた。骨格筋細胞においてはすでに、大豆イソフラボンなどを含む複数の食品由来ポリフェノールが転写因子 NRF-1などを活性化しミトコンドリアを増生させる可能性を見いだしている。さらに、我々が着目するのは炎症である。近年、肥満や加齢に起因する体内の慢性的な炎症性変化が、炎症性サイトカインの作用を介して蛋白の分解シグナルを活性化するとともに、二次的にミトコンドリアの機能低下をもたらす、サルコペニアを引き起こす可能性が報告されている。そこで炎症を改善させるような食品因子が、サルコペニア予防に寄与する可能性が十分に示唆される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、骨格筋での「炎症や代謝不全による蛋白分解亢進」や「ミトコンドリアの機能不全」といった病態をターゲットに、分子レベル、特に転写因子カスケードにおいてこれら病態の改善に働きかけるような食品・栄養因子を明らかとすることとした。これら因子の応用性の検討を通じて、その予防のための新たな食生活の提案を行うことを最終ゴールとしたい。

3. 研究の方法

本研究では主に培養細胞を使用して食品因子の機能の検討を行うとともに、並行して、動物モデルを使用し、食事や運動がもたらす筋の代謝変動について解析を行った。

(1) 細胞を用いた検討

①エネルギー代謝改善効果を有する食品因子の検討

本研究では筋エネルギー代謝において中心的役割を果たすミトコンドリア機能に着目し、ミトコンドリアの主要機能である脂肪酸酸化、酸化的リン酸化の関連遺伝子発現に対する、食品因子の影響を検討した。実験には培養系筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。候補食品因子としては、ポリフェノール類を中心とした食品因子を中心に検討を行った。さらに遺伝子発現に影響を与えた食品因子に関しては、その分子メカニズムを明らかとするため、変動のあった遺伝子のプロモーター配列にルシフェラーゼを繋いだレポーターベクターを作成し、責任転写因子の検討を行った。

②抗炎症作用を有する食品因子のメカニズム解析

本研究では様々な疾患の基盤的病変となる慢性炎症状態に着目し、これまで我々が明らかにしてきた食品および食品因子の抗炎症作用について、より詳細なメカニズム検討を行った。実験には C2C12 細胞もしくはマクロファージ様細胞 Raw264 を用いた。細胞に大腸菌内毒素である LPS や飽和脂肪酸を負荷することにより炎症を誘導した上で、これら食品因子の効果を検討した。さらに、キナーゼに対する特異的阻害剤もしくは shRNA などを用いて、食品因子の抗炎症作用のシグナル経路について検討を行った。

(2) 動物を用いた検討

①糖質欠乏に対する骨格筋の適応変化および運動併用効果についての検討

低栄養はサルコペニアの誘因となることが知られている。しかしながら高脂肪食投与や肥満モデルマウスなど「エネルギー過剰状態」での筋の代謝変化については多くの研究があるが「エネルギー欠乏」状態での筋のエネルギー代謝変化についての研究は数少ない。本研究では筋の主要エネルギー源である糖質の欠乏下での筋のエネルギー代謝変化、および糖質欠乏と運動の相乗効果について検討を行った。C57BL/6J マウスを、普通食摂取群と低糖質食摂取群に分け、さらにそれぞれの群の半数には継続的な運動負荷を加え、12週間飼育した。その後、生体内の主要エネルギー消費臓器である心臓・骨格筋の遺伝子発現変化について検討した。

②乳酸が骨格筋の分化・肥大に与える影響とそのメカニズムの検討

運動は筋肥大をもたらす、サルコペニアの治療に有用な手段となる。運動が筋肥大をもたらすメカニズムについては様々な報告があるが、我々は先行研究において、運動時の主要な糖代謝産物である乳酸が C2C12 細胞の分化・肥大を引き起こす可能性を見出してきた。そこで本研

