

令和元年6月20日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15267

研究課題名(和文)食品成分によるGタンパク質共役受容体を介した抗サルコペニア効果の解明

研究課題名(英文)Prevention of sarcopenia by functional food factors through G protein-coupled receptors.

研究代表者

近澤 未歩(Chikazawa, Miho)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：80757071

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):骨格筋に高発現するGPCRであり、骨格筋肥大効果を有することが知られる β 2アドレナリン受容体(β 2AR)に着目し、サルコペニア予防に寄与する機能性食品成分の効果を明らかにするべく検討を行った。(a) β 2ARのアゴニストとなる食品成分、(b) β 2ARの発現を亢進する食品成分について350種類の食品成分ライブラリよりスクリーニングを行った結果、(a)アゴニストとして4種類、(b)発現亢進成分として2種類の成分を見出した。これらの食品成分の活性機構の解析、動物実験による効果の検証を行い、食品成分の摂取がサルコペニア予防に寄与しうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を背景にして、骨格筋機能の維持や改善についての研究成果は、今後さらに注目されると考えられる。骨格筋機能研究が進むことにより、介護費・医療費削減の面における高い経済効果、労働力の確保、労働生産性の向上に寄与することができるものと考えられるが、本研究成果がその一助となることが期待される。食品成分アゴニストの作用は、既知の合成アゴニストと比較して弱いものであるが、発現を亢進する食品成分と組み合わせることで、副作用のリスクを抑えながら、より低濃度で高い効果を得られることが期待される。安全性が高く、継続的に摂取が可能な機能性食品やサプリメントの開発などへの応用が可能である。

研究成果の概要(英文):Modulating β 2-adrenergic receptor (β 2-AR) expression and activation is important for maintaining skeletal muscle function. In this project, we identified food factors that are able to regulate β 2-AR activity or expression and may improve skeletal muscle function. Using luciferase reporter assay, we screened 357 functional food factors as candidates for β 2-AR promoter activity and subsequently confirmed that RSV and GEN increase β 2-AR promoter activity and β 2-AR mRNA expression. We also ascertained that transcription factor NF-YA binds to the CCAAT box on the β 2-AR promoter and that the amount of NF-YA bound to the CCAAT box was unchanged by RSV or GEN treatment. Finally, we confirmed that a GEN-containing diet increased β 2-AR expression in mouse skeletal muscle and increased skeletal muscle mass. Our findings show that food-derived molecules have the potential to influence skeletal muscle mass and function by regulating G protein-coupled receptor activity or expression.

研究分野：食品化学

キーワード：GPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、高齢者の骨格筋の重量や筋力、身体能力の低下を指す。交通機関の発達などによる活動量の減少、超高齢化社会への移行などを背景として、日本におけるサルコペニアの罹患率は急速に増加している。サルコペニア患者の増加を防ぐためには、社会基盤の整備に加え、個人がより容易に取り組みめる手段の開発が必要である。この面で、運動や食事などの生活習慣によるサルコペニア予防を補助し、筋機能低下を防ぐ機能性食品成分の開発を行うことが、発症予防策として有用であると考えられる。

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) は全身に発現し、様々な細胞応答に関与する。骨格筋における GPCR の活性化は、筋機能改善に有効であることが知られる (Peptides, 26:1528-1536, 2005)。GPCR の一種である $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) は骨格筋に高発現しており、 $\beta 2AR$ 合成アゴニストによる筋萎縮抑制などの効果が確認されている。また近年、ウイルスベクターを用いた $\beta 2AR$ の過剰発現により、骨格筋重量の増加が確認され (SCIENTIFIC REPORTS, 6:23042, 2016)、 $\beta 2AR$ の発現制御を介した筋肥大効果についても着目されている。

以上より、 $\beta 2AR$ を介した食品成分によるサルコペニア予防効果の可能性に着目した。当研究室では、柑橘成分であるオバクノンが GPCR の一種である TGR5 のアゴニストとして作用すること、オバクノン含有食により筋重量が増加することを明らかにしている (BBRC, 463:846-52, 2015)。このことから、食品成分による GPCR を介した骨格筋肥大効果が、サルコペニアにおいても効果を発揮する可能性が見込まれる。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、(a) $\beta 2AR$ のアゴニストとなる食品成分、(b) $\beta 2AR$ の発現を上昇させる食品成分について、350 種類の食品成分ライブラリ (佐藤隆一郎教授研究室所有) からの探索を試みた。ルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングの結果、(a) は 3 種類、(b) は 2 種類の高い活性を有する食品成分が明らかになった。

