

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450161

研究課題名(和文) 筋肉細胞分化機能制御による抗サルコペニア肥満機能性食品の開発

研究課題名(英文) Development of functional foods for anti-sarcopenic obesity by the regulation of differentiated muscle cells

研究代表者

照屋 輝一郎(Teruya, Kiichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10273971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨格筋由来培養筋肉細胞を用い、抗サルコペニア効果を検討するための培養細胞評価系構築を行い、抗サルコペニア効果を有する機能性食品候補の探索を行った。その結果、発酵乳ケフィアが筋肉細胞エネルギー代謝亢進作用を有することが確認され、細胞内のミトコンドリア活性化作用を有することが強く示唆された。さらにTNF- α 処理により誘導されたマウス骨格筋由来筋管細胞のタンパク質分解の抑制効果が確認され、抗サルコペニア効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Investigation and evaluation for anti-sarcopenia effects were performed using evaluating system for anti-sarcopenia effects constructed by cultured mouse skeletal muscle cells. As results, fermented milk Kefir exhibited the enhancing effect of cellular energy metabolism on skeletal muscle cells. It strongly suggested that Kefir had the ability of intracellular mitochondrial activation. Furthermore, mouse skeletal muscle cells in proteolytic status induced by TNF- α treatment were partially improved by Kefir treatment. It suggested that Kefir had anti-sarcopenia effects.

研究分野：食品科学

キーワード：食品機能 筋肉細胞 サルコペニア肥満

1. 研究開始当初の背景

サルコペニア肥満とはサルコペニア（主に加齢による筋肉の減少）と肥満を併せ持つ状態を指すもので、この状況は通常の肥満よりも生活習慣病に移行しやすいことが危険視されている[1]。特に近年、運動不足による筋肉量の減少を伴う肥満が新たにサルコペニア肥満として注目されてきており、急速な高齢化を迎えつつある我が国の国民健康の重要な課題の一つである。特に深刻な点は、筋肉組織量の低下すなわちサルコペニアが生活習慣病対策で最も重要な「運動」という手段を妨げることである。このことは、サルコペニア肥満が進展するとサルコペニアによる運動機能低下が肥満解消を困難とし、それがサルコペニアを加速させ、さらなる肥満が進展するという負のスパイラルに陥ることが危惧される。サルコペニア肥満のリスクファクターは筋肉組織の恒常性の破綻であり、筋肉組織の量または質の減少である。加齢、急激な運動負荷の低下（いわゆる運動不足）、ストレスなどが新規筋肉組織生成低下や筋肉組織の分解を促し、サルコペニア状態になると考えられている。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず動物培養細胞を用いて抗サルコペニア肥満効果の検討を行う培養細胞評価系の構築を行うことを目的とした。その構築した評価系を用い、候補の機能性食品群より抗サルコペニア肥満効果を有するものの検索を行うことを目的とした。そして、*in vitro* 培養細胞評価系により見いだされた抗サルコペニア肥満効果を有する機能性食品成分の作用点に関して検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

抗酸化機能を有する食品成分は有益な生理活性を示すことが多いことから、最初に *in vitro* における抗酸化活性の評価を DPPH ラジカル消去活性試験により行った。

筋肉機能の一つの評価として、細胞内の酸化還元反応で生成される NADH 量を WST-1 assay により測定することで細胞のエネルギー代謝状況の評価を行った。細胞 DNA を Hoechst 33342 により染色し、その値をもとに細胞あたりの代謝活性を算出した。

細胞内のミトコンドリアの活性及び総量は MitoTracker Red 染色及び MitoTracker Green 染色により評価した。

筋肉タンパク質発現増強や筋肉機能に大きく関与し、かつエネルギー代謝ホメオスタシスの主要な調節因子である AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化状態は AMPK タンパク質自身のリン酸化状態を Western Blotting により測定することで検討した。筋肉細胞のインスリンシグナル経路に及ぼす効果は Western blotting により評価した。

また筋肉細胞における筋肉タンパク質量

発現増強作用の検討を行った。筋肉タンパク質の量に及ぼす影響はミオシン重鎖タンパク質の Western blotting と定量 RT-PCR により評価した。なお、筋肉細胞へのサルコペニア状態の誘導は炎症性サイトカイン TNF- α 処理により行った。

4. 研究成果

本研究を遂行するにあたり主軸となる、筋肉細胞における筋肉タンパク質量発現増強成分の検討を行うための培養細胞評価系をマウス骨格筋由来筋芽細胞 C2C12 を使用し構築した。その結果、筋芽細胞より分化させた筋管細胞を用いた筋肉分化時および分化後筋肉細胞の双方に利用可能な抗サルコペニア培養細胞評価系を構築した。