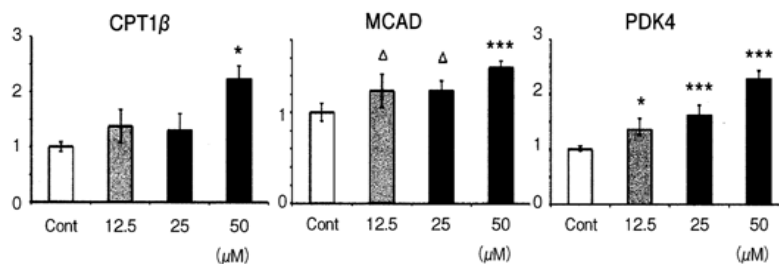
究では、生体での再現性を得るために、初代培養筋芽細胞および筋損傷モデルマウスに生理的高濃度の乳酸負荷を行い、筋管への分化の程度、筋繊維の肥大等について検討を行った。

4. 研究成果

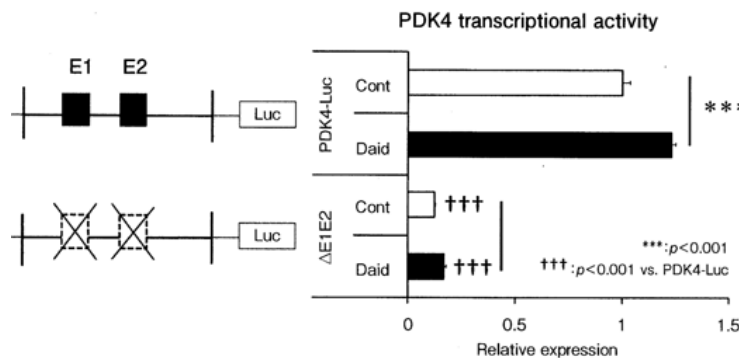
(1) 細胞を用いた検討

①エネルギー代謝改善効果を有する食品因子の検討

C2C12 細胞における脂質 β 酸化および酸化リン酸化関連遺伝子に対する食品因子の効果を検討した結果、大豆イソフラボンである daidzein や genistein が pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (Mcad), carnitine palmitoyltransferase 1 β (Cpt1b)などの脂質 β 酸化に関わる遺伝子の発現を濃度依存的に増強させることを見出した (図 1)。さらに特異的阻害剤を用いた検討において、daidzein の効果には転写因子 EER α が関わる可能性を見いだした。実際に Pdk4 のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイの検討において、daidzein は Pdk4 のプロモーター活性を増強するが、EER α の結合領域を欠失させるとその効果が消失することを確認した (図 1)。(論文 5)



【図1】 Daidzein が C2C12 細胞の脂質代謝関連遺伝子の発現に与える影響 (論文 5 より)



【図2】 Daidzein の Pdk4 プロモーター活性に与える影響 (論文 5 より)

