

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：33915

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560065

研究課題名(和文)食品成分による運動器3D構造を修復再生する革新的刺激因子の開発

研究課題名(英文)Development of nutrients to repair and regenerate the 3-D structure of skeletal muscle and capillary

研究代表者

近藤 浩代 (Kondo, Hiroyo)

名古屋女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50333183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：運動器を構成する骨格筋や筋毛細血管の修復再生を促進する食品成分について検証をした。食品抽出物を動物に経口摂取させることで、ヌクレオプロテインやレモンマートルは筋萎縮状態からの回復を促す結果が得られた。また、アスタキサンチンや乳酸菌R30株は骨格筋内の毛細血管退行を抑制し、骨格筋の機能や修復再生を促進する食品成分であることが明らかとなった。これらの食品成分は運動器の革新的刺激因子となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to explore the effects of nutrients on the changes of the three-dimensional capillary networks and myofibers in the skeletal muscle. Nucleoprotein and lemon myrtle supplementation attenuated muscle atrophy and increased satellite cell activation via up-regulation in the expression level of Pax7, MyoD, myogenin, and the phosphorylation of Akt-1 and p70S6k. In addition, the velocity of red blood cells was faster 20, 40, and 60 min after than before the administration of Enterococcus faecium strain R30. This effect was suppressed by propranolol administration. R30 supplementation increased capillary luminal diameter and volume and eNOS and VEGF protein levels in the skeletal muscle under disuse. Also, astaxanthin supplementation attenuated the capillary regression of skeletal muscle. These results indicate nutrients supplementation may be a useful strategy to use for conditions involving muscle dysfunction.

研究分野：骨格筋、微小血管、栄養科学、リハビリテーション、スポーツ

キーワード：骨格筋 食品成分 筋減弱 微小血管

### 1. 研究開始当初の背景

本邦は超高齢社会を迎え、要支援・介護認定者が増加してきている。このためにフレイル予防の推進が必要である。特に運動器疾患対策が重要であると考えられ、サルコペニア（筋減弱症）は、筋量や筋力の低下から要介護やフレイルの誘因となる。研究代表者らは筋萎縮には筋線維と共に筋組織中の微小血管の退行も伴っていることを明らかにしてきた。そこで運動器の3D構造の修復再生を促進する骨格筋と微小血管に対する修復再生法について栄養療法の開発が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は骨格筋とその微小血管の修復再生を促進する食品栄養成分を探索することを目的とした。さらに骨格筋の肥大や萎縮に関与する因子やその微小血管の新生や退行に関与する調節因子について解析を行い、食品栄養成分による骨格筋と微小血管のクロストークを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 培養筋芽細胞、筋管細胞、筋衛星細胞を使用して、効果のある食品成分の候補を抽出した。

(2) 筋肥大や回復を促進する候補となる食品成分を動物に経口摂取させて、筋細胞の形態や mTOR 経路等の活性について検証した。

(3) 微小血管後退の予防や回復を促進する候補となる食品成分を動物に経口摂取させて、毛細血管の3次元構造や血管新生・抑制に関与する因子について検証した。

(4) 骨格筋の骨格を形成する筋膜コラーゲンの過剰発現を予防する候補となる食品成分を動物に経口摂取させて、コラーゲン量や因子について検証した。

### 4. 研究成果

(1) 培養筋芽細胞、筋管細胞、筋衛星細胞に数百種類の食品抽出物を添加し、骨格筋の3D構造を修復再生する候補となる食品成分種類を抽出した。筋細胞を修復再生する候補となったのはヌクレオプロテイン、レモンマートルであった。また、微小血管を修復再生する候補となったのはアスタキサンチン、乳酸菌 R30 株、アルギニン、プロポリスであった。また、筋膜コラーゲンを修復再生する候補となったのはアスタキサンチンであった。

(2) 筋細胞を修復再生する食品成分：骨格筋の萎縮から回復期にヌクレオプロテインを経口摂取させることで骨格筋の3D構造の修復再生を促進するかを検証した。ヌクレオプロテイン摂取をすることでタンパク質合成に関与する mTOR 経路の活性化を促すと共に筋衛星細胞の分化・融合期を示す myogenin 及び筋核数の増加を促すことが確認された。ヌクレオプロテインの構成成分で

