

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11581

研究課題名（和文）抗筋萎縮フラボノイドによって向上する骨格筋の機能とその調節機構の解明

研究課題名（英文）Improvement of skeletal muscle functions by anti-muscle atrophy flavonoids

研究代表者

向井 理恵（MUKAI, Rie）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・准教授

研究者番号：90547978

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）：本研究課題では、廃用性筋萎縮抑制に貢献するフラボノイドが骨格筋の機能を維持できるか否かを検討する課題である。骨格筋の機能破綻のモデルとして、高脂肪食負荷マウスを採用した。抗筋萎縮フラボノイドを混餌で与え、骨格筋のメタボローム解析等を用いて、その機能を評価した。代謝物解析の結果から、抗筋萎縮フラボノイドは酸化型グルタチオンを抑制することを明らかにした。また、当該フラボノイドは抗肥満効果を示したことから、酸素摂取量を測定したところ、フラボノイドによってその値が上昇することを明らかにした。今回の結果では、骨格筋内の酸化ストレスを抗筋萎縮フラボノイドによって抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨格筋の量と機能の維持が健康寿命に関連するとの報告が増えていることから、フラボノイドによる骨格筋の機能調節に主題をおいた研究を展開した。骨格筋の機能調節研究においては、運動や栄養の摂取状況に応じた中枢との連動が着目され、神経やホルモンが骨格筋の機能維持に果たす役割が明らかにされている。本課題は抹消組織（骨格筋）を中心に中枢（視床下部）での変化も併せて解析し、フラボノイドが骨格筋機能へどのような寄与をしているのかについて解明したものである。骨格筋量の維持に貢献するフラボノイドが全身の機能改善にも影響したというこの成果は、骨格筋を維持するための食品成分の利用法に新たな展開を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to examine whether anti-muscle atrophy flavonoid improves the function of skeletal muscle or not. We applied the flavonoid to mice fed a high-fat diet. The change in skeletal muscle was analyzed by metabolome analysis. The results revealed that anti-muscle atrophy flavonoids suppress the amount of oxidized glutathione. In addition, since the flavonoid showed an anti-obesity effect, we measured $\dot{V}O_2$ value. The flavonoid increased the value. Our results demonstrated that anti-muscle atrophy flavonoids could regulate oxidative stress in skeletal muscle.

研究分野：食品機能学

キーワード：フラボノイド 筋萎縮 骨格筋 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

骨格筋量とその機能維持はメタボリックシンドロームの予防や認知機能と関連し、全身代謝にも影響を与えることで健康寿命の延長に繋がることが分かっている。骨格筋量と機能維持には適切な運動と栄養補給が必須である。例えば分岐差アミノ酸が骨格筋合成経路を活性化することや、運動の強度や期間によって骨格筋の糖取り込みやエネルギー代謝が向上するなどである。近年、骨格筋タンパク質の分解機構の解明が行われるに伴い、栄養摂取や運動効果を補助する食品成分の必要性に注目が集まっている。フラボノイドが骨格筋の萎縮予防に効果があるとの知見は2010年に研究代表者が初めて動物実験で明らかにし、その後、尾懸垂試験や坐骨神経切除試験で誘導される急性の廃用性筋萎縮を対象とした研究が報告された。作用メカニズムとしては、骨格筋タンパク質の分解に特異的に関与するユビキチンリガーゼ(Atrogin-1やMuRF1)の発現阻害、骨格筋ミトコンドリアの機能維持などが標的とされている。研究代表者は、ケルセチンなどのフラボノイドについて発表しており、他の研究グループからは、カテキンやゲニステインといったフラボノイドの筋萎縮予防効果が報告された。これらの骨格筋量的調節に対する作用メカニズムの解明から、フラボノイドが骨格筋の質的調節つまり骨格筋の機能に関連した経路を活性化している可能性が示唆されたため、フラボノイドが骨格筋の機能向上に寄与し、全身の代謝を調節するのではないかと、といった研究課題の核心をなす学術的問いを背景として研究を開始した。

