

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15272

研究課題名(和文) エイコサペンタエン酸による骨格筋を介した抗肥満作用新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of anti-obesity effect via eicosapentaenoic acid-induced improvement of skeletal muscle function

研究代表者

小宮 佑介 (Komiya, Yusuke)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80791665

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)：魚油に含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)による脂質代謝改善作用のメカニズムを骨格筋の観点から解明することを目的とした。まずEPAによる筋代謝への影響を調べるために、筋芽細胞L6にEPAを作用させ、メタボローム解析を行った。その結果、EPA添加により代謝物のプロファイルが異なることを見出した。次に、筋細胞が放出する成分(マイオカイン)による脂肪細胞への影響を確認した。EPA添加C2C12筋芽細胞の培地を使用して、マウス線維芽細胞3T3L1を培養した。しかし、EPAの作用として3T3L1細胞の脂質代謝関連因子のmRNA発現量を増加させたが、筋細胞代謝物による効果は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚油の摂取は肝臓や脂肪組織に作用し、肥満改善に寄与することは知られているが、骨格筋を標的とした、臓器間ネットワークを介した研究は報告されていない。本研究は魚油に含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)による骨格筋代謝能の向上に加え、骨格筋由来の代謝分泌物による脂肪細胞への影響、すなわち肥満改善をターゲットとした研究である。これは既存食品成分の新たな機能性を提唱するものである。また、運動トレーニングでなし得る身体への恩恵を食品成分で代替可能であることを示唆するものである。本研究の成果は筋機能への作用を謳った運動模倣サプリメントとして、肥満や運動不足が問題視されている現代社会への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the anti-obesity effect via eicosapentaenoic acid (EPA)-induced improvement of skeletal muscle function. First, to investigate the effects of EPA on muscle metabolism, L6 cells were treated with EPA and cell lysates were collected, and then metabolomic analysis was performed. The results showed that the metabolite profiles were different in control and EPA treated group. Next, to confirm the effects of metabolites released from muscle cells (myokines) on adipocytes, 3T3L1 cells were cultured in medium, collected from pre-cultured C2C12 myotubes with EPA. We found that EPA supplementation increased mRNA expression of lipid metabolism-related factors in 3T3L1 cells, however there was no effect on 3T3L1 cells culturing in medium obtained from myotubes with EPA.

研究分野：栄養生理学

キーワード：EPA エイコサペンタエン酸 筋細胞 骨格筋 魚油 肥満 マイオカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームが大きな社会問題となっており、原因の一つである肥満の解消が望まれる。魚油の摂取は肝臓や脂肪組織に作用し、肥満改善に寄与することは知られているが (Shearer *et al.*, *BBA*, 2015) 骨格筋への影響ほとんど報告されていない。我々はこれまでに魚油に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) が筋細胞に直接作用し、脂質代謝を促進する遺伝子の mRNA 発現量を増加させることを明らかにしている。骨格筋には内分泌器官としての働きも報告されており、運動トレーニングによる PGC-1 $\alpha$  の発現量増加により骨格筋から irisin や BAIBA などのホルモン (マイオカイン) が産生されることが報告されている (Bostrom *et al.*, *Nature*, 2012; Robert *et al.*, *Cell Metabolism*, 2014)。これらのホルモンは白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞 (エネルギー消費型脂肪細胞) に変化させる作用があり、その働きにより体脂肪の減少を引き起こす。先の実験において、我々は EPA の添加で筋細胞において PGC-1 $\alpha$  の発現量が増加することを見出した。このことより「EPA-PGC1 $\alpha$ -マイオカイン産生-脂肪細胞の褐色化-脂肪燃焼」という新規経路が提唱される。また、EPA の代謝物には様々な生理活性機能が報告されている。例えば、レゾルピン E1 に抗炎症作用 (Schwab *et al.*, *Nature*, 2007) 8-HEPE には高い PPAR $\delta$  リガンド (骨格筋脂質代謝促進因子) 活性が報告されている (Yamada *et al.*, *Journal of Lipid Research*, 2014)。この他にも EPA 代謝物は確認されているが、EPA 投与による代謝物の種類、骨格筋への蓄積量およびその作用は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

