

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11792

研究課題名(和文) 海洋性カロテノイドの新規作用機序を介した筋萎縮予防効果の解明

研究課題名(英文) Effect of marine carotenoids against muscle atrophy and its mechanism

研究代表者

平坂 勝也 (Hirasaka, Katsuya)

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・准教授

研究者番号：70432747

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)：カロテノイド類アスタキサンチン(AX)は抗酸化力を有することが明らかにされている。本研究では、骨格筋内ミトコンドリアにおけるAXの作用とミトコンドリア障害によって引き起こされる筋萎縮に対するAXの効果について検討した。AX食群では、筋萎縮モデルを施しても筋重量減少及び筋線維横断面積の減少が認められなかった。さらに、AX食群は尾部懸垂によって誘導されたミトコンドリア由来活性酸素種ROS産生を有意に阻害し、ミトコンドリアに集積しやすいことがわかった。以上の結果より、AXはミトコンドリア由来の酸化ストレスを軽減することにより、ミトコンドリア機能を保持することで筋萎縮予防に効果的である示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、海洋性カロテノイド類アスタキサンチンがミトコンドリアにおいて作用し、筋萎縮予防に効果的であるという科学的根拠を示すことができた。従って、アスタキサンチンを含む機能性食品を用いて高齢者のQOL向上に不可欠な運動能力の維持を図ることは、エクササイズやリハビリテーションに頼ることが困難な高齢者にとって極めて有用な方策となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Astaxanthin (AX) is a carotenoid that exerts potent antioxidant activity and acts in the lipid bilayer. This study aimed to investigate the effects of AX on muscle-atrophy-mediated disturbance of mitochondria, which have a lipid bilayer. Tail suspension was used to establish a muscle-atrophied mouse model. AX diet fed to tail-suspension mice prevented loss of muscle weight, inhibited the decrease of myofiber size, and restrained the increase of hydrogen peroxide (H₂O₂) production in the soleus muscle. To confirm the AX phenotype in the soleus muscle, we examined its effects on mitochondria using Sol8 myotubes derived from the soleus muscle. We found that AX was preferentially detected in the mitochondrial fraction; it significantly suppressed mitochondrial reactive oxygen species production in Sol8 myotubes. These results suggested that AX protected the functional stability of mitochondria, alleviated mitochondrial oxidative stress, and thus, prevented muscle atrophy.

研究分野：栄養学

キーワード：海洋性カロテノイド 筋萎縮 ミトコンドリア 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、寝たきり患者が急増している我が国では、寝たきりによる筋萎縮のメカニズム解明とその予防法の開発が待たれている。寝たきりや不動状態によって引き起こされる廃用性筋萎縮では、筋タンパク質の合成よりも分解が亢進することによって筋萎縮が引き起こされる。我々は、宇宙フライトやベッドレストに暴露した骨格筋内では、過剰な酸化ストレスが生じることで、筋タンパク質分解酵素であるユビキチンリガーゼの発現を誘導することを発見した。加えて、萎縮した骨格筋ではミトコンドリア形態異常や過剰な酸化ストレスの産生が観察されるという論文は多数存在するが、ミトコンドリア機能異常を介した筋萎縮のメカニズムは未だ不明な点が多い。

一方、近年の研究から、植物、藻類、微生物および動物など広範囲に含まれるカロテノイド類は強い抗酸化作用を有することから、健康維持のみならず酸化ストレスが関わりとされる様々な生活習慣病や老化プロセスの予防に有効である可能性が指摘されている。例えば、回遊魚であるサケは長期間の遊泳による筋損傷（ミトコンドリアからの酸化ストレスが原因と考えられている）を防ぐためにアスタキサンチン（AX）を筋肉内に蓄積している。一般的に、カロテノイド類は脂溶性であるため、細胞膜上で脂質ヒドロペルオキシドラジカルを消去する作用があるということが知られてきた。興味深いことに、海洋性カロテノイドである AX は膜構造を有しているミトコンドリアに比較的集積しやすいことが報告された。従って、AX に代表される海洋性カロテノイド類はミトコンドリアに直接作用し、筋萎縮予防効果を発揮している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

ミトコンドリアへ集積しやすい海洋性カロテノイドが新たな筋萎縮予防の鍵となると仮定し、本研究課題では、骨格筋内ミトコンドリアにおける AX の作用とミトコンドリア障害によって引き起こされる筋萎縮に対する AX の効果について解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

【動物実験】

7週齢、C57/BL6J 雄マウスは $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、午前 6 時から午後 6 時までを明期として飼育した。実験動物の取り扱いには長崎大学実験動物取り扱い指針に則して行った。1 週間の予備飼育後、マウスは普通食あるいは 0.2% AX 食を 4 週間自由摂取させた後、筋萎縮モデルとして尾部懸垂を 2 週間行った。実験群は普通食コントロール群、普通食尾部懸垂群、AX 食コントロール群、AX 食尾部懸垂群の 4 群を用いた。尾部懸垂終了後、前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、ヒラメ筋重量を測定し、 -80°C にてサンプルを保存した。