2. 研究の目的

フラボノイドが及ぼす骨格筋への有益な効果の限界について正しく理解するためには、異なる評価系を用いた場合の骨格筋への影響と、効果を発揮する機能成分の摂取条件に関して科学的根拠を集積することが必要である。これまでに用いてきた急性の廃用性筋萎縮モデルでの研究は神経切断や、行動制限が施されているため、ヒトでの骨格筋萎縮の要因とやや乖離がある。そこで、本研究では、ヒトの生活に外挿可能な、高脂肪食負荷時に引き起こされる骨格筋の機能破綻と、それに関連する代謝の変化を明らかにし、フラボノイドの投与条件を複数設けることで、骨格筋の機能向上につながるフラボノイドの効果とその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究代表者はこれまでも、骨格筋萎縮を誘発する器具の開発や、廃用性筋萎縮に効果的なフラボノイドの摂取方法を明らかにすることで、当該研究領域を切り開いてきた実績がある。このような、「骨格筋の量」に対するフラボノイドの効果に加え、本申請課題で「骨格筋の質」に対する作用を解明することは、骨格筋を介したフラボノイドの健康増進作用を多方面から理解するために必要であると考えている。その成果は、基礎栄養素との組み合わせや運動との併用効果へ展開させるための基盤情報になり、社会的な意義も高い課題である。

3. 研究の方法

概要：C57BL/6マウスを用いてプレニルフラボノイド(PF)を長期で投与した場合の、骨格筋機能向上効果を明らかにする。骨格筋の機能向上の指標として、全身のエネルギー代謝の亢進、骨格筋内代謝状態の変化、骨格筋レドックスバランスに関連する指標などを解明する。

(1) Pair-Fed 飼育

C57BL/6NS1c、6週齢の雄マウス [日本エスエルシー、静岡、日本]を用いた。12時間で明暗が切り替わる部屋で飼育した。予備飼育期間中はMF固形飼料 [オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本]とオートクレーブ滅菌を施した水道水を自由摂取させた。予備飼育の後、体重測定を行い、6群に分け試験を行った。普通食(C-C)群、普通食低濃度PF(C-LPF)群、普通食高濃度PF(C-HPF)群、高脂肪食(H-C)群、高脂肪食低濃度PF(H-LPF)群、高脂肪食高濃度PF(H-HPF)群の6群に分け、集団飼育で試験を行った。

(2) 自由摂取飼育

C57BL/6NS1c、6週齢の雄マウス [日本エスエルシー、静岡、日本]を用いた。12時間で明暗が切り替わる部屋で飼育した。予備飼育期間中はMF固形飼料 [オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本]とオートクレーブ滅菌を施した水道水を自由摂取させた。4日間、または6日間の予備飼育の後、体重測定を行い、普通食(C-C)群8匹、普通食低濃度PF(C-LPF)群8匹、普通食高濃度PF(C-HPF)群8匹、高脂肪食(H-C)群8匹、高脂肪食低濃度PF(H-LPF)群8匹、高脂肪食高濃度PF(H-HPF)群8匹の6群に分け、個別飼育で試験を行った。餌の量は、毎日測定し、全マウスで同様になるように給餌を調節して実施した。

(3) 解剖

マウスは実験終了後、頸椎脱臼した後に解剖を実施した。視床下部、腓腹筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、大腿四頭筋、肝臓、小腸、腎臓、精巣上体脂肪、皮下脂肪、褐色脂肪を摘出した。解剖終了後、摘出した臓器・組織は液体窒素で凍結させ、-80℃で保存した。今回の検討では、骨格筋類、視床下部、肝臓を対象として解析を行った。