②抗炎症作用を有する食品因子のメカニズム解析

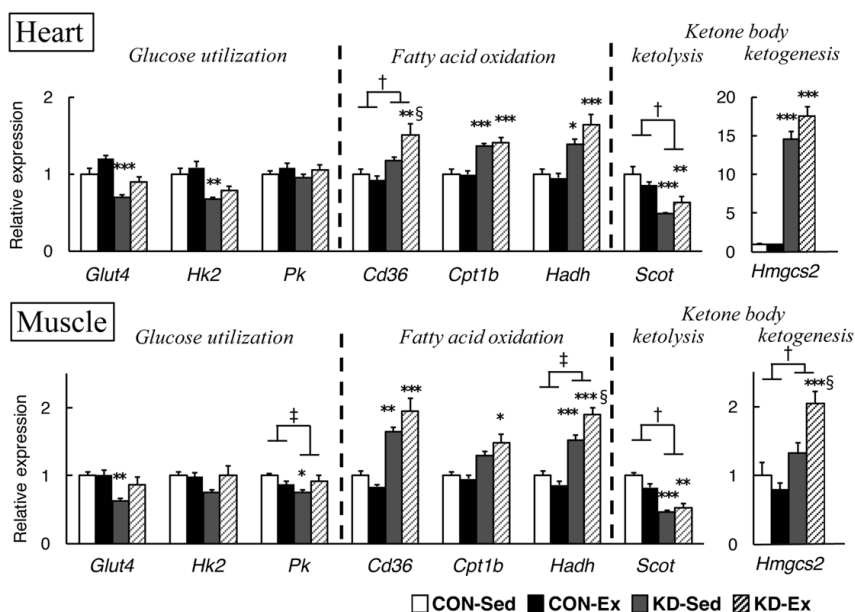
これまで我々が検討してきた抗炎症作用を有する食品因子のうち、ポリフェノールの一種である没食子酸、および没食子酸を多く含む植物 *Terminalia bellirica* の作用に着目した。没食子酸および *Terminalia bellirica* が、炎症及び酸化ストレスに及ぼす影響とその分子メカニズムを検討した結果、これらの因子が Raw264 マクロファージにおいて炎症メディエーター (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1、iNOS) の発現、一酸化窒素 (NO) 産生、活性酸素種 (ROS) の産生を抑制し、そのメカニズムとして NF- κ B の核移行及びリン酸化、MAPK のリン酸化を抑制することを明らかにした。また併せて、抗酸化酵素 (HO-1、catalase、NQO1、GCLM) の遺伝子発現を亢進し、その上流因子である Nrf2 の核移行、Akt 及び AMPK のリン酸化を亢進することを明らかにした。siRNA による Nrf2 の遺伝子ノックダウン、及び阻害剤による検討を行った結果、没食子酸や *Terminalia bellirica* 抽出物は Nrf2 および AMPK が関与する経路を制御することにより、抗酸化酵素発現増加作用を呈することを示した。(論文 2,4)

(2) 動物を用いた検討

①糖質欠乏に対する骨格筋の適応変化および運動効果についての検討

C57BL/6J マウスを普通食-安静群 (CON-Sed)、普通食-運動群 (CON-Ex)、低糖質食-安静群 (KD-Sed)、低糖質食-運動群 (KD-Ex) の 4 群に分け 3 ヶ月飼育し、体重変動、血液代謝パラメータの差、骨格筋および心筋での代謝関連遺伝子の変動について検討を行った。この結果、KD 両群では、投与開始後 1 ヶ月程度は体重減少が認められるものの、その後コントロールとの体重差は消失し、血中脂質や血糖値についても 4 群間で差は認められなかった。一方、遺伝子発現の検討では、KD-Sed 群の心臓や骨格筋で糖の利用に関わる遺伝子の発現が低下すること、運動負荷を行うことによりその低下が改善することを見出した (図 3)。また両臓器において、

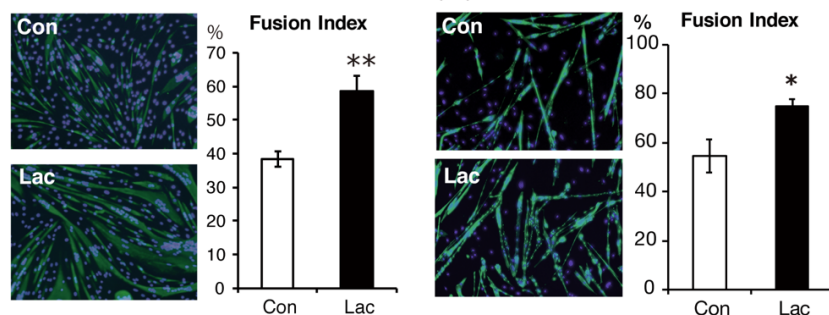
低糖質食摂取により脂質利用遺伝子の発現亢進と、ケトン体利用遺伝子の発現抑制が生じることを明らかとし、低糖質食の利用や運動負荷により筋組織における代謝関連遺伝子発現は特異的な変動パターンを呈することを示した (図3)。(論文3)