【蛍光免疫染色】

ヒラメ筋は重量を計測した後、すぐにイソペンタンと液体窒素を用いて急速冷却し、凍結切片を作製した。クリオスタットの庫内を -20°C に下げ、薄切 ($5\mu\text{m}$) し、スライドグラスに付着させた。室温で風乾し、冷アセトンで固定した。固定後、洗浄を行い、5% ブロックエース（雪印メグミルク株式会社製）を含む PBS (-) で室温・1 時間反応させた。次に 1 次抗体として anti-myosin heavy chain (MHC) type I (BA-F8), anti-MHC IIa (SC-71) および anti-MHC IIb (BF-F3) (DSHB, Iowa City, IA, USA) と 4°C で一晩反応させた。2 次抗体として anti-mouse Alexa Fluor 350 IgG2b, anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG1 および anti-mouse Alexa Fluor 555 IgM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と室温で 1 時間反応させ、洗浄後、封入した。

【骨格筋内ミトコンドリア H_2O_2 産生】

骨格筋は CP-1 緩衝液 (100 mM KCl , 50 mM Tris-HCl , 2 mM EGTA , $\text{pH } 7.4$) にてホモジナイズし、 $500 \times \text{g}$, 4 、 10 分間遠心を行った。遠心後、上清はさらに $10,500 \times \text{g}$, 4 、 10 分間遠心し、沈殿物を得た。沈殿物に 5 mM MOPS ($\text{pH } 7.4$), 70 mM sucrose , 220 mM mannitol を含む緩衝液を加え、粗ミトコンドリア画分とした。30 μg ミトコンドリア画分は $50\text{ }\mu\text{M Amplex Red}$, $2\text{ U/mL horseradish peroxidase}$, $30\text{ U/mL superoxide dismutase (SOD)}$, 10 mM succinate , $10\text{ }\mu\text{M antimycin A}$ と 30 分間反応させ、蛍光マイクロプレートリーダーにて測定した。スタンダードは H_2O_2 を用いた。

【細胞培養】

マウスヒラメ筋由来細胞である Sol8 筋芽細胞は 37°C 、5% CO_2 の条件下で、増殖培地 [$100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、 100 U/ml ペニシリン、10% 牛胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] で培養した。Sol8 筋芽細胞が 100% コンフルエントになったところで 2% horse serum を含む DMEM に交換し、分化させた。

【ジヒドロエチジウム (DHE) によるミトコンドリア O₂ 消去活性】

96 穴ブラックプレートに、Sol8 筋芽細胞を播種し、分化させた。アスタキサンチンを添加し、24 時間培養を行った。その後、10 mM Succinate および 10 μM Antimycin A、5 μM DHE を添加した。37 °C で遮光培養 1 時間後、ミトコンドリア由来酸化ストレス消去活性を測定した。ミトコンドリア酸化ストレス消去活性は、蛍光マルチモードプレートリーダー Cytation3 で励起波長 518 nm、蛍光波長 605 nm における蛍光強度を測定した。

【AX の細胞内局在】

上記で調製したミトコンドリア画分を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過後、その 20 μl を HPLC 分析に供した。使用した HPLC には、以下のシステムを用いた。高速液体カラムクロマトグラフィー自動分析システム (LC-2000 plus series、日本分光社製) を用い、その内訳はオートサンプラーには AS-2057 を、送液ポンプには PU-2080 を、カラムオープンには CO-2065 を、検出器には UV-2075 を用いた。使用した分析用カラムは島津社製逆送分配カラム TSKgel ODS-80Ts (3.9 mm × 15 cm) を用いた。測定条件は、試料注入量 10 μl、移動相流量 2.4 ml/min、カラム保持温度 40 °C、吸収波長 480 nm で、ピーク面積法により抽出液の AX 量を求めた。

4 . 研究成果

普通食群では、尾部懸垂により、筋重量の減少が認められた。これに対して、AX 食群では、筋萎縮モデルを施しても遅筋線維タイプ I、中間筋線維タイプ IIa 線維が大部分を占めるヒラメ筋では筋重量減少及び筋線維横断面積の減少が認められなかった (図 1)。