魚油は肝臓や脂肪組織に作用することは知られているが、その一方で生体内における最大の代謝器官の一つである骨格筋においてはその働きはあまり分かっていない。我々はこれまでに、魚油の摂取によりラット骨格筋の脂肪酸酸化能力の向上、さらに魚油中のエイコサペンタエン酸 (EPA) が活性成分であることを明らかにした。そこで本研究では、「EPA による骨格筋由来因子産生による脂肪細胞の褐色化および EPA 代謝物による骨格筋脂質代謝能の向上」という骨格筋を介した抗肥満作用の新規メカニズムを実証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1 マウスへの EPA 投与試験

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。1000 mg/kg の EPA エチルエステルを胃ゾンデにより経口投与を行った。投与から 6 時間後に骨格筋を摘出し、PGC1 $\alpha$  を含む脂質代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現量を qPCR 法を用いて解析した。

#### 実験 2 EPA を作用させた筋細胞におけるメタボローム解析

ラット筋芽細胞株 L6 から調製した筋管の培地中に 30  $\mu$ M EPA を添加し、72 時間培養した (ポジティブコントロールとして PPAR $\delta$  特異的アゴニストである 100 nM GW501516 を用いた)。その後、メタボライトを抽出し、解析に供した。解析には Human Metabolome Technologies の C-SCOPE を利用し、中心代謝にメインに解析を行った。

#### 実験 3 EPA を作用させた筋細胞の培地を用いた脂肪細胞の培養

実験 3-1. EPA 添加によってマイオカインの産生、脂肪細胞の褐色化が生じているかの確認に取り組んだ。100  $\mu$ M EPA 含有 30% FBS-DMEM 培地を用いて、マウス単趾屈筋由来の単離筋線維を培養し、培地を 24 時間ごとに回収した (コントロールは溶媒のみ)。回収した培地に 1% となるようにインスリン溶液 (10  $\mu$ g/ml) を加え、脂肪細胞分化誘導培地により 48 時間培養済みの 3T3-L1 細胞の培養を行った。

実験 3-2. マウス由来筋芽細胞株 C2C12 を 2% HS-DMEM を用いて、筋管を形成し、その後 100  $\mu$ M EPA-10% FBS-DMEM 培地を用いて培養を行った。筋管細胞では細胞の収縮は確認されていなかったが、幼若な筋線維と位置づけされている。培地を 24 時間ごとに回収した (コントロールは溶媒のみ)。回収した培地に 1% となるようにインスリン溶液 (10  $\mu$ g/ml) を加え、脂肪細胞分化誘導培地により 48 時間培養済みの 3T3-L1 細胞の培養を行った。その他の実験群として vehicle (0.1% DMSO-10% FBS-DMEM)、EPA 群 (100  $\mu$ M EPA-10% FBS-DMEM) および C2C12 群 (10% FBS-DMEM で C2C12 を培養した後、回収した培地) を準備した。培養から 120 時間後に細胞を回収し、脂質代謝に関連する遺伝子の qPCR 解析を行った。

#### 実験 4 筋芽細胞への EPA 代謝物の添加試験

マウス由来筋芽細胞株 C2C12 を 2% HS-DMEM を用いて、筋管を形成した。培地中に 100  $\mu$ M EPA、レゾルピン E1 (RvE1)、8-ヒドロキシエイコサノイド (8-HEPE) を添加し、6 時間培養した。その後、細胞を回収、total RNA を抽出し、脂質代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現量を qPCR 法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

### 実験1 マウスへのEPA投与試験

マウスへのEPA投与の結果、qPCR解析より長趾伸筋(EDL)において脂質代謝を促進するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK)4、脱共役タンパク質(UCP)3、PGC1 $\alpha$ のmRNA発現量が有意に増加した(Fig.1)。一方でヒラメ筋(soleus)ではEDLで確認された脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現量の増加は観察されなかった。これは各筋組織の元々の代謝ポテンシャルによるものと考えられる。EDLは速筋型優位であり、ヒラメ筋は遅筋型優位な組織である。速筋型は糖代謝を中心としており、遅筋型は脂質代謝を中心にエネルギーを利用している。そのため、もともと脂質代謝優位なヒラメ筋は大きな上昇を見せなかったと考えられる。以上よりEPAは細胞のみならず、生体においても筋の脂質代謝を促進させることが示唆された。