あるアミノ酸は mTOR を活性化させ、下流因子であるタンパク質合成の促進に直接作用する rpS6 を活性化するが、Akt-1 を經由

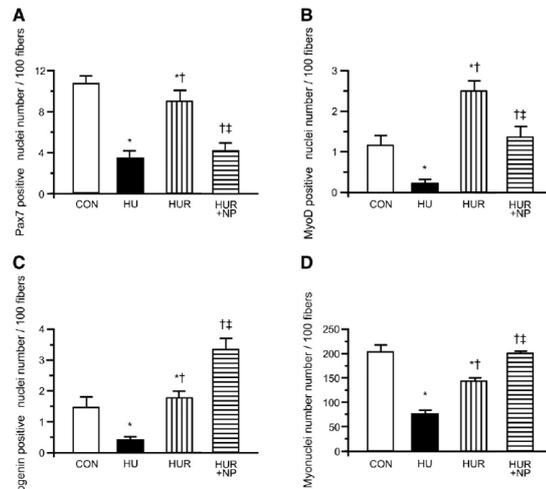


図1. ヌクレオプロテイン摂取による筋衛星細胞の活性化  
CON;コントロール, HU;筋萎縮, HUR;萎縮からの回復, HUR+NP;回復期にヌクレオプロテインを摂取。

しないことが報告されている。このため、ヌクレオプロテイン摂取では Akt-1 に変化を認めなかったが、rpS6 の活性化を促したと考えられる。また、ヌクレオプロテイン摂取で休止期や増殖期にある Pax7 陽性核並びに MyoD 陽性核の減少が認められた一方で、分化・融合期にある myogenin 陽性核及び筋核数の増加が認められた。ヌクレオプロテインの成分であるヌクレオチドの添加は細胞周期の移行を促すと報告されている。また、筋衛星細胞が活性化すると細胞増殖周期に入り増殖を繰り返した後に増殖過程を停止させ、分化・融合期へと移行することが報告されている。このためにヌクレオプロテイン摂取では筋衛星細胞の増殖過程を促進させ、融合が早期に行われた結果 Pax7 陽性核並びに MyoD 陽性核の減少が確認され、myogenin 陽性核並びに筋核の増加が認められたものと考えた。これらの結果から、筋萎縮の回復期におけるヌクレオプロテインの摂取は筋タンパク質合成と筋衛星細胞の増殖過程を促進させ、筋核数を増加させることで、筋萎縮からの回復を促すことができると考えられた(図1)。

次にレモンマートル摂取で筋萎縮を予防できるかを検証した。レモンマートル摂取は Pax7、MyoD 及び myogenin 陽性細胞数、Akt-1 及び p70S6K リン酸化量を増加し、筋萎縮を抑制した。

これらの結果よりヌクレオプロテインやレモンマートル摂取は筋衛星細胞の活性化を介して筋細胞の修復再生を促進することが示唆された。

(3) 微小血管後退の予防や回復を促進する食品成分:筋萎縮は SOD-1 及び ROS の増加、VEGF 及び ANG-1 とそのレセプター及び HIF-1 の発現を減少させた。また、血管新

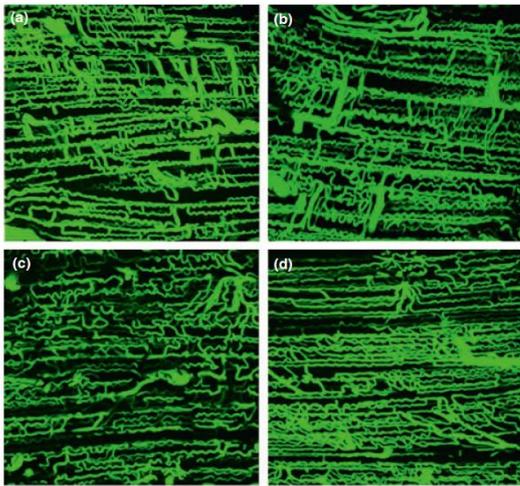


図2. アスタキサンチン摂取による毛細血管3次元構造の維持。a; コントロール, b; コントロール+アスタキサンチン摂取, c; 筋萎縮, d; 筋萎縮+アスタキサンチン摂取