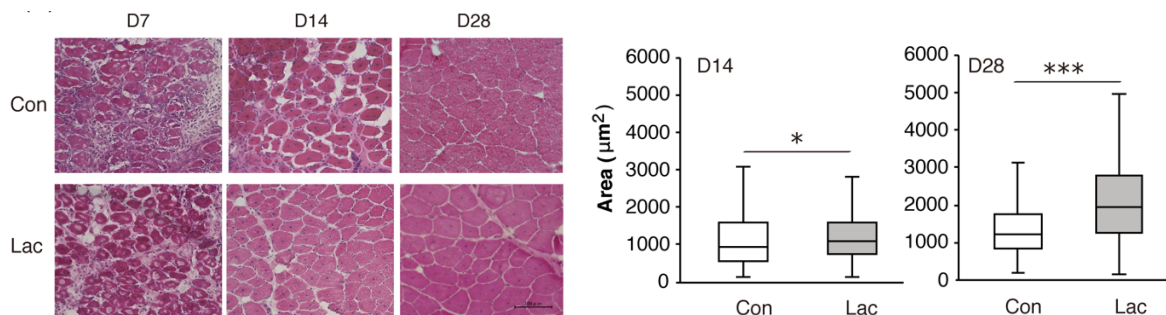
【図3】 低糖質食と運動負荷が心臓および骨格筋の代謝遺伝子発現に与える影響 (論文3より)
 Glut4 (glucose transporter type4), Pk (pyruvate kinase), Hk2 (hexokinase 2), Cd36 (cluster of differentiation 36), Cpt1b (carnitine palmitoyl transferase 1β), Hadh (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase), Scot (succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase), Hmgcs2 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2)

②乳酸が骨格筋の分化・肥大に与える影響とそのメカニズムの検討

培養系筋芽細胞である C2C12 細胞、およびマウス骨格筋より採取した初代培養筋芽細胞を用いた検討では、細胞に生理学的高濃度の乳酸を負荷すると、筋分化に関わる転写因子 MyoD の遺伝子発現が亢進し、筋管様細胞への分化・融合が促進することを示した (図4)。さらに筋損傷モデルマウスを用い、血中乳酸濃度が高強度運動後の乳酸濃度と同程度になるように乳酸を連日投与し、筋の再生について評価したところ、乳酸投与群では損傷後 14 日目および 28 日目の筋横断面積が有意に増加し、筋肥大が惹起されることを明らかとした (図5)。さらにこの過程において、乳酸投与群では速筋型のみオンである MHC II b の遺伝子発現量が有意に増加することから、再生・肥大は速筋優位の変化である可能性を示した。(論文1)