(4) メタボローム解析

-80 で保存していた骨格筋を 2 ml チューブに入れ替え、200 μ l Milli-Q 水を加えた。その後、超音波破砕機の先を組織につけながら、10 秒間破砕した。この超音波破砕を 2~3 周繰り返した。メタボライト抽出用メタノールを 500 μ l 加え、もう一度、超音波破砕機でホモジナイズした。これに、クロロホルム [HPLC 用] を 500 μ l 加え、30 秒間ボルテックスした後、遠心分離にて、上層 500 μ l を回収した。回収した上清を限界ろ過フィルターに 200 μ l 入れ、遠心ろ過した。遠心濃縮機で 2 時間程度ドライアップした。メタボライト溶解用 Milli-Q 水を 50 μ l 加えてボルテックスし、サンプルを溶解した。サンプルバイアルをカチオン分析用、アニオン分析用に分けた。カチオン分析用にはサンプルを溶解した液を 10 μ l 入れた。アニオン分析用にはサンプルを溶解したものをメタボライト溶解用 Milli-Q 水で 10 倍希釈し、10 μ l サンプルバイアルに入れた。徳島大学医科栄養学科にてキャピラリー電気泳動分析計 (CE-MS) による分析を依頼した。その後、110 種類を対象にメタボローム解析を行った。

(5)リアルタイム PCR 分析

骨格筋から RNeasy Plus Mini Kit [QIAGEN, 74134] と RT2 First Strand Kit [QIAGEN, 330404] とを用いて cDNA を調製した。その後、各プライマーを用いて SYBR Green 法にてリアルタイム PCR を実施した。

(6)過酸化脂質解析

2ml マイクロチューブに入った骨格筋に、アスコルビン酸 PBS 溶液を添加した。直径 5 mm のジルコニア製ビーズを 1 個入れ、TissueLyser II で 20 Hz で 2 分間粉碎した。ホモジナイズした腓腹筋をネジ付試験管に移し 1 ml の 50 mM アスコルビン酸 PBS をさらに加えた。1 mM BHT 入りクロロホルムとメタノールを加え 2 分間激しく振り混ぜた。その後、さらに 1 mM BHT クロロホルム、蒸留水を加え激しく振り混ぜ、遠心分離を行った。遠心分離後に下層を新しい試験管に回収し、上層には 1 mM BHT クロロホルムを加えて振り混ぜ、遠心分離を行った。遠心分離により得られた下層と 1 回目に回収した下層と合わせた。回収した下層を窒素ガスにより乾固させた後、1 mM BHT クロロホルム、メタノールを加え、その一部を 1.5 ml マイクロチューブに移した。そこへ 10 mM DPPE を加え、60 度で 30 分間インキュベートした。インキュベートしたサンプル全量を蛍光測定用マイクロプレートに移し、蛍光強度 (Ex 340 nm, Em 390 nm) を測定した。

(7)糞中脂質分析

実験開始前にマウスの糞を一晩凍結乾燥した。糞を乳鉢ですり潰し、茶こしに通るほど細かくした。蓋つき試験管にすり潰した糞に超純水とクロロホルム・メタノール混合溶液を加え、3 分間ボルテックスした。ボルテックス後、遠心分離し、クロロホルム層 (下層) を別の蓋つき試験管に回収した。残りの沈殿に再びクロロホルム・メタノール混合溶液を加え、1 分間ボルテックスし、遠心分離後にクロロホルム層を回収した。回収したクロロホルム層に 0.88% KCl 溶液を加え、1 分間ボルテックスした後、遠心分離した。遠心分離後、クロロホルム層を重量測定した別の試験管に回収し、濃縮遠心した。濃縮遠心後、試験管の重量を測定し、粗重量 (mg) とし、総脂質量 (mg/g stool) を算出した。

(8)呼吸代謝解析

Pair-Fed での飼育開始 9 週間目に測定した。各群 1 匹当たり 3 日間、動物個別飼育制御装置標準型 LP-80CCFL-6AR [株式会社日本医化器械製作所, 大阪, 日本, K200901381-0000] で飼育を行い、生体ガス分析用質量分析装置 [有限会社アルコシステム, 千葉, 日本, ARCO-2000] を用いて体重当たりの酸素摂取量 (VO_2/W)、呼吸商 (RQ)、運動量を測定した。結果が安定した 48 時間分を抜粋して各値を算出した。