そこで、これまでの研究で明らかにした、(a) $\beta 2AR$ アゴニストとなる食品成分、(b) $\beta 2AR$ の発現を上昇させる食品成分について、骨格筋肥大のメカニズム・ $\beta 2AR$ 発現調節機構を明らかにした上で、個体レベルでのサルコペニア予防における有用性を証明する。さらに、(a) と (b) の食品成分を組み合わせることによる相乗効果を検証し、ヒトへの応用の可能性を明示する。

スクリーニングで明らかとなった $\beta 2AR$ アゴニストとして作用する食品成分は、既知の合成アゴニスト (クレンブテロールなど) とは構造に共通点のないことを確認している。食品成分についての解析により、 $\beta 2AR$ の新たなアゴニスト結合部位の解明、創薬標的の創出などに結びつくことが期待される。

また、 $\beta 2AR$ の発現制御機構については、グルココルチコイド応答配列の関与 (Molecular Pharmacology, 54:1016-23, 1998)、cAMP 応答配列の関与 (Journal of Biol. Chem., 265:19330-335, 1990) などが報告されるが、個体レベルでの作用や骨格筋における発現制御は明らかにされていない。本研究で、食品成分による転写調節機構や核内受容体の関与が明らかになることで、食品成分の新たな生体調節機能や、他組織における有用性の解明などへの展開が期待される。

$\beta 2AR$ の発現を上昇させる食品成分の報告はこれまでになく、受容体の発現制御を介した生体機能調節という、食品成分の新たな機能性の指針となることが期待できる。また、アゴニスト投与と発現制御を同時に行い、より活性化効果を高める手法の有用性の検証は、他の受容体や組織における応用が可能であるという点でも重要性の高いものである。

食品成分アゴニストの作用は、既知の合成アゴニストと比較して弱いものであるが、発現を亢進する食品成分と組み合わせることで、副作用のリスクを抑えながら、より低濃度で高い効果を得られることが期待される。これは、心肥大などの副作用が知られる合成アゴニストと比較し安全性が高く、継続的に摂取が可能な機能性食品やサプリメントの開発などへの応用が可能である。

超高齢化社会を背景にして、骨格筋機能の維持や改善についての研究成果や、機能性食品成分についての情報は、今後さらに注目されると考えられる。介護認定者の割合を 1% 下げることによって、年間約 2000 億円の介護費削減効果、同時に年間約 1200 億円の医療費削減効果が期待されることから、サルコペニア予防の重要性は高い。骨格筋機能研究が進むことにより、介護費・医療費削減の面における高い経済効果、労働力の確保、労働生産性の向上に寄与することができるものと考えられるが、本研究成果がその一助となることが期待される。

3. 研究の方法

β 2AR を介した食品成分のサルコペニア予防効果について、その作用メカニズムを分子生物学的手法を用いて明らかにした上で、動物への投与による筋萎縮抑制効果について検討する。

- (1) β 2AR の食品成分アゴニストによる筋肥大効果の培養細胞、個体での確認
- (2) β 2AR 発現を亢進する食品成分の発現制御機構解析と個体における活性の検証
- (3) β 2AR アゴニストと発現亢進の組み合わせによるサルコペニア予防効果の検証

以上より、作用機構についての分子基盤、生体での有用性が立証されたサルコペニア予防効果を有する機能性食品成分として提唱する。

4. 研究成果

(a) β 2AR アゴニストとして機能する食品成分のサルコペニア予防効果の解析

まず、GPCR を介して cAMP シグナルを活性化する食品成分の評価系を構築した。HEK293 細胞に、cAMP 応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したベクター (CRE-luc) と GPCR を共発現させた後、食品成分を投与し、レポーターアッセイで食品成分による蛍光増大を評価した。

食品成分のスクリーニングにより β 2AR のアゴニストとして作用する食品成分 3 種類 (Osthole, Gramine, Hordenine) を見出ししてきた。この食品成分についてさらに検討を進め、3 種類の成分がマウス、ヒト両方の β 2AR に対してアゴニストとして機能すること、またこの効果は β 2AR 特異的なアンタゴニストである ICI-118551 により完全に抑制されることを明らかにした。さらに、食品成分のマウスへの筋肉投与により、 β 2AR 刺激により活性化する CREB 応答遺伝子である Nr4a1, Nr4a3, PGC-1 α 4 の発現が亢進することを確認し、食品成分が *in vivo* においても機能し得ることを明らかにした。この成果は論文として報告した。