【図4】 乳酸が培養筋芽細胞の分化に与える影響 (論文1より) 左;C2C12 細胞、右; 初代培養筋芽細胞



【図5】 乳酸が筋の再生・肥大に与える影響 (論文1より) 左;再生筋の横断面写真、右; 筋繊維横断面積

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Tsukamoto S, Shibasaki A, Naka A, Saito H, Iida K. Lactate Promotes Myoblast Differentiation and Myotube Hypertrophy via a Pathway Involving MyoD In Vitro and Enhances Muscle Regeneration In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 3649 2018. doi: 10.3390/ijms19113649 (査読有)
2. Tanaka M, Kishimoto Y, Sasaki M, Sato A, Kamiya T, Kondo K, Iida KT. Terminalia bellirica extract and gallic acid attenuate LPS-induced inflammation and oxidative stress via MAPK/NF- κ B and Akt/AMPK/Nrf2 pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2018, Article ID 9364364, 2018. Doi: 10.1155/2018/9364364 (査読有)
3. Shimizu K, Saito H, Sumi K, Sakamoto Y, Tachi Y, Iida K. Short-term and long-term ketogenic diet therapy and the addition of exercise have differential impacts on metabolic gene expression in the mouse energy-consuming organs heart and skeletal muscle. *Nutrition Research*. 60: 77-86, 2018. Doi:10.1016/j.nutres.2018.09.004 (査読有)
4. Tanaka M, Kishimoto Y, Sato A, Sasaki M, Kamiya T, Kondo K, Iida K. Molecular Mechanisms Underlying Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Terminalia Bellirica Extract and Gallic Acid in LPS-stimulated Macrophages. *Atherosclerosis Supplements (Proceeding)*. 32:126, 2018 (査読有)
5. 飯田薫子. 大豆イソフラボンによる転写因子 $ERR\alpha$ を介した骨格筋エネルギー代謝関連遺伝子制御の検討 大豆たんぱく質研究 20 巻 89-94, 2018. (査読無)
6. Tanaka M, Kishimoto Y, Saita E, Suzuki-Sugihara N, Kamiya T, Taguchi C, Iida K, Kondo K. Terminalia bellirica Extract Inhibits Low-Density Lipoprotein Oxidation and Macrophage Inflammatory Response in Vitro. *Antioxidants (Basel)*. 5(2): 20, 2016. Doi: 10.3390/antiox5020020. (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

1. 田中 未央里, 岸本 良美, 佐々木 瑞穂, 佐藤 あかり, 神谷 智康, 近藤 和雄, 飯田 薫子 LPS 誘発性炎症、酸化ストレスに対するターミナリアベリリカ抽出物及び没食子酸の制御メカニズムの解明 第 16 回日本機能性食品医用学会総会 (新潟) 2018.12
2. 浅田 千晶, 塚本 咲翔, 飯田 薫子 ウェアラブル測定機器を用いたエネルギー消費量の推定法の探索 第 5 回 日本スポーツ栄養学会 (京都) 2018.7
3. 佐藤 あかり, 田中 未央里, 佐々木 瑞穂, 岸本 良美, 飯田 薫子 没食子酸がリポ多糖刺激マクロファージにおける酸化機構ならびに炎症反応に及ぼす影響 第 72 回 日本栄養・食糧学会大会 (岡山) 2018.5
4. 北村 奏乃, 原 奈摘, 坂本 友里, 三浦 希美, 塚本 咲翔, 飯田 薫子 筋芽細胞 C2C12 における Daidzein の $ERR\alpha$ を介した脂質酸化亢進作用の検討 第 72 回 日本栄養・食糧学会大会 (岡山) 2018.5
5. 田中 未央里, 岸本 良美, 佐々木 瑞穂, 佐藤 あかり, 神谷 智康, 近藤 和雄, 飯田 薫子 ターミナリアベリリカ抽出物及び没食子酸の生体内における酸化ストレス制御メカニズムの解明 第 72 回 日本栄養・食糧学会大会 (岡山) 2018.5
6. 飯田 薫子 大豆イソフラボンダイゼインの代謝疾患に対する多面的作用 第 15 回日本機能性食品医用学会総会 (東京) 2017.12 招待講演
7. 斎藤 葉月, 清水 梢, 角 佳奈子, 畑中 由衣子, 飯田 薫子 ケトン食摂取と運動負荷が生体代謝に与える相乗効果の検討 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸) 2017.12
8. 田中 未央里, 岸本 良美, 佐藤 あかり, 佐々木 瑞穂, 神谷 智康, 近藤 和雄, 飯田 薫子 リポ多糖(LPS)刺激マクロファージにおけるターミナリアベリリカ抽出物及び没食子酸の炎症反応ならびに酸化ストレス制御メカニズムの解明 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸) 2017.12
9. 田地 陽一, 坂本 友里, 深津 佳世子, 小池 亜紀子, 飯田 薫子 女子大学生における運動と栄養による骨量への影響 第 4 回 日本スポーツ栄養学会 (東京) 2017.7.21
10. 田中 未央里, 須釜 彩子, 角 佳奈子, 清水 梢, 岸本 良美, 近藤 和雄, 飯田 薫子 肥満誘導性の慢性炎症ならびに糖・脂質代謝異常に対する没食子酸の効果 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会 (那覇) 2017.5
11. 塚本 咲翔, 柴崎 絢子, 斎藤 葉月, 中 彩乃, 飯田 薫子 Lactate による筋肥大メカニズムの検討 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会 (那覇) 2017.5
12. 田中未央里, 岸本良美, 才田恵美, 鈴木規恵, 神谷智康, 田口千恵, 飯田薫子, 近藤和雄 マクロファージの酸化ストレス防御機構に対するターミナリアベリリカ抽出物の影響 第 14 回日本機能性食品医用学会総会 (東京) 2016.12
13. 原奈摘, 柴崎絢子, 坂本友里, 塚本咲翔, 中彩乃, 飯田薫子 筋芽細胞 C2C12 における Daidzein の $ERR\alpha$ を介したミトコンドリア関連遺伝子及び脂質代謝関連遺伝子への影響の検討 第

