

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：43202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17746

研究課題名(和文)機能性トリテルペンのがん悪液質性筋萎縮に対する改善効果の検証

研究課題名(英文)Preventive effects of triterpenes cancer cachexia-induced muscle atrophy

研究代表者

藤田 恭輔(Fujita, Kyosuke)

富山短期大学・その他部局等・講師

研究者番号：70707538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物性食品に含まれるオレアノール酸などのトリテルペンとよばれる成分が、がん悪液質が引き起こす筋萎縮に改善効果を示すかを、筋肉の細胞レベルおよび動物の個体レベルで明らかにすることを目的とした。オレアノール酸の効果は、今回使用したがん悪液質性の筋萎縮モデル細胞においては明確な改善効果を示さなかったものの、がん悪液質を引き起こしているマウスに対してオレアノール酸を含む食餌を与えると筋萎縮を改善することを見出した。また、オレアノール酸等のトリテルペンを含むエゴマ葉を含む食餌もがん悪液質による筋萎縮を改善させ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

がん悪液質とは、多くのがん患者の生活の質を低下させる原因となる、筋肉の衰え(筋萎縮)・体重減少・食欲不振などの症状である。現在、がん悪液質に対する効果的な治療法が確立されておらず、新規の治療法を見出す必要がある。本研究成果は、エゴマ葉などのトリテルペンを多く含む食品の摂取が、がん悪液質性の筋萎縮に対する新規の食事治療法の一つになりうることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Triterpenes such as oleanolic acid are contained in foods of plant origin. In this study, we investigated the effects of triterpenes on cancer cachexia-induced muscle atrophy in vitro and in vivo. We show that oleanolic acid had no effect on in vitro atrophy model. cancer cachexia-induced muscle atrophy was suppressed in the mice fed oleanolic acid-containing diet or perilla leaf-containing diet.

研究分野：栄養学

キーワード：筋萎縮 トリテルペン オレアノール酸 がん悪液質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん悪液質は、筋萎縮、脂肪減少、食欲不振、全身衰弱などを特徴とする全身性の代謝異常であり、主な原因は炎症性サイトカイン増加であり、それに伴うインスリン抵抗性の悪化も増悪因子として知られる。がん悪液質性筋萎縮に対する治療薬はないため、新規の有効な療法が必要とされる。近年の報告で、骨格筋特異的に TGR5 過剰発現するとマウスの筋肉量が増えることが示された。これらの知見より、TGR5 の活性化が筋萎縮を抑制することが期待された。オレアノール酸、ウルソール酸、ベツリン酸は、28 位にカルボキシル基を持つトリテルペンであり、抗炎症作用、抗酸化作用などを示すことから、『機能性トリテルペン』と称されている(図1)。近年オレアノール酸、ウルソール酸、ベツリン酸はいずれも TGR5 を刺激する作用を持つことが報告された。

我々のこれまでの研究で、大腸炎モデルマウスがオレアノール酸を摂取すると TGR5 が活性化し、炎症反応が抑えられることを明らかにしてきた。そこで、天然の TGR5 刺激成分である機能性トリテルペンが、がん悪液質性筋萎縮の改善に利用可能ではないかと着想するに至った。また最近の研究で、エゴマ葉抽出物に TGR5 活性化作用が見られることを明らかにした。エゴマ葉には、機能性トリテルペンが豊富に含まれると予測している。オリーブ葉以外の食用植物で TGR5 活性化作用が見出されたのは、エゴマ葉が初めてである。この成果を発展させるため、エゴマ葉ががん悪液質性筋萎縮の改善に利用可能ではないかと着想するに至った。

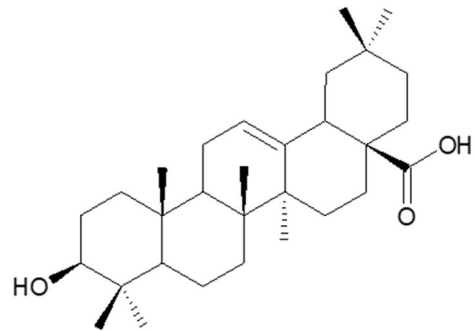


図1. オレアノール酸の構造

2. 研究の目的

本研究では、TGR5 の刺激成分となる機能性トリテルペンやエゴマ葉についてがん悪液質性筋萎縮に対する効果を *in vitro* および *in vivo* において検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* によるオレアノール酸のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

がん悪液質性筋萎縮の *in vitro* モデルとして、マウス横紋筋由来 C2C12 細胞を 2%ウマ血清で筋管細胞に分化させた細胞を TNF- α で処理したモデルを使用した。筋萎縮の評価として、ミオシン重鎖の発現量をウェスタンブロット法により定量した。また、筋管線維の径の測定はミオシン重鎖を免疫健康染色することで観察し測定することで行った。

(2) *in vivo* によるオレアノール酸のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

マウス (C57BL/6、6 週齢、雄性) に対し、Lewis 肺癌 (LLC) 細胞を腹腔内に移植した。移植した日より、オレアノール酸を 0.05% 添加した飼料を自由摂餌させた。移植後 10 日後に前肢の筋力を測定後、安楽死させ血液、腓腹筋を採取した。血清中の炎症性サイトカイン濃度は、ELISA 法により測定を行った。血糖値はマウス用血中グルコース濃度測定装置(ラボグルコ)を用いて、5 時間絶食後に測定した。