生抑制因子である TSP-1 発現が増加し、3次元毛細血管構造が退行した。一方、アスタキサンチン摂取は SOD-1 及び ROS の過剰発現を抑制し、血管新生因子の発現維持、血管新生抑制因子の発現抑制により毛細血管構造を維持した(図2)。

乳酸菌 R30 株の摂取は骨格筋毛細血管の赤血球速度を増加させ、この反応は筋交感神経を遮断すると消失した。R30 の長期摂取により毛細血管退行を抑制した。また、R30 摂取により eNOS 及び VEGF タンパク発現量が増加した。継続的に乳酸菌 R30 株を摂取することで血流量が増加し、eNOS/VEGF 経路による血管新生が促進され、筋萎縮に伴う骨格筋毛細血管退行を軽減した。(図3)

同様にアルギニンやプロポリスの摂取は毛細血管の3次元構造を回復させた。

これらの結果によりアスタキサンチン、乳酸菌 R30 株、アルギニン、プロポリスは毛細血管3次元構造の修復再生を促進することが

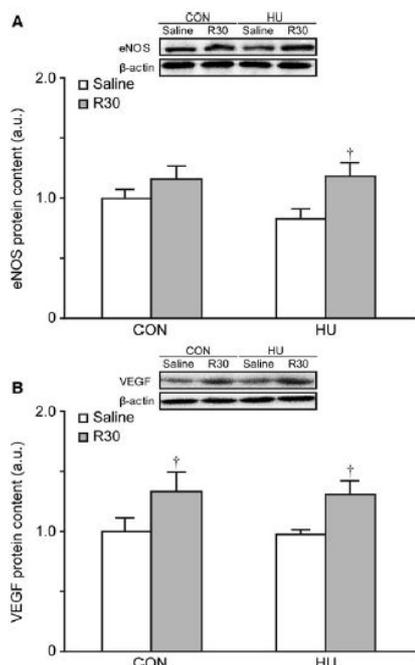


図3. 乳酸菌 R30 株摂取による血管新生因子の増加

示唆された。

(4) 筋膜コラーゲンの過剰発現を予防する食品成分: アスタキサンチン摂取により筋内膜コラーゲン量が減少し、線維化を抑制した。また、TGF- $\beta$  や SMA 発現量も減少させた。

この結果からはアスタキサンチン毛細血管3次元構造の修復再生を促進することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計35件)

1) Hirayama Y, Nakanishi R, Tategaki A, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Enterococcus faecium strain R30 increases red blood cell velocity and prevents capillary regression in the soleus of hindlimb unloaded rats via the eNOS/VEGF pathway. Microcirculation 24(4). e12356, 2017. 査読; 有 doi: 10.1111/micc.12356.

(2) Nakanishi R, Hirayama Y, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Nucleoprotein supplementation enhances the recovery of rat soleus mass with reloading after hindlimb unloading-induced atrophy via myonuclei accretion and increased protein synthesis. Nutr Res 36(12):1335-1344, 2016. 査読; 有 doi: 10.1016/j.nutres.2016.10.007.

(3) Hirayama Y, Nakanishi R, Maeshige N, Fujino H. Preventive effects of nucleoprotein supplementation combined with intermittent loading on capillary regression induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle. Physiological Reports 5(4). pii: e13134. 2017. 査読; 有 doi: 10.14814/phy2.13134

(4) Maeshige N, Koga Y, Tanaka M, Aoyama-Ishikawa M, Miyoshi M, Usami M, Fujino H. Low-Intensity Ultrasound Enhances Histone Acetylation and Inhibition of IL-6 mRNA Expression by Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate in Fibroblasts. J Ultrasound Med 36(5):879-885, 2017. 査読; 有 doi: 10.7863/ultra.16.04020..

(5) Maezawa T, Tanaka M, Kanazashi M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. J Physiol Sci. 2017 in press. 査読; 有 doi:10.1007/s12576-016-0492-x

( 6 ) Uchida K, Tanaka M, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. L-arginine supplementation attenuates capillary regression without increasing integrated succinate dehydrogenase activity and VEGF expression in skeletal muscle during hindlimb unloading. *General Physiology and Biophysics*35(4): 425-432, 2016. 査読 ; 有 doi: 10.4149/gpb\_2016016

( 7 )Tanaka M, Kanazashi M, Maezawa T, Kondo H, Fujino H. Abnormalities in three-dimensional capillary architecture and imbalance between vascular endothelial growth factor-A and thrombospondin-1 in soleus muscle of ovariectomized rat. *Acta Histochem* 117:605-611, 2015. 査読 ; 有 doi: 10.1016/j.acthis.2015.06.001.

