

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06221

研究課題名(和文)水産資源由来脂質による筋機能改善効果とその作用機構解析

研究課題名(英文)Effect of marine lipids on skeletal muscle function

研究代表者

別府 史章 (Beppu, Fumiaki)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：10707540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚介類、底生生物の脂質抽出物からC2C12細胞の筋管サイズ増大効果を示す成分を複数見出し、一例としてヒト由来脂質は転写因子FoxOを介した筋タンパク質分解関連遺伝子の発現制御に関与することが推察された。また、老化モデルSAMP8マウスにおける魚油の筋萎縮予防効果を認め、EPA/DHAによる筋細胞における酸化ストレスおよび小胞体ストレスの抑制作用が一部関与する可能性が示唆された。以上、筋機能維持・向上に有効な食品成分として水産脂質の利用展開へ向けた基礎知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、健康維持・増進に重要な骨格筋機能の制御に関わる脂質成分を水産生物資源を中心に探索し、筋形成および代謝調節作用を示す脂質や脂質画分を複数見出した。特に底生生物や深海性魚類に特徴的な脂質成分の筋形成促進作用を新たに示した点は、未利用水産資源の機能性食素材としての応用を考える上で非常に意義深い。今後in vivoでの機能効果検証と作用機構解析へ展開し、これら脂質構造に起因する筋機能制御作用を明らかにすることで、新たな筋疾患予防法の開発へも貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We found several lipid extracts from marine organisms that enhance myogenesis and increase myotube size in C2C12 myoblast cells. For example, phospholipids from starfish decreased the expression of FoxO and its target genes of Atrogin-1 and MuRF1 and eventually increased myotube size. In aging model SAMP8 mice, fish oil prevented muscle atrophy, and the possibility that EPA/DHA suppressed oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in muscle cells was suggested. Our results suggest the potential use of marine lipids as bio-active food factors that are beneficial for muscle function.

研究分野：脂質機能化学、分子栄養学

キーワード：水産脂質 n-3系多価不飽和脂肪酸 骨格筋 筋萎縮予防 筋管形成 老化 酸化ストレス グリセロリン脂質

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会にある我が国において、健康寿命の問題を背景に骨格筋機能の維持が重要な健康課題である。骨格筋は運動機能に加え、主要な代謝器官としての役割を担うため骨格筋の量や活性の低下は、生体全体のエネルギー消費を低下させるため肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病の病態形成とも関連が深い。自立した健康的な生活を長く継続させるために骨格筋機能の維持・向上を目的とした運動が励行されるが、高齢者において継続的な運動は困難な場合が多い。そのため、骨格筋機能制御に関わる食品成分による栄養学的なアプローチが求められている。サルコペニアといった加齢に伴う筋肉の病態の原因として、運動不足や低栄養、慢性炎症、酸化ストレスが挙げられる。特に、慢性炎症や酸化ストレスはインスリン抵抗性を介した代謝異常と関連が深く、骨格筋においては筋タンパク質代謝バランスが崩れた結果、筋委縮が導かれる。水産脂質に特徴的なエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)といったn-3多価不飽和脂肪酸(PUFA)は栄養学的な重要性に加え、抗炎症効果や糖・脂質代謝改善効果など優れた健康機能性が知られている。さらに生物種の多様性により、n-3PUFAはトリアシルグリセロール、リン脂質、糖脂質と様々な脂質構造中に存在する。この点に注目し、これまでに申請者らは魚油やサケ卵、ヒトデ、海藻脂質成分の抗肥満効果や糖・脂質代謝改善作用を明らかにしてきた。また、n-3PUFAだけでなく褐藻カロテノイドの高血糖改善効果や関連する炎症抑制作用ならびに骨格筋における糖輸送タンパク質 GLUT4 を介した糖代謝制御作用を明らかにした。これらの結果から、水産脂質の多様性および特徴的な化学構造が骨格筋機能維持・向上に有益な効果を示す可能性を考えた。水産脂質に特徴的な脂質構造に着目した評価により、水産資源の新たな機能性の解明と機能性食素材としての応用へつながらと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、老化に伴い低下する筋機能の維持・増進のための水産脂質によるアプローチとして、様々な水産物の抽出油や分画物の有効性とその作用機構解明を目的とする。評価する水産脂質は、これまでに抗肥満効果や糖・脂質代謝改善、抗炎症作用が示された魚油をはじめ、深海性魚介類や底生生物を中心に研究対象とした。筋機能としては運動機能を支える筋量の維持、骨格筋における代謝および骨格筋が産生し他臓器と関連したエネルギー代謝調節にかかわる生理活性物質マイオカインの発現制御に注目した。