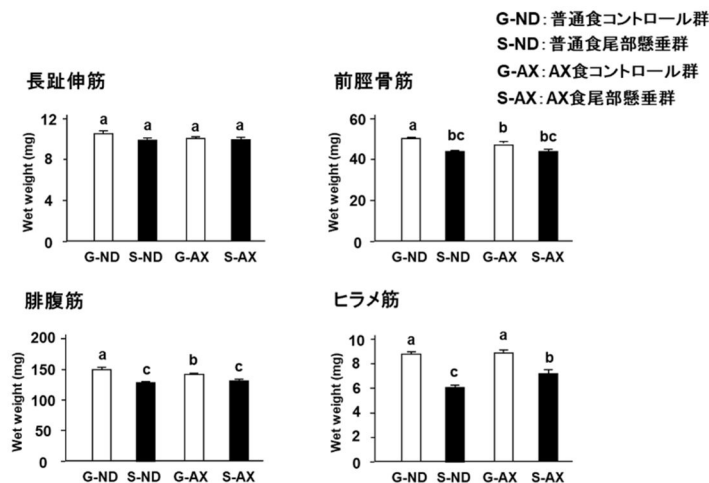


図 1. 尾部懸垂による筋重量減少に対するアスタキサンチンの効果

次に、尾部懸垂による筋線維萎縮に対するアスタキサンチンの効果について、ヒラメ筋を用いて解析を行った。普通食群では尾部懸垂によりタイプ I 及び IIa 線維両者とも筋線維萎縮が認められた。これに対して、AX 食群は、尾部懸垂による遅筋線維タイプ I、中間筋線維タイプ IIa 線維の萎縮に対して抵抗性を示した (図 2)。

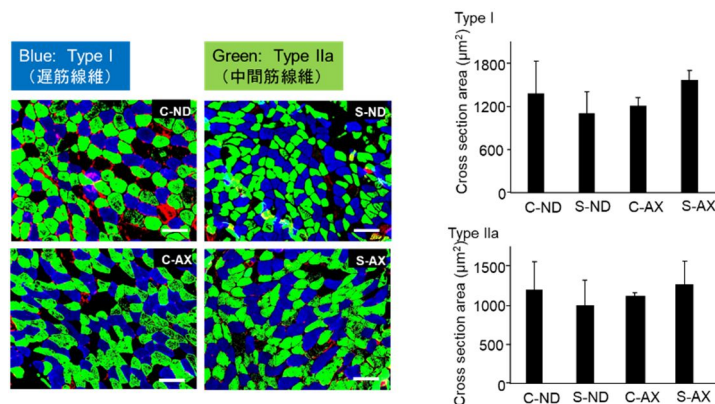


図 2. 尾部懸垂による筋線維萎縮に対するアスタキサンチンの効果

萎縮した骨格筋ではミトコンドリア内で活性酸素種（ROS）が過剰に産生されることが知られている。そこで、ミトコンドリア由来 ROS を測定したところ、尾部懸垂によりミトコンドリア由来 ROS 産生が有意に増大していることが確認された。一方、AX 食群ではミトコンドリア由来 ROS 産生が抑制されることがわかった（図 3）。

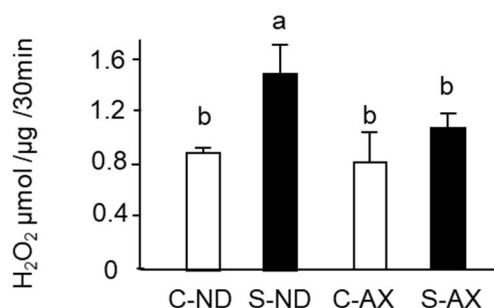


図 3. 筋萎縮によって誘導されたミトコンドリア由来 ROS 産生に対するアスタキサンチンの効果

動物実験で得られた AX の効果を詳細に確かめるためにマウスヒラメ筋由来筋細胞 Sol8 を用いて、AX のミトコンドリアでの作用機序を解析した。ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質複合体 III の阻害剤である Antimycin A を処理するとミトコンドリア由来 ROS の産生が増大した。AX を処理した群では AX の濃度依存的に Antimycin A 誘導性のミトコンドリア由来 ROS の産生が抑制されることがわかった（図 4）。

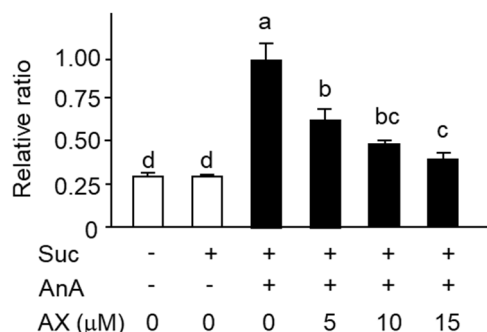


図 4. ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質複合体 III 由来 ROS 産生に対するアスタキサンチンの効果

加えて、100 nmol の AX を Sol8 筋管細胞に処理したところ、筋管細胞ミトコンドリア画分において約 1 nmol 蓄積することがわかった（表 1）。