検討を行った食品サンプルの DPPH ラジカル消去活性試験を行った結果、多数のサンプルに関して DPPH ラジカル消去活性が認められ、抗酸化活性を有する食品サンプルが広く存在していることが確認された (図 1)。

次に検討を行った食品サンプルに関して、培養細胞評価系で用いているマウス由来 C2C12 筋肉細胞の NADH 量を上昇させる代謝活性化効果を検討したところ、細胞の代謝活性化効果を示した食品サンプルは一部のものに限られた (図 2)。これらの結果より、*in vitro* での抗酸化活性は筋肉細胞機能の活性化の直接の指標とはならず、本研究課題で行った培養細胞評価系での機能性評価の必要性ならびに本評価系の有効性が確認された。

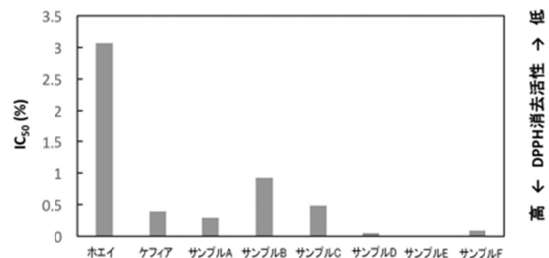


図 1. DPPH ラジカル消去による *in vitro* 抗酸化活性 (1 g/10mL にて水で抽出したサンプルの DPPH ラジカル消去 IC₅₀ 値を算出した。)

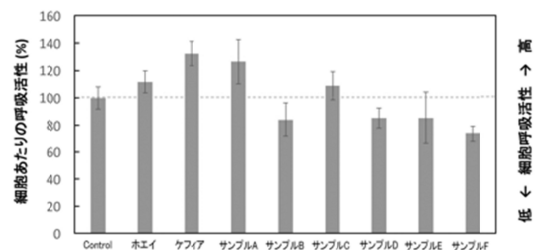


図 2. 抗酸化活性をもつサンプルの C2C12 細胞呼吸活性 (WST-1 assay と Hoechst 33342 染色より筋肉細胞あたりの呼吸活性を算出)

細胞代謝活性化効果を示した食品サンプルに関して、筋肉細胞内のエネルギー代謝に深く関与するミトコンドリア機能を検討したところ、*in vitro* 抗酸化能と筋肉細胞代謝活性化効果を示した発酵乳ケフィアに関して、筋肉細胞内のミトコンドリア膜電位を上昇させる効果が確認された。この結果は細胞のエネルギー代謝を亢進する作用を示すものと考えられた。ミトコンドリア機能に関して、ミトコンドリア膜電位増強に基づく活性化とミトコンドリアの量を増加させることによる活性化の2つの面から作用点を検討した結果、ミトコンドリア膜電位を上昇させる効果、および細胞ミトコンドリア量を上昇させる効果の両方が確認され、質と量の両面からミトコンドリア活性化作用を有することが強く示唆された(図3, 4)。

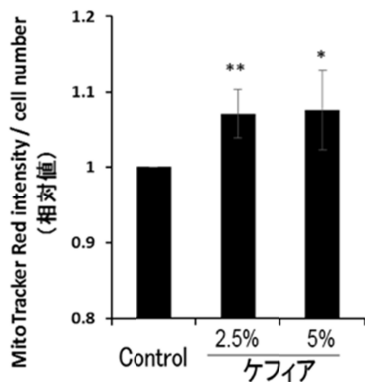


図3. サンプル 48 h 処理による C2C12 筋管細胞のミトコンドリア膜電位の変化 (MitoTracker Red 染色と Hoechst 33342 染色より筋肉細胞当たりのミトコンドリア膜電位を算出)

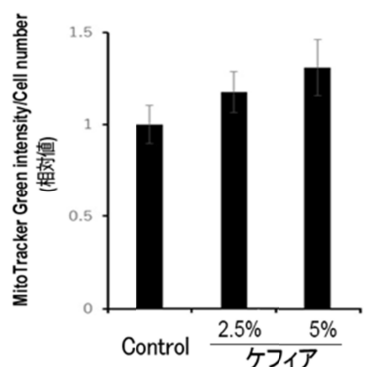


図4 サンプル 48 h 処理による C2C12 筋管細胞のミトコンドリア量の変化 (MitoTracker Green 染色と Hoechst 33342 染色より筋肉細胞当たりのミトコンドリア量を算出)