3. 研究の方法

- (1) マウス由来筋芽細胞 C2C12 を用いたスクリーニングでは、筋管が形成される筋分化過程あるいは筋管形成後に各種水産脂質で処理することで筋形成能(筋管の数やサイズ)、代謝特性およびマイオカイン産生能への影響を評価した。
- (2) 培養細胞の結果から効果が期待できる水産脂質の筋機能維持、増進効果を *in vivo* 評価した。食品成分による筋機能評価について坐骨神経切除や尾部懸垂処置による廃用性筋委縮モデルを使った研究例は多いが、サルコペニアの病態形成に関わる代謝や酸化ストレス、炎症などの加齢性変化を考慮し、本研究では老化促進モデルマウスを用いた。また、骨格筋機能に関わる基本的な効果を調べるため健康な C57BL/6J マウスを用いた機能評価も行った。いずれも飼料は AIN-93 を基本組成とし、試験群には脂質源である大豆油の一部を試料油と置換した飼料を調製した。SAMP8 マウスは加齢に伴う代謝機能の低下や慢性的な酸化ストレスレベルの増加といったヒトと共通する老化現象とともに、25-30 週齢をピークに筋重量が低下することが報告されている。よって、本研究では 12 週齢から 36 週齢まで魚油摂取による筋委縮予防効果を検証した。

4. 研究成果

筋管形成促進効果を示す水産脂質成分の探索

深海性魚介類や底生生物、魚卵を中心にした脂質抽出物のスクリーニングにより C2C12 細胞の筋管形成を促進する脂質成分を複数見出した。結果の一例として、道南近郊で採集されたイトマキヒトデ脂質をシリカゲルクロマトグラフィーにより中性脂質と極性脂質である糖脂質およびリン脂質画分に分けて供試した結果、中性脂質画分およびリン脂質画分に筋管サイズ増大効果が認められた(図 1)。さらに詳細な分画と試験により、特に強い活性がホスファチジルコリン(PC)画分に認められた。ヒトデ PC 処理した細胞では筋管サイズに加え筋管マーカであるミ

オシン重鎖の発現が亢進するとともに筋委縮に関わる転写因子 FoxO を介したユビキチンリガーゼ MuRF1 および Atrogin-1 の mRNA 発現制御が示唆された。さらに筋芽細胞の分化促進にも関わるマイオカイン IL-15 の mRNA およびタンパク質発現量にも増加が認められ、ヒトデ PC による筋タンパク質代謝制御を介した筋委縮/機能低下予防効果の可能性を示した。さらに LC-ToF/MS および LC-MS/MS を用いてヒトデ PC の分子種分析によりその特性を調べた結果、アラキドン酸 (AA) あるいは EPA を結合した PC 分子種が豊富に含まれていた。一方、比較対照で用いた大豆 PC あるいは EPA や AA を遊離脂肪酸の形態で処理した場合には上記の効果は認められず、ヒトデに特徴的な PC 分子種組成や構造の重要性が推察される。本研究により、特有な分子種組成と組成を持つヒトデ脂質による筋細胞の機能制御作用が明らかになるとともに、PC 分子種の筋分化における作用の違いを示唆する興味深い知見が得られた。

また、運動や特定の栄養素が骨格筋機能に重要なミトコンドリア合成を引き起こす刺激となる。この点に着目したスクリーニング評価により、魚卵の一種に由来する極性脂質画分に C2C12 筋管細胞における AMPK 活性化およびミトコンドリア増生に関わる PGC-1 mRNA 発現増加作用を見出した。さらに運動刺激にตอบสนองして分泌されるマイオカイン IL-15 mRNA 発現増加が認められ、筋細胞機能の活性化や恒常性維持への有効性が示唆された。

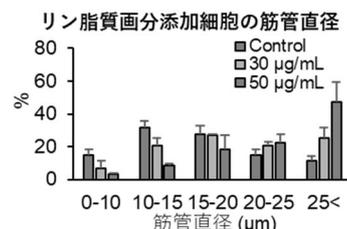
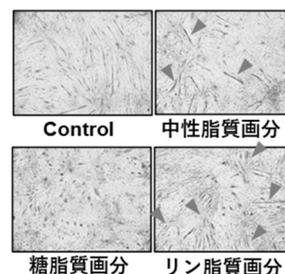