4. 研究成果

(1) 摘出した骨格筋を用いてメタボローム解析を行ったところ、PF を入れていない群において高脂肪食によって 5 種類の代謝物が有意に増加、7 種類の代謝物が有意に減少した (データ数が多いため、記載は控える)。このうち、高脂肪食によって増加した代謝物のうち、PF によって抑制されたのは酸化型グルタチオン (GSSG) と 2-Hydroxybutyric acid の二種類であった。酸化型グルタチオンが変動したことから骨格筋で崩れたレドックスバランスを PF が調節した可能性が示唆された (Fig.1)。

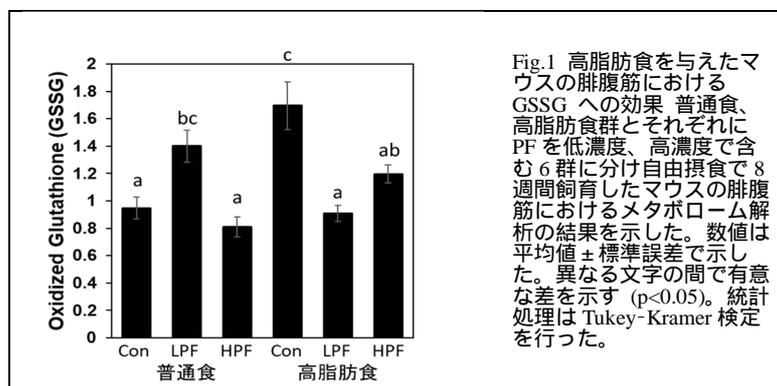


Fig.1 高脂肪食を与えたマウスの腓腹筋における GSSG への効果。普通食、高脂肪食群とそれぞれに PF を低濃度、高濃度で含む 6 群に分け自由摂食で 8 週間飼育したマウスの腓腹筋におけるメタボローム解析の結果を示した。数値は平均値 ± 標準誤差で示した。異なる文字の間で有意な差を示す ($p < 0.05$)。統計処理は Tukey-Kramer 検定を行った。

酸化型グルタチオンが変動したことから骨格筋で崩れたレドックスバランスを PF が調節した可能性が示唆された (Fig.1)。

(2) グルタチオン代謝関連遺伝子としてグルタチオンペルオキシダーゼ 1 (GPx-1)、グルタチオンレダクターゼ (GR) をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 2)。腓腹筋において GPx-1 の発現量は C-C 群と比較して C-LPF, H-C 群で低値を示し、高脂肪食群 H-C と比較して PF 摂取による GPx-1 の発現量が増加する傾向が見られた。GR の発現量は C-C 群と H-C 群で差は見られなかったが、普通食群、高脂肪食群ともに C 群と比較して PF 群で低い値を示し PF により有意に減少した。

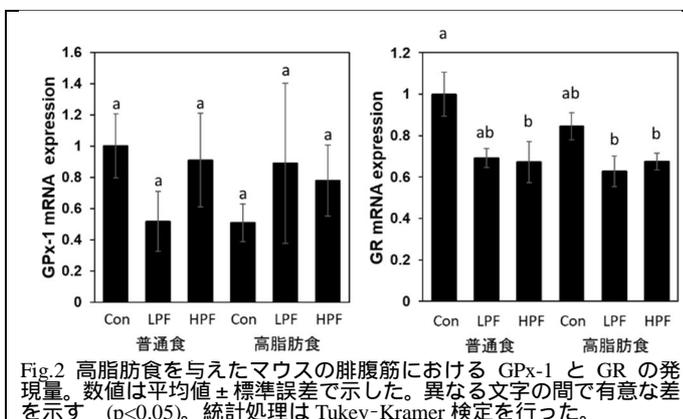


Fig. 2 高脂肪食を与えたマウスの腓腹筋における GPx-1 と GR の発現量。数値は平均値 ± 標準誤差で示した。異なる文字の間で有意な差を示す (p < 0.05)。統計処理は Tukey-Kramer 検定を行った。

(3) 腓腹筋での酸化ストレス蓄積を確認するため、蛍光試薬 DPPP を用いて脂質ペルオキシドを検出した。ここでは、図に示した 4 群で実験を実施した (Fig. 3)。