筋肉タンパク質発現増強や筋肉機能に大きく関与し、かつエネルギー代謝ホメオスタ

シスの主要な調節因子である AMPK タンパク質に関して検討を行った結果、発酵乳ケフィアに AMPK を活性化する効果を有することが確認された(図5)。この結果より筋肉細胞のサルコペニア状態からの改善が期待されたため、TNF- α 処理によりミオシン重鎖タンパク質量の減少を誘導し、サルコペニア状態とした C2C12 筋管細胞のミオシン重鎖タンパク質量を調べたところ、ミオシン重鎖タンパク質量の減少を解除する効果が確認された(図6)。なお、C2C12 筋管細胞の Akt タンパク質のリン酸化状態を確認したところ、TNF- α 処理により Akt タンパク質リン酸化レベルの低下が認められ、細胞のインスリンシグナル伝達障害が強く示唆された。発酵乳ケフィア処理により、TNF- α 処理により生じたインスリンシグナル伝達障害を解除する効果を有することも併せて確認された(図7)。

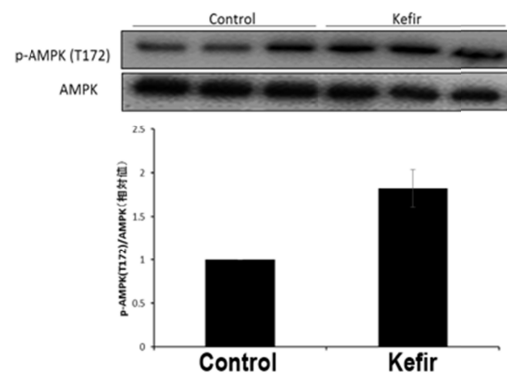


図5. ケフィア 10 h 処理による C2C12 筋管細胞の AMPK タンパク質のリン酸化状態。上段はリン酸化 AMPK のタンパク質の検出結果を示し、下段は定量化したものを示している。縦軸は Total AMPK タンパク質量で標準化した相対値を示している。

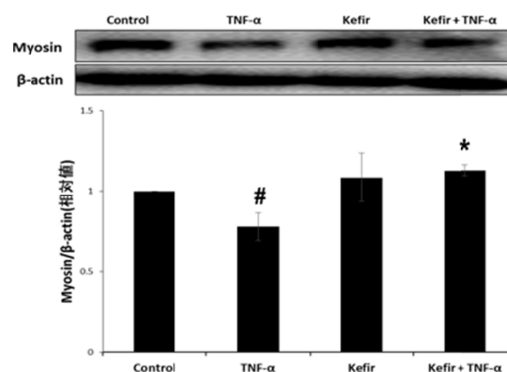


図6. サンプル 24 h 処理による TNF- α 処理 C2C12 筋管細胞のミオシン重鎖タンパク質量の変化。上段はミオシン重鎖タンパク質の検出結果を示し、下段は定量化したものを示している。縦軸は内在性 β -アクチン量で標準化した相対値を示している。(* : $p < 0.05$ vs TNF- α)

: $p < 0.05$ vs Control)

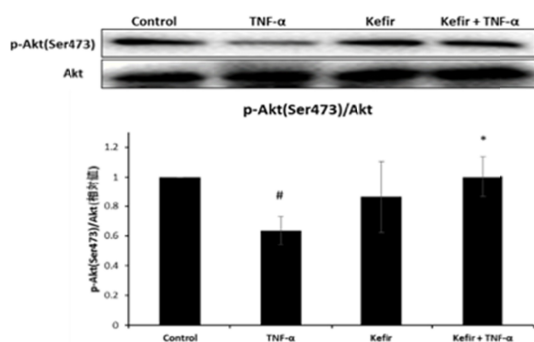


図7. ケフィア 1 h 処理による C2C12 筋管細胞の Akt タンパク質の Ser473 のリン酸化状態。上段は Ser473 リン酸化 Akt タンパク質の検出結果を示し、下段は定量化したものを示している。縦軸は Total Akt 量で標準化した相対値を示している。

さらに、発酵乳ケフィア処理により C2C12 筋管細胞内の ATP 量の減少が認められ、この効果はタンパク質合成阻害剤の処理により ATP 量の減少がキャンセルされた(図8)。発酵乳ケフィア処理によりタンパク質合成が誘導されることで細胞内 ATP 量の減少が生じ、それがトリガーとなり細胞呼吸活性の上昇やエネルギー代謝の亢進が生じると考えられた。また、炎症状態で機能低下した筋肉細胞機能に関して発酵乳ケフィアが回復または保護効果を示すことが示唆された。