図1 ヒトデ脂質の筋管サイズ増大効果

水産脂質の筋委縮予防効果に関する老化モデル SAMP8 マウスを用いた評価

既報の通り対照群では 28 週齢から 36 週齢にかけて骨格筋重量および筋管直径の有意な低下が認められた。一方、魚油摂取群では重量に差は見られなかったものの、筋断面の組織学的所見から腓腹筋および長趾伸筋において筋管直径およびミオシン重鎖タンパク質発現レベルの低下が抑制される傾向が認められた (図 2)。さらに対照群では骨格筋委縮と関連が深い過酸化脂質レベルおよび炎症性サイトカイン (TNF、IL-1) 小胞体ストレス (CHOP、GADD34) の遺伝子発現が上昇したが、魚油群では有意に抑制された。また、魚油摂取群では解糖系酵素の活性が高い速筋繊維主体の長趾伸筋において、ミトコンドリア増生に関わる PGC-1 および ACOX、MCAD、CPT1 といった脂肪酸酸化に関わる酵素遺伝子の発現増加が認められた。すでに魚油摂取が骨格筋に占める筋繊維の遅筋/速筋割合を増加させることがラット試験で示されている。これと一致し、SAMP8 マウス骨格筋において魚油摂取による速筋から遅筋繊維タイプへ代謝特性の変化が示唆された。魚油摂取による代謝特性の変化と筋量維持効果との関連性は明らかでなくさらに詳細な解析が必要であるが、本研究では、SAMP8 マウス骨格筋における魚油の筋機能制御の一端を明らかにした。COVID19 による活動制限により、その他水産脂質の評価は後ろ倒しとなり現在も鋭意継続中であるが、上記の取組みにより EPA/DHA が豊富な各種水産脂質の筋機能維持・向上効果を評価する上で有用な基礎的知見を得ることができた。

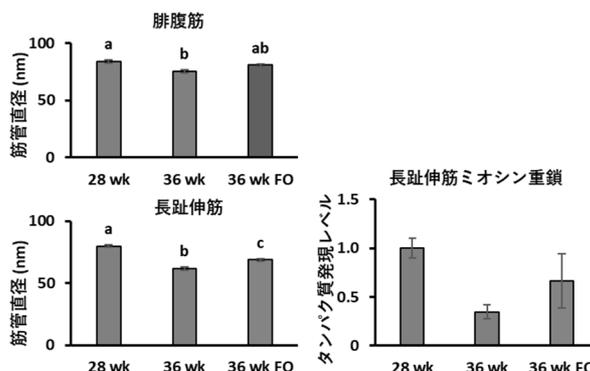


図2 SAMP8マウスにおける魚油の筋量低下抑制効果

C57BL/6J マウスにおける水産脂質の筋機能増進効果の検討

筋管形成モデル C2C12 筋芽細胞の筋分化を促進し、筋管サイズを増大させた深海性魚介類由来の脂質成分に着目し検討した。5 週齢マウスに本脂質成分を 2% 含む飼料で 8 週間混餌投与し、体重および各種骨格筋 (腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋) 重量を対照群と比較した。結果、体重およびマウス前脛骨の長さ当たりの各筋組織重量、ミオシン重鎖および筋委縮に関わるユビキチンリガーゼ Atrogin1 および MuRF-1 mRNA 発現量にも投与飼料による影響は認められなかった。筋形成および再生における筋幹細胞の活性化や筋分化は、運動や病的要因による筋損傷刺激に対して顕著な応答を示すため、筋機能の恒常性が保たれた若齢マウスを用いた本実験では筋形成や筋タンパク質代謝への影響が見られなかったと考えられ、筋合成および筋形成が活発なモデルでの更なる検証が必要である。

社会的なニーズの高まりから、食品成分による筋委縮予防効果に関する研究例は国内外で非常に多い。その中で本研究では特に水産資源に着目し有用な脂質成分の探索を行った。これまでに水産脂質中の n-3PUFA の組成や含有する脂質クラスによる効果の違いは明らかになっていたが、