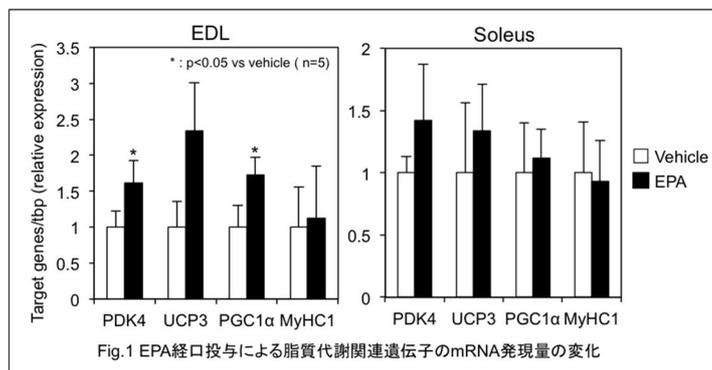


Fig.1 EPA投与による脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現量の変化

### 実験2 EPAを作用させた筋細胞におけるメタボローム解析

主成分分析の結果、コントロール、EPAおよびGW群でそれぞれ異なるグループのプロットを示し、生じた代謝物に群ごとに差があることがわかった(Fig.2-1)。またHeatMapを作製したところ、3群間で異なる傾向を示し、特にEPA添加においては他二群と比較して、大きな異なりを見せた(Fig.2-2)。エネルギー代謝経路ごとのに着目すると、EPA添加群で解糖系に関するグルコース-6-リン酸が減少、TCA回路に関連するコハク酸や2-ヒドロキシグルタル酸の増加が確認され、脂質代謝の促進が示唆された。また興味深いことに総遊離アミノ酸量には変化がなかったが、EPA添加によりロイシン、アスパラギンなどの遊離アミノ酸量の増加、セリン、アスパラギン酸などの減少といったアミノ酸組成の変化が確認された。これはEPAによる代謝の変化によって、TCA回路の基質であるアミノ酸の組成に影響を与えたことが要因として考えられる。

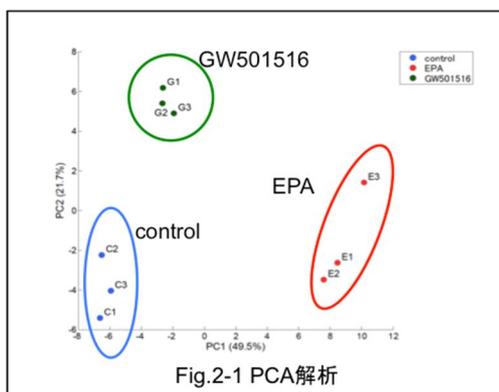


Fig.2-1 PCA解析

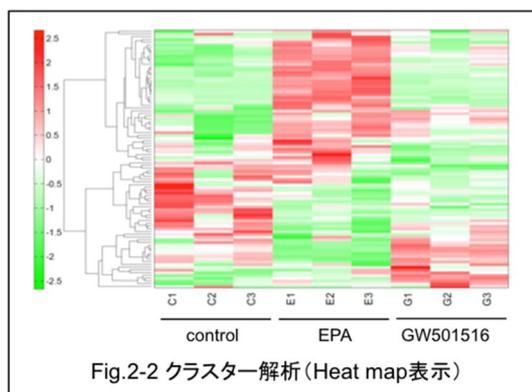


Fig.2-2 クラスター解析(Heat map表示)

### 実験3 EPAを作用させた筋細胞の培地を用いた脂肪細胞の培養

実験3-1. 通常3T3L1細胞の脂肪細胞への誘導には10%FBS-DMEM培地を用いる。しかし、単離筋線維の培養には30%FBS-DMEM培地を用いるため、これを用いて筋細胞培養培地の回収を行った。回収した培地を用いてマウス胎児皮膚由来線維芽細胞株3T3-L1細胞の培養を行ったが、血清濃度の違いのためか、回収培地では脂肪細胞の分化が誘導されなかった。その後、単離筋線維の血清濃度などの条件検討を行ったが、3T3L1細胞の脂肪滴の形成までは誘導できなかった。そのため、単離筋線維の代用としてマウス由来筋芽細胞株C2C12を分化誘導して形成させた筋管を使用することとした(実験3-2)。筋管細胞では細胞の収縮は確認されていなかったが、幼若な筋線維と位置づけされている。

実験3-2. 100  $\mu$ M EPAを作用させた筋管細胞で回収した培地3T3-L1細胞の培養を行った結果、分化に大きな影響は見られなかった。また、脂質代謝に関連する遺伝子のqPCR解析を行ったところ、EPA添加群においてSREBP1のmRNA発現量の有意な減少が確認された(Fig.3)。しかし、C2C12を培養した培地においてはEPAの添加有無に関わらず変化はなかった。培養液中の成分の解析やC2C12の培養時間などの検討が必要である。