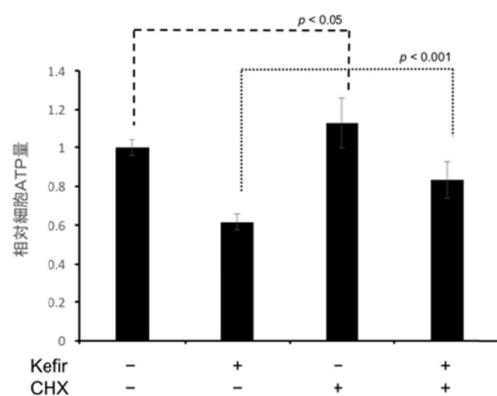


図8. サンプル 48 h 処理と 4 h タンパク質合成阻害処理における C2C12 筋管細胞の細胞内 ATP 量。サンプル処理の最終 4 時間は CHX を共存させることで細胞のタンパク質合成を阻害した後、細胞内の ATP 量を測定した。(CHX: タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド)

<引用文献>

[1] Stenholm, S. *et al.*, Sarcopenic obesity -

definition, etiology and consequences. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **11**: 693-700, 2008.

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4件)

1. Hamasaki, T., Harada, G., Nakamichi, N., Kabayama, S., Teruya, K., Fugetsu, B., Gong, W., Sakata, I., Shirahata, S. Electrochemically reduced water exerts superior reactive oxygen species scavenging activity in HT1080 cells than the equivalent level of hydrogen-dissolved water. *PLoS ONE* (査読有り), **12**(2), e0171192 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.017119.
2. Takahashi, H., Kawaguchi, M., Kitamura, K., Narumiya, S., Kawamura, M., Tengan, I., Nishimoto, S., Hanamura, Y., Majima, Y., Tsubura, S., Teruya, K., and Shirahata, S. An Exploratory Study on the Anti-inflammatory Effects of Fucoidan in Relation to Quality of Life in Advanced Cancer Patients. *Integrative Cancer Therapies* (査読有り), *in press* (2017), doi 10.1177/1534735417692097.
3. Hamasaki, T., Nakamichi, N., Teruya, K., Shirahata, S. Removal efficiency of radioactive cesium and iodine ions by a flow-type apparatus designed for electrochemically reduced water production. *PLoS One* (査読有り), **9**(7), e102218 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0102218.
4. Kashiwagi, T., Yan, H., Hamasaki, T., Kinjo, T., Nakamichi, N., Teruya, K., Kabayama, S., Shirahata, S. Electrochemically reduced water protects neural cells from oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (査読有り), 2014:869121. doi: 10.1155/2014/869121.

[学会発表](計35件)

1. 杉本 龍郎ら(6名), (2017) 発酵乳ケフィアが筋肉細胞の機能に及ぼす効果. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 3 月 19 日. 京都女子大学(京都府・京都市).
2. 徳永 佐和ら(4名), (2017) がん細胞スフェロイドに対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物の抗腫瘍効果. 2017 年 3 月 19 日. 同上
3. 平田 千尋ら(5名), (2017) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物および抗がん剤の併用による抗腫瘍効果. 2017 年 3 月 19 日. 同上