表 1 . Sol8 筋管細胞ミトコンドリア画分における AX 含量

AX treatment	AX content (nmol)	
	Cytosol	Mitochondria
0 nmol	N.D.	N.D.
100 nmol	0.09 ± 0.01	1.07 ± 0.02

以上の結果より、AX はミトコンドリア由来の酸化ストレスを軽減することにより、ミトコンドリア機能を保持することで筋萎縮予防に効果的である示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Khan Luqman, Sato Katsumi, Okuyama Shinichi, Kobayashi Takeshi, Ohashi Kazumasa, Hirasaka Katsuya, Nikawa Takeshi, Takada Kunio, Higashitani Atsushi, Abiko Kenji	4. 巻 106
2. 論文標題 Ultra-high-purity iron is a novel and very compatible biomaterial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 103744 ~ 103744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2020.103744	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Sun Luchuan yang, Miyaji Nobuyuki, Yang Min, Mills Edward M., Taniyama Shigeto, Uchida Takayuki, Nikawa Takeshi, Li Jifeng, Shi Jie, Tachibana Katsuyasu, Hirasaka Katsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Astaxanthin Prevents Atrophy in Slow Muscle Fibers by Inhibiting Mitochondrial Reactive Oxygen Species via a Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 379 ~ 379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13020379	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Wang Yao, Wang Qin, Hirasaka Katsuya, Hara Kenji, Taniyama Shigeto, Tachibana Katsuyasu	4. 巻 99
2. 論文標題 Relationship between the characteristics of rigor mortis related actomyosin and muscle fiber types in the ordinary muscle of various fishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 6042 ~ 6048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsfa.9880	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 該当する
1. 著者名 Okimura Takasi, Jiang Zedong, Komatsubara Hirofumi, Hirasaka Katsuya, Oda Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic effects of an orally administered edible seaweed-derived polysaccharide preparation, ascophyllan HS, on a Streptococcus pneumoniae infection mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.053	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 該当する

1. 著者名 Takeuchi Seiji, Honma Kohei, Hirasaka Katsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Byssus production ability and degree of byssal gland development in the infaunal clam <i>Ruditapes philippinarum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Zoologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/azo.12307	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平坂勝也、Sun Luchangyang、宮司進之、楊 敏、内田貴之、二川健
2. 発表標題 尾部懸垂による筋萎縮に対するアスタキサンチンの効果
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会 第35 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平坂勝也、Sun Luchangyang、宮司進之、楊 敏、内田貴之、二川健
2. 発表標題 骨格筋内ミトコンドリア機能と筋萎縮に対するアスタキサンチンの作用
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田貴之、三木裕加里、杉浦宏祐、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、小林剛、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 筋肉におけるミトコンドリアタンパク質Mfn2の役割
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Luchuanyang Sun, Nobuyuki Miyaji, Min Yang, Edward M. Mills, Shigeto Taniyama, Takeshi Nikawa, Katsuyasu Tachibana, Katsuya Hirasaka
2. 発表標題 Anti-oxidant and protective effects of astaxanthin on mitochondrial dysfunction in sol8 myotubes
3. 学会等名 2020年度日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Min Yang, Luchuanyang Sun, Yasunosuke Kawabata, Takahiro Maegawa, Shigeto Taniyama, Katsuyasu Tachibana, Katsuya Hirasaka
2. 発表標題 Balenine, imidazole dipeptide, induces activation of superoxide dismutase in myotubes
3. 学会等名 2020年度日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平坂勝也、Sun Luchangyang、宮司進之、季紀豊、足立勝、楊 敏、吉村智大、齋藤かなえ、王 曜、谷山茂人、二川健、橘勝康
2. 発表標題 アスタキサンチンの筋萎縮に対する効果とミトコンドリアでの作用機序
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田貴之、三木裕加里、坂下禎宏、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、東端晃、小林剛、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 ミトコンドリアを介した無重力ストレス感知機構の解明
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平坂勝也、平本茂、八幡信広、谷山茂人、二川健、橘勝康
2. 発表標題 アルキルレゾルシノールの筋萎縮予防効果
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平坂勝也、Sun Luchangyang、宮司進之、季紀豊、足立勝、楊敏、谷山茂人、二川健、橘勝康
2. 発表標題 アスタキサンチンのミトコンドリアにおける抗酸化作用と筋萎縮予防効果の関係
3. 学会等名 2019年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuya Hirasaka, Mills Edward M, Takayuki Uchida, Ayako Ohno, Takeshi Nikawa
2. 発表標題 New aspect of mitochondrial uncoupling protein (UCP): identification of UCP3 interacting proteins
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (MBSJ2019)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

海洋未来イノベーション機構
<https://ahs-mn.localinfo.jp/>

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
研究 分 担 者	二川 健 (Nikawa Takeshi) (20263824)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関