(3) *in vivo* によるエゴマ葉のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

マウス (C57BL/6、6 週齢、雄性) に対し、Lewis 肺癌 (LLC) 細胞を腹腔内に移植した。移植した日より、エゴマ葉粉末を 2% 添加した飼料を自由摂餌させた。移植後 12 日後に前肢の筋力を測定後、安楽死させ血液、腓腹筋を採取した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* によるオレアノール酸のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

マウス横紋筋由来 C2C12 細胞を、2%ウマ血清により筋管細胞に分化させたのちに TNF- α で処理することで、ミオシンの発現量および筋管細胞の径が、TNF- α 未処理の細胞より低下した。TNF- α の処理と同時にオレアノール酸を添加しても、TNF- α による筋管細胞の萎縮は改善されなかった。C2C12 細胞を 2%ウマ血清で分化誘導を行う段階で、TNF- α 処理するとミオシンの発現誘導が抑制されたが、オレアノール酸を同時に添加してもミオシンの発現抑制には影響を示さなかった。これらの結果より、TNF- α による *in vitro* の悪液質性の筋萎縮モデルに対して、オレアノール酸は影響を示さないことが明らかとなった。

(2) *in vivo*によるオレアノール酸のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

がんを移植後 10 日間の体重変化においては 4 群間で差異は見られなかった。また、精巣上体脂肪量に対して、オレアノール酸は影響を与えなかった。普通食を与えたマウスは、がんを移植することで 10 日後に握力の低下および腓腹筋の重量の減少が見られた。一方で、オレアノール酸混餌食群においては、握力や腓腹筋の重量はがんを移植しても変化しなかった。がん移植群では糖代謝の異常により空腹時血糖値の上昇がみられるが、オレアノール酸による影響は見られなかった。血中のサイトカイン濃度を検証したところ、普通食マウスにおいてはがん移植により、TNF- α の濃度は上昇せず IL-1 β の濃度の上昇が見られた。オレアノール酸添加食を与えると、がん移植マウスの IL-1 β 濃度が有意に低下した。これらの結果より、がん悪液質モデルマウスの筋萎縮に対して、オレアノール酸摂取が有効性を示すことが明らかとなった。そのメカニズムの一つとして、がん移植による IL-1 β の濃度上昇を抑制することが考えられた。

(3) *in vivo*によるエゴマ葉のがん悪液質性筋萎縮に対する効果の検証

がんを移植後 14 日間の体重変化においては 4 群間で差異は見られなかった。普通食を与えたマウスは、がんを移植することで 14 日後に握力の低下、腓腹筋の重量の減少が見られた。一方で、2%エゴマ葉食を与えたマウスにおいては、握力や腓腹筋の重量はがんを移植しても変化しなかった。TGR5 受容体の *in vitro* 活性評価系において、エゴマ葉抽出物は TGR5 を活性化させた。また、LC/MS 分析によりエゴマ葉において TGR5 アゴニスト作用を有するオレアノール酸、ベツリン酸、ウルソール酸といったトリテルペンが検出された。これらの結果より、がん悪液質モデルマウスの筋萎縮に対して、エゴマ葉の摂取が有効性を示すことが明らかとなった。TGR5 の活性化は筋萎縮に対し抑制的に作用すると考えられているが、エゴマ葉は TGR5 を活性化する成分を含んでいることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤田恭輔	4. 巻 56
2. 論文標題 エゴマ葉の胆汁酸吸着能の検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 富山短期大学紀要	6. 最初と最後の頁 119-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Shiro, Fujita Kyosuke, Nishida Takeshi, Imura Johji	4. 巻 5
2. 論文標題 Ameliorative effect of animal bile preparations on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 67～74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/tkm2.1094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Yamamoto Shota, Funayama Keisuke, Fujita Kyosuke, Tabuchi Yoshiaki, Ikari Akira, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Crosstalk between Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase and a volume-regulated anion channel in membrane microdomains of human cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 3792～3804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田恭輔、茶谷大輝、濱田和花、渡辺志朗
2. 発表標題 がん悪液質モデルマウスに対するオレアノール酸の効果
3. 学会等名 日本薬学会140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恭輔、茶谷大輝、濱田和花、渡辺 志朗
2. 発表標題 がん悪液質モデルマウスに対するエゴマ葉とその成分の効果
3. 学会等名 第15回日本栄養改善学会北陸支部会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茶谷大輝、濱田和花、藤田恭輔
2. 発表標題 オレアノール酸ががん悪液質モデルマウスに与える影響
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田和花、茶谷大輝、藤田恭輔
2. 発表標題 エゴマ葉ががん悪液質モデルマウスに与える影響
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恭輔、濱田和花、茶谷大輝、渡辺志朗
2. 発表標題 がん悪液質モデルマウスに対するエゴマ葉の効果
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恭輔
2. 発表標題 コール酸誘導性肝傷害および肝臓脂質代謝変動に対する防己黄耆湯の効果
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恭輔、渡辺志朗、柳原五吉、宮野加奈子、上園保仁
2. 発表標題 悪液質性筋萎縮モデルマウスに対するエゴマ油の効果検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----