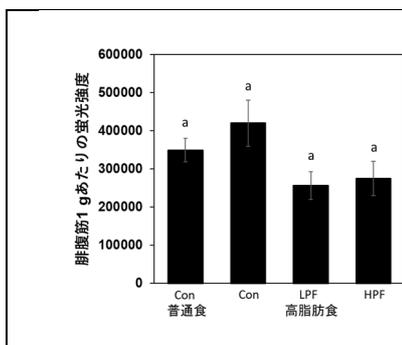


Fig. 3 高脂肪食を与えたマウスの腓腹筋における脂質ヒドロペルオキシド量に対する PF の効果。普通食、マウスの腓腹筋における脂質ヒドロペルオキシド量の測定結果を腓腹筋 1g あたりの蛍光強度で示した。数値は平均値 ± 標準誤差で示した。異なる文字の間で有意な差を示す (p < 0.05)。統計処理は Tukey-Kramer 検定を行った。

高脂肪食摂取でやや高値を示し、PF 群では脂質ヒドロペルオキシド量が低下する傾向があった。

これらのことから、PF は骨格筋内レドックス調節に関わり、骨格筋内の酸化ストレス蓄積を抑制する可能性が示唆された。

(4) PF が高脂肪食の影響を低減したことをうけ、脂質排出を増加させた可能性について検討を行った。この解析では、摂餌量を一定にさせる Pair-Fed 法で実施した。

高脂肪食群で脂質量の増加が認められたが、PF の添加による影響は認められなかった (Table 1)。

Table 1 糞中の総脂質量及び脂質排出量

	C-C	C-LPF	C-HPF	H-C	H-LPF	H-HPF
Total lipid (mg/g stool)	23.17 ± 1.10 ^a	25.09 ± 0.77 ^a	25.20 ± 1.72 ^a	56.44 ± 0.91 ^b	54.72 ± 1.80 ^b	57.03 ± 0.79 ^b

Total lipid (総脂質量): 平均値 ± 標準誤差で表示、4 回繰り返した実験の結果から統計解析した (n = 4)。異なる符号間で有意差あり。

(5) マウスの酸素摂取量測定において、暗期 (活動期) の VO₂/W (Fig. 4 上) は普通食群と比べ、高脂肪食群では低くなる傾向が見られた。また高脂肪食群において、H-HPF 群は他の 2 つの群より高値を示し、呼吸量が回復する傾向が見られた。明期 (非活動期) の VO₂/W (Fig. 4 右下) は、普通食群、高脂肪食群のどちらにおいても、高濃度 PF 群は有意に増加した。呼吸商 RQ と運動量の測定も実施したが、いずれの項目においても PF の影響は認められなかった (データ未記載)。これらのことから、PF は運動量を変化させることなく、エネルギー代謝が促進されることがわかった。

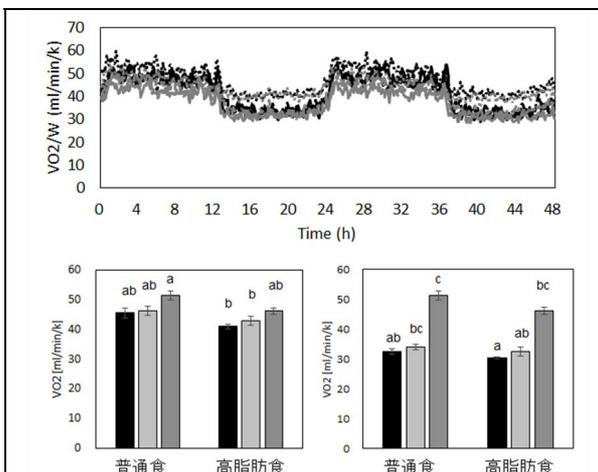


Fig. 4 VO₂/W の測定結果

上グラフ: 0 から 12 時間、24 から 36 時間は活動期。黒: 普通食群、グレー: 高脂肪食群、実線: コントロール群、破線: 低濃度 PF 群、点線: 高濃度 PF 群であり、群平均で示した。下左グラフ: 活動期、下右グラフ: 非活動期の VO₂ の値を示した。コントロール群: 白; 低濃度 PF 群: 灰; 高濃度 PF 群で示した。平均値 ± 標準偏差で表示。異なる符号間で有意差あり。p < 0.05 (One-way ANOVA 解析後、Tukey 検定を行った)。