本研究の *in vitro* 試験の結果ではさらに PC 分子種の構造や組成での骨格筋形成作用の違いを明らかにした。この結果は脂質代謝と筋形成機構の関連性を新たに示唆する興味深い知見である。今後の詳細な解析により、筋形成に関わる新たなメカニズムが明らかになることで筋萎縮や筋疾患の新たな予防や治療法の開発が期待される。さらに、現在は活性を示す脂質分子種の同定を進めているが、水産資源に特徴的な脂質化合物の機能性解明により、未利用資源の有効活用へも貢献が期待でき、学術的のみならず産業的にも波及的效果があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinaga Kazuaki, Ishikawa Haruna, Beppu Fumiaki, Gotoh Naohiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Incorporation of Dietary Arachidonic and Docosatetraenoic Acid into Mouse Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 2457 ~ 2461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c07916	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 Takatani Naoki, Taya Daisuke, Katsuki Ami, Beppu Fumiaki, Yamano Yumiko, Wada Akimori, Miyashita Kazuo, Hosokawa Masashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Identification of Paracentrone in Fucoxanthin Fed Mice and Anti Inflammatory Effect against Lipopolysaccharide Stimulated Macrophages and Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 2000405 ~ 2000405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202000405	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 Beppu Fumiaki, Sakuma Aimi, Kasatani Satoshi, Aoki Yoshinori, Gotoh Naohiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Application of Partial Hydrogenation for the Generation of Minor Tocochromanol Homologs and Functional Evaluation of Hydrogenated Tocotrienol-rich Vitamin E Oil in Diabetic Obese Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess20233	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 Miyashita Kazuo, Beppu Fumiaki, Hosokawa Masashi, Liu Xiaoyong, Wang Shuzhou	4. 巻 686
2. 論文標題 Nutraceutical characteristics of the brown seaweed carotenoid fucoxanthin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108364 ~ 108364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108364	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 Takatani Naoki, Sakimura Kana, Nagata Kodai, Beppu Fumiaki, Yamano Yumiko, Maoka Takashi, Hosokawa Masashi	4. 巻 410
2. 論文標題 Identification and tissue distribution of fucoxanthinol and amarouciaxanthin A fatty acid esters in fucoxanthin-fed mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 135318 ~ 135318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2022.135318	査読の有無 無
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 Kakimoto Masaki, Takatani Naoki, Hosokawa Masashi, Beppu Fumiaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Reduction of serum lipid levels in diabetic obese KK-Ay mice using monoalkyldiacylglycerol-rich oil derived from <i>Berryteuthis magister</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-022-01655-5	査読の有無 無
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 Nagao Koji, Ueno Junya, Yoshinaga Kazuaki, Nagai Toshiharu, Mizobe Hoyo, Yoshida Akihiko, Beppu Fumiaki, Tanaka Seiya, Gotoh Naohiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Comparison of Lipoprotein Cholesterol Levels in Golden Syrian Hamster Administrated α -linolenic and α -lipoic Acid Positional Isomers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 609 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess21348	査読の有無 無
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 Chen Liping, Beppu Fumiaki, Takatani Naoki, Miyashita Kazuo, Hosokawa Masashi	4. 巻 87
2. 論文標題 n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylglycerol suppresses inflammation in RAW264.7 cells through Nrf2 activation via alteration of fatty acids in cellular phospholipids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 727 ~ 737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01542-5	査読の有無 無
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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木健朗、亀山美宇、高谷直己、細川雅史、別府史章
2. 発表標題 水産物由来アルキルグリセロールによるC2C12筋管サイズ増大効果
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別府史章、福島葵、高谷直己、細川雅史
2. 発表標題 イトマキヒトデ脂質成分によるC2C12細胞の筋管形成促進効果
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別府史章
2. 発表標題 水産物由来エーテル脂質の新たな健康機能性を探る
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 北海道支部会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿本真幸、高谷直己、細川雅史、別府史章
2. 発表標題 ドスイカ(Berryteuthis magister)由来モノアルキル型中性脂質の2型糖尿病モデルKK-Ayマウスに対する脂質代謝への影響評価
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿本真幸、高谷直己、細川雅史、別府史章
2. 発表標題 糖尿病肥満モデルKK-Ayマウスにおける水産物由来モノアルキル型脂質の 脂質代謝への影響
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富樫咲、別府史章、高谷直己、細川雅史
2. 発表標題 n-3PUFA結合ホスファチジルグリセロールの細胞内脂肪酸調節機構の解明
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 別府史章
2. 発表標題 未利用水産物の可能性を拓げる脂質機能性研究
3. 学会等名 日本栄養食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石井 淑夫（監修）、別府史章（分担）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 618
3. 書名 脂質・脂肪酸関連物質の使いこなし方 - 素材開発・機能創生・応用技術 -	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------