- 39回 日本分子生物学会年会（横浜）2016.12
14. 角佳奈子、畑中由衣子、清水梢、中彩乃、飯田薫子 TCA回路の部分阻害が生体の代謝に及ぼす影響の検討 第39回 日本分子生物学会年会（横浜）2016.12
 15. 田中未央里、岸本良美、才田恵美、鈴木規恵、神谷智康、田口千恵、飯田薫子、近藤和雄 ターミナリアベリリカ抽出物がマクロファージにおける酸化機構に及ぼす影響 第23回日本未病システム学会学術総会（福岡）2016.11
 16. 田中未央里、岸本良美、才田恵美、鈴木規恵、神谷智康、田口千恵、飯田薫子、近藤和雄 LPS刺激マクロファージにおける酸化ストレス防御機構に対するターミナリアベリリカ抽出物の影響 第10回日本ポリフェノール学会学術大会（東京）2016.8
 17. 田中未央里、岸本良美、才田恵美、鈴木規恵、神谷智康、田口千恵、飯田薫子、近藤和雄 ターミナリアベリリカ抽出物が LPS 刺激マクロファージにおける酸化ストレス防御機構に及ぼす影響 第70回 日本栄養・食糧学会大会（神戸）2016.5
 18. 原奈摘、柴崎絢子、坂本友里、塚本咲翔、中彩乃、飯田薫子 筋芽細胞C2C12におけるDaidzeinのミトコンドリア関連遺伝子および脂質代謝関連遺伝子発現への影響の検討 第70回 日本栄養・食糧学会大会（神戸）2016.5
 19. 角佳奈子、畑中由衣子、清水梢、中彩乃、飯田薫子 TCA回路の部分阻害が生体の代謝に及ぼす影響の検討 第70回 日本栄養・食糧学会大会（神戸）2016.5
 20. 塚本咲翔、柴崎絢子、中彩乃、劉子寧、畑中由衣子、坂本友里、飯田薫子 Lactateが筋分化・肥大に与える影響の検討 第70回 日本栄養・食糧学会大会（神戸）2016.5
 21. 飯田薫子 乳酸は転写因子 MyoD を介して筋肥大を誘導する～筋細胞における検討～第166回日本体力医学会関東地方会 特別シンポジウム「体力医学の多様性を知る～分野,年齢,性別,国籍を超えて～」(東京) 2016.3 招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：近藤 和雄
ローマ字氏名：KONDO, Kazuo
所属研究機関名：東洋大学
部局名：食環境学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：30153711

研究分担者氏名：鈴木 恵美子
ローマ字氏名：SUZUKI, Emiko
所属研究機関名：お茶の水女子大学
部局名：基幹研究院
職名：名誉教授
研究者番号（8桁）：80154524

研究分担者氏名：岸本 良美
ローマ字氏名：KONDO, Kazuo
所属研究機関名：お茶の水女子大学
部局名：お茶大アカデミック・プロダクション
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70600477

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。