(6)結論

今回の検討結果では、骨格筋萎縮を抑制する PF が骨格筋の質の維持にも貢献することが明らかとなった。具体的にはメタボローム解析の結果から、酸化ストレスのマーカである酸化型グルタチオンの高脂肪食による増加を抑制することを明らかにした。これに関連して、骨格筋内の脂質ペルオキシドの蓄積を抑制した。脂質ペルオキシドの蓄積は骨格筋萎縮の引き金になることから、萎縮抑制と骨格筋の質維持との間に関連性があることが明らかとなった。今回は高脂肪食負荷マウスでの実施であったため、脂質による影響を低減したか否かについて、糞中脂質量と呼吸代謝の測定を行った。糞中脂質には影響しなかった。一方で、PF は非活動期における呼吸代謝を顕著に向上させることが明らかとなった。PF による呼吸代謝の向上が骨格筋の質の維持と関連したか否かについては、他のモデル実験を組み合わせることで、今後明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshiaki Tanaka, Hitomi Okuyama, Miyu Nishikawa, Shin-ichi Ikushiro, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Yuichi Ukawa, Kenichi Oe, Junji Terao, Rie Mukai	4. 巻 10
2. 論文標題 8-Prenylnaringenin tissue distribution and pharmacokinetics in mice and its binding to human serum albumin and cellular uptake in human embryonic kidney cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Science & Nutrition	6. 最初と最後の頁 1070 - 1080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/fsn3.2733,	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 寛人, 堤 理恵, 大江 健一, 卯川 裕一, 向井 理恵
2. 発表標題 廃用性筋萎縮からの回復を促進する8-プレニルナリンゲニンがアミノ酸動態に与える影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第61回支部講演会（例会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井理恵
2. 発表標題 骨格筋を標的とした機能性食品の開発に向けた基盤研究
3. 学会等名 ダイバーシティ推進研究交流発表会オンライン2021（四国ダイバーシティ推進委員会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田詩奈, 中島賢則, 卯川裕一, 大江健一, 向井理恵, 芦田均, 山下陽子
2. 発表標題 8-プレニルナリンゲニンの肥満を抑制する効果
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 田中 寛人, 堤 理恵, 向井 理恵
2. 発表標題 骨格筋量の調節に寄与するポリフェノールがアミノ酸動態に与える影響について
3. 学会等名 第6回メタボローム解析シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田詩奈, 中島賢則, 卯川裕一, 大江健一, 向井理恵, 芦田均, 山下陽子
2. 発表標題 8- プレニルナリンゲニンの肥満抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹上 菜緒, 小西 冴季, 山下 陽子, 志内 哲也, 卯川 裕一, 大江 健一, 向井 理恵
2. 発表標題 高脂肪食負荷による組織機能破綻に対する8-プレニルナリンゲニンの効果
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第63回講演会(例会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西冴季, 竹上菜緒, 志内哲也, 向井理恵
2. 発表標題 高脂肪誘導性肥満マウスにおいて8-プレニルナリンゲニンが及ぼす代謝変化
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会(例会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 向井理恵	4. 発行年 2022年
2. 出版社 インフォノーツパブリッシング	5. 総ページ数 40
3. 書名 特集 ポリフェノール研究の新展開フラボノイドによる骨格筋萎縮予防	

1. 著者名 監修:西川正純; 執筆者 向井理恵	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 359
3. 書名 運動機能・認知機能改善食品の開発 第IV編 第4章 ポリフェノール	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 COMPOSITION FOR SUPPRESSING OBESITY	発明者 中島賢則, 山下陽子, 芦田均, 向井理恵	権利者 (株)ダイセル、 神戸大学、徳島 大学
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2021/125342	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------