( 8 ) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Tanaka M, Kanazashi M, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR. Low-intensity running exercise enhances the capillary volume and pro-angiogenic factors in the soleus muscle of type 2 diabetic rats. *Muscle Nerve* 51: 391-399, 2015. 査読 ; 有 doi: 10.1002/mus.24316.

( 9 ) 中西亮介, 平山祐介, 田中稔, 前重伯壮, 近藤浩代, 石原昭彦, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の回復過程におけるヌクレオプロテイン摂取が筋タンパク質の合成と筋核数増加に与える影響. *日本基礎理学療法学雑誌* 18, 43-49.2015. 査読 ; 有

( 10 ) Fujino H, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A. Capillary growth and regression in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med* 5, 483-491, 2014. 査読 ; 有 doi: org/10.7600/jpfsm.3.483

( 11 ) Kondo H, Fujino H, Nagatomo F, Ishihara A. Influence of estrogen receptor polymorphisms on bone density in response to habitual exercise in Japanese postmenopausal women. *Scientific World Journal* 2014; 2014:593927. 7 pages. 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1155/2014/593927.

( 12 ) Kanazashi M, Tanaka M, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. *Exp Physiol* 99:1065-1077, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1113/expphysiol.2014.079988.

( 13 ) Kanazawa Y, Maekawa K, Okumura Y, Fujita N, Fujino H. Preventive effect of nucleoprotein on hindlimb unloading-induced capillary regression in rat soleus muscle. *Biotech Histochem* 89: 220-227, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.3109/10520295.2013.835444.

( 14 ) Sakita M, Murakami S, Fujino H. The morphological changes in the capillary architecture of the tibial nerve associated with spontaneous aging and aerobic exercise intervention during aging in rats. *J Phys Ther Sci* 26: 263-267, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1589/jpts.26.263.

[学会発表](計 135 件)

(1) Kondo H, Fujino H, Kanazashi M, Tanaka M, Ishihara A. Propolis supplementation prevents capillary regression and endothelial cell death via inhibiting thrombospondin-1 activation in atrophied muscle. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, June 1-4, 2016. Boston (アメリカ)

(2) Fujino H, Kondo H, Kanazashi M, Tanaka M, Ishihara A. Dietary astaxanthin supplementation improves walking performance and blood lactate level after walking test in community-dwelling elderly individuals. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, June 1-4, 2016, Boston, (アメリカ)

(3) Nakanishi R, Hirayama Y, Ueno M, Yoshikawa M, Maeshige N, Fujino H. Nucleoprotein Enriched Diet Prevents Disuse Induced Muscle Atrophy in Soleus Muscle of Rats. *Experimental Biology* 2016, 2016.4.2-4.6, San Diego (アメリカ)

(4) Hirayama Y, Nakanishi R, Ueno M, Yoshikawa M, Tategaki A, Maeshige N,

Fujino H. Enterococcus Faecium Strain R30 Prevents Capillary Regression though Increasing Red Blood Cell Velocity in Rat Soleus Muscle under Disuse Condition. Experimental Biology 2016, 2016.4.2-4.6, San Diego (アメリカ)

(5) Kondo H., Fujino H., Ishihara A. Protective role of moderate-intensity short-term and low-intensity long-term exercise training on muscle capillary regression in a rat model of type 2 diabetes. American Heart Association Scientific Sessions, 2015. 11.12-16. Orlando (アメリカ)

(6) Kondo H., Fujino H., Nagatomo F, Ishihara A. Capillary and metabolic actions of exercise in skeletal muscle of type 2 diabetes. 2014 American Society for Cell Biology meeting, ,2014, 12.6-10. Philadelphia (アメリカ)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 浩代 (KONDO, Hiroyo)  
名古屋女子大学・家政学部・准教授  
研究者番号：50333183

### (2) 研究分担者

藤野 英己 (FUJINO, Hidemi)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：20278998

石原 昭彦 (ISHIHARA, Akihiko)  
京都大学・大学院人間・環境学研究科・教授  
研究者番号：90184548