(b) β 2AR 発現を亢進する食品成分の発現制御機構解析と個体における活性の検証

マウス β 2-AR 上流 (-1500/+1) のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドを作製し、350 種類の食品成分ライブラリよりプロモーター活性化能を持つ食品成分の探索を行った。その結果、スチルベノイドポリフェノールである Resveratrol (RSV)、イソフラボンである Genistein (GEN) が β 2-AR プロモーターを活性化させること、C2C12 細胞において β 2-AR の mRNA レベルを亢進することが明らかになった。

食品成分による発現制御機構を明らかにするため、様々な長さの β 2-AR プロモータープラスミドを作製してレポーターアッセイを行い、重要な配列の絞り込みを行った。その結果、プロモーター上に存在する GC-box (-383/-373) と CCAAT-box (-294/-290) が重要であることが予想された。2 箇所の配列それぞれに変異を導入したプロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、食品成分によるプロモーター活性の上昇が抑制された。また、この領域に結合することが予想される転写因子について、ノックダウン実験、ChIP アッセイ、ABCD アッセイにより明らかにした。

生体内においても食品成分が効果を発揮するのか検証するため、RSV, GEN をマウスに 4 日間経口投与を行なった。その結果、RSV, GEN 両方において骨格筋における β 2-AR の mRNA レベルでの発現は、投与濃度依存的に増加することが確認された。また、生体における食品成分の筋機能改善効果を証明するため、マウスに GEN 含有食の摂食と β 2-AR アゴニストであるクレンプテロールの投与を同時に行なった。0.1% GEN 含有食を 2 週間摂食させ、その期間中にクレンプテロールを 1 日おきに腹腔投与した。その結果、GEN により骨格筋の β 2-AR 発現が増加することを、mRNA レベル、タンパク質レベル両方で確認することができた。また、クレンプテロールによる筋重量の増加が、GEN 含有食によりさらに亢進することが確認された。さらに、筋肥大などに関わる遺伝子である IGF-1 の発現も GEN 含有食で有意に増加することを明らかにした。

以上の結果は、食品成分の摂取を介して筋機能の改善に寄与することを示唆するものであると言える。しかしながら、これまでに行なった検討では高濃度での投与・摂食を行っており、ヒトにおける有用性を検証するためには更なる検討が必要と考えられる。また、今回は主に筋肥大効果について着目した検討であったが、サルコペニアの予防や改善効果について検証するためには、ギプス固定や除神経などにより作製したサルコペニアモデルマウスを用いた検討など、様々な条件における有用性の評価が必要であると考えられる。

また当初の目的としては、サプリメントなどの形で長期的に摂取することで、加齢に伴う筋萎縮 (サルコペニア) の予防効果が見られるような食品成分を見いだすことを最終的な目的としていた。食品成分の活用として、摂取が簡便であり、長期的に服用が可能なサプリメントとしての摂取は安全性が高く、負担が少ない方法として有効と考えられる。このような食品成分の

活用を目指すためには、事前に長期的に比較的低濃度の食品成分を摂食させたのち、筋萎縮を起こした際のその障害の程度の抑制が見られるのかどうかについての検討が必要であると考えられる。さらに、今回の検討では、GPCR を活性化する食品成分と、GPCR の発現を亢進する食品成分についてそれぞれの有用性を検証したが、これらを組み合わせて摂取することでより低濃度で効率的に効果が得られることが期待できる。食品成分によるそれぞれの効果は、既知のリガンドと比較して弱いものであるが、食品成分同士の相乗効果により、安全性が高くかつ高い効果を持つサプリメントの開発などへの応用が期待される。これらについても今後更なる細胞レベル、個体レベルでの検証が必要であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

[1] [Chikazawa M](#) and Sato R. “Identification of Functional Food Factors as β 2-Adrenergic Receptor Agonists and Their Potential Roles in Skeletal Muscle.” J. Nutr. Sci. Vitaminol., 64, 68-74, 2018 (査読あり)

[2] [Chikazawa M](#) and Sato R. “Identification of a novel function of resveratrol and genistein as a regulator of β 2-adrenergic receptor expression in skeletal muscle cells and characterization of promoter elements required for promoter activation” Mol. Nutr. Food. Res., 2018, 62, 1800530 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

[1] 近澤未歩、清水誠、井上順、佐藤隆一郎「食品成分による β 2 アドレナリン受容体発現調節メカニズムの解明と骨格筋機能改善への応用」生命科学系学会合同年次大会、2017

[2] 近澤未歩、清水誠、井上順、佐藤隆一郎「 β 2 アドレナリン受容体の発現を促進する食品成分の探索とその成分による筋機能改善効果」日本農芸化学会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。