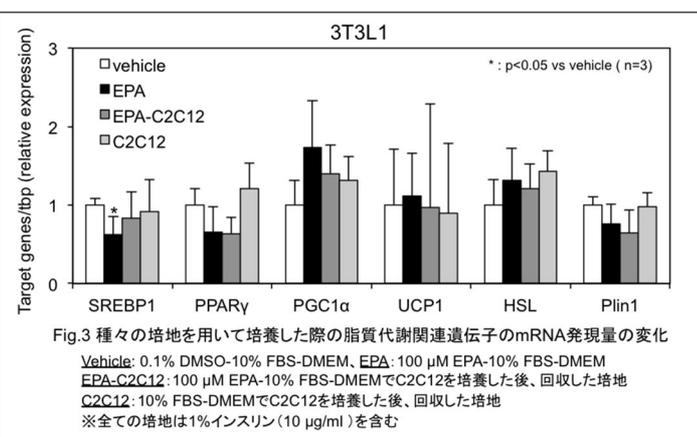


Fig.3 種々の培地を用いて培養した際の脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現量の変化

Vehicle: 0.1% DMSO-10% FBS-DMEM, EPA: 100  $\mu$ M EPA-10% FBS-DMEM  
EPA-C2C12: 100  $\mu$ M EPA-10% FBS-DMEMでC2C12を培養した後、回収した培地  
C2C12: 10% FBS-DMEMでC2C12を培養した後、回収した培地  
※全ての培地は1%インスリン(10  $\mu$ g/ml)を含む

#### 実験4 筋芽細胞へのEPA代謝物の添加試験

C2C12 から形成した筋管に 100  $\mu$ M EPA、レゾルビン E1 (RvE1)、8-ヒドロキシエイコサノイド (8-HEPE) を添加した結果、脂質代謝を促進する PDK4 の mRNA 発現量が有意に増加した (Fig.4)。8-HEPE には脂質代謝促進因子 PPAR $\delta$  および  $\alpha$  のリガンド活性を有することがすでに報告されている (Yamada *et al.*, *Journal of Lipid Research*, 2014) ため、予想通りの結果であった。一方、レゾルビン E1 は筋の脂質代謝を促進する報告はなく、初めて明らかになった。この他にも EPA 代謝物の脂質代謝への影響や EPA が体内でどの程度、どの物質に代謝されるかを明らかにしていきたい。

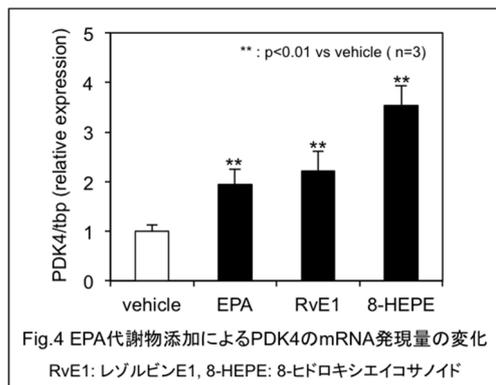


Fig.4 EPA代謝物添加によるPDK4のmRNA発現量の変化  
RvE1: レゾルビンE1, 8-HEPE: 8-ヒドロキシエイコサノイド

以上より、魚油に含まれるエイコサペンタエン酸は骨格筋脂質代謝を亢進させることが明らかとなった。EPA 添加によるマイオカインとしての脂肪細胞への影響は確認できなかったが、実験手法の検討により今後明らかにしていきたい。また、EPA 代謝物であるレゾルビン E1 および 8-ヒドロキシエイコサノイドに筋脂質代謝促進の可能性が見出されたため、今後のさらなる解明を目指す。本研究成果は、スポーツ・健康科学分野において、肥満や運動不足が問題視されている現代社会への貢献できる知見であると期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yokoyama I, Nakai Y, Suzuki Y, Ohata M, Komiya Y, Nagasao J, Arihara K	4. 巻 85
2. 論文標題 DMHF (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone), a volatile food component generated by the Maillard reaction, promotes appetite and changes gene expression in the rat brain through inhalation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 1338-1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1750-3841.15102	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 Suzuki R, Sato Y, Obeng KA, Suzuki D, Komiya Y, Adachi S, Yoshizawa F, Sato Y	4. 巻 77
2. 論文標題 Energy metabolism profile of the effects of amino acid treatment on skeletal muscle cells: Leucine inhibits glycolysis of myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2020.110794	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 -
1. 著者名 Watanabe N, Komiya Y, Sato Y, Watanabe Y, Suzuki T, Arihara K	4. 巻 525
2. 論文標題 Oleic acid up-regulates myosin heavy chain (MyHC) 1 expression and increases mitochondrial mass and maximum respiration in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 406-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.099	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 -
1. 著者名 Komiya Y, Kobayashi C, Uchida N, Otsu S, Tanio T, Yokoyama I, Nagasao J, Arihara K	4. 巻 90
2. 論文標題 Effect of dietary fish oil intake on ubiquitin ligase expression during muscle atrophy induced by sciatic nerve denervation in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1018-1025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13224	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 Komiya Y, Nakamura T, Ishii M, Shimizu K, Hiraki E, Kawabata F, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W	4. 巻 90
2. 論文標題 Increase in muscle endurance in mice by dietary Yamabushitake mushroom ( <i>Hericium erinaceus</i> ) possibly via activation of PPAR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 781-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13199	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 -