4. 石井 ふうらのら(6名), (2017) 白金ナノ粒子は低濃度条件下で細胞内の抗酸化機構を制御する. 2017年3月18日. 同上
5. 石井 ふうらのら(5名), (2016) 低濃度白金ナノ粒子による細胞内抗酸化活性化機構の解明. 第39回日本分子生物学会年会2016年12月2日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
6. Kusumoto, Y. *et al.*, (6名), (2016) Combined Use of Enzymatically Digested Low-Molecular Weight Fucoïdan Extract and Anti-Cancer Drugs Enhances Their Anti-Cancer Effects. The 29th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2016 Kobe). 2016年11月12日. 神戸国際会議場.(兵庫県・神戸市)
7. Harada, G. *et al.*, (6名), (2016) Analysis of Intracellular Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Electrochemically Reduced Water in HT1080. 2016年11月12日. 同上
8. 松元 拓也ら(5名), (2016) 発酵乳ケフィアの抗酸化活性と筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果. 日本農芸化学会2016年度大会2016年3月29日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
9. 石井 ふうらのら(5名), (2016) 低濃度白金ナノ粒子による細胞内抗酸化活性化機構の解明. 2016年3月29日. 同上
10. 楠本 啓博ら(6名), (2016) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用処理による抗腫瘍作用の増強. 2016年3月28日. 同上
11. 中島 麻美ら(6名), (2015) 白金ナノ粒子と水素ガス併用処理によるヒト白血病細胞 HL60 細胞死誘導機構の解析とその応用研究. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会(BMB2015). 2015年12月2日. 神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
12. 加治佐 真吾ら(6名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果の評価. 2015年12月1日. 同上
13. 宮本 菜摘ら(4名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタマメ抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果. 2015年12月1日. 同上
14. 林 寛大ら(4名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物による糖鎖構造変化関連遺伝子解析. 2015年12月1日. 同上
15. 高橋 秀徳ら(7名), (2015) 進行癌患者における、低分子フコイダンによる抗炎症作用に関する探索的検討. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月10日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
16. 白畑 實隆、吉田 年宏、照屋 輝一郎(2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗がん剤の併用における抗腫瘍作用増強効果. 2015年10月9日. 同上
17. 照屋 輝一郎(2015) 健康に良い還元水研究の進歩. 第17回関西ハイパーサーミア研究会. 2015年6月20日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
18. 原田 大輔ら(5名), (2015) 発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果. 日本農芸化学会2015年度大会. 2015年3月27日. 岡山大学(岡山県・岡山市)
19. 林 寛大ら(6名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物によるガン細胞の細胞表面糖鎖構造変化の誘導. 2015年3月29日. 同上
20. 加治佐 真吾ら(6名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果の評価. 2015年3月29日. 同上
21. 宮本 菜摘ら(5名), (2015) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタ豆抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果. 2015年3月29日. 同上
22. 黒田 敦子ら(7名), (2015) 原子状水素によるガン細胞死誘導機構の解析. 2015年3月29日. 同上
23. 中島 麻美ら(7名), (2015) 原子状水素を利用した抗がん治療法の開発を目的とした検討. 2015年3月29日. 同上
24. Teruya, K., Sanetaka, S. (2014) Cancer Cell-Specific Apoptosis Induction and Alteration of Cell Surface Sugar Chain Structures by Low Molecular Weight Fucoïdan Extract. The 27th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2014 Kitakyushu). 2014年11月11日. 北九州国際会議場(福岡県・北九州市)
25. Shirahata, S., Hamasaki, T., Teruya, K. (2014) Newly found activities of Electrochemically Reduced Water. 2014年11月13日. 同上
26. Tsuruta, K. *et al.*, (7名), (2014) The mechanism of ROS regulation by hydrogen molecules for suppression of invasion in human fibrosarcoma cells. 2014年11月14日. 同上
27. Ishibashi, Y. *et al.*, (4名), (2014) Enzymatically digested low-molecular weight fucoïdan suppresses the growth of cancer cells. 2014年11月14日. 同上
28. Goto, R. *et al.*, (5名), (2014) Combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoïdan extract and an anti-cancer drug enhance their anti-tumor effects. 2014年11月14日. 同上

29. 蔵丸 卓郎ら(6名), (2014) 白金ナノ粒子の細胞内抗酸化メカニズムの解析. 日本機能水学会第13回学術大会. 2014年10月18日. 家の光会館7F コンベンションホール(東京都・新宿区)
30. 照屋 輝一郎、白畑 實隆(2014) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタ豆抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月26日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
31. 松山豪彦ら(6名), (2014) 発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果. 2014年度日本農芸化学会西日本支部大会. 2014年9月19日. 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)
32. 後藤 梨々子ら(5名), (2014) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用による抗腫瘍作用増強効果. 第66回日本生物工学会大会. 2014年9月11日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
33. 石橋 祐子ら(4名), (2014) 酵素消化低分子化フコイダンのガン細胞に対する増殖抑制効果の検討. 2014年9月11日. 同上
34. Teruya, K. *et al.*, (5名), (2014) Cancer Cell-specific Apoptosis Induction and Alteration of Cell Surface Sugar Chain Structures by Low Molecular Weight Fucoidan Extract. IUFoST 2014, 17th World Congress of Food Science and Technology. 2014年8月20日. (Palais des congrès de Montréal, Montreal, Canada)
35. Shirahata, S. *et al.*, (6名), (2014) The Mechanism of Redox Regulation in Animal Cells by Hydrogen and Pt Nanoparticles as Antioxidants. 2014 World Forum on Biology. 2014年6月3日. (Hyatt Regency Savannah, Savannah, Georgia, USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

照屋 輝一郎 (TERUYA, Kiichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号: 10273971