1. 著者名 Abdallah R, Moustafa NY, Kirrella GAK, Al-Hawary II, Komiya Y, Arihara K	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of NaCl reduction and substitution with KCl on behavior and functional characteristics of <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> ferm P-15120 in fermented beef sausage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Animal & Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 744-753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小宮佑介、丸山アレクサンデル、渡辺裕介、内田直愛、大津翔平、小林千亜暉、横山壱成、鈴木貴弘、中村真子、辰巳隆一、池内義秀、水野谷航、有原圭三	4. 巻 62
2. 論文標題 食品としての油脂が骨格筋の代謝特性へ与える影響と筋線維タイプとの関連	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 栄養生理研究会報	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tatsumi Ryuichi, Suzuki Takahiro, Do Mai-Khoi Q., Ohya Yuki, Anderson Judy E., Shibata Ayumi, Kawaguchi Mai, Ohya Shunpei, Ohtsubo Hideaki, Mizunoya Wataru, Sawano Shoko, Komiya Yusuke et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 1815-1834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2639	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 小宮佑介	4. 巻 58
2. 論文標題 ラット成熟筋線維の単離・長期培養法の確立	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 食肉の科学	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mizunoya Wataru, Okamoto Shinpei, Miyahara Hideo, Akahoshi Mariko, Suzuki Takahiro, Do Mai-Khoi Q., Ohtsubo Hideaki, Komiya Yusuke, Qahar Mula, Waga Toshiaki, Nakazato Koichi, Ikeuchi Yoshihide, Anderson Judy E., Tatsumi Ryuichi	4. 巻 88
2. 論文標題 Fast-to-slow shift of muscle fiber-type composition by dietary apple polyphenols in rats: Impact of the low-dose supplementation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 489-499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.12655	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Komiya Y, Watanabe N, Nagasao J, Arihara K
2. 発表標題 Oleic acid up-regulates mRNA expression of both genes related fat utilization and accumulation and a part of them via PPAR activation in C2C12 myoblasts
3. 学会等名 Conference abstract of 65th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小宮佑介, 大澤南菜子, 落合優, 長竿淳, 有原圭三
2. 発表標題 オリーブオイル摂取はマウス骨格筋および肝臓の脂肪蓄積を促進させる
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 第73回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小宮佑介, 大澤南菜子, 落合優, 長竿淳, 有原圭三
2. 発表標題 オリーブオイル摂取はマウス骨格筋の良質な脂肪滴の蓄積を促進させるか
3. 学会等名 日本畜産学会 第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Komiya Y, Maruyama A, Uchida N, Otsu S, Kobayashi C, Yokoyama I, Arihara K
2. 発表標題 Dietary olive oil reduces fat amount and improves running endurance with up-regulation of fat metabolic protein in mouse skeletal muscle
3. 学会等名 Conference abstract of IFT18 Annual Meeting & Food Expo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komiya Yusuke, Maruyama Alexander, Arihara Keizo
2. 発表標題 Dietary olive oil shows lower body fat gain and improves running endurance
3. 学会等名 日本畜産学会 第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宮佑介
2. 発表標題 食品としての油脂が骨格筋の代謝特性へ与える影響と筋線維タイプとの関連
3. 学会等名 平成30年度 家畜栄養生理研究会 春季集談会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宮佑介、小林千亜暉、内田直愛、大津翔平、有原圭三
2. 発表標題 魚油摂取は除神経処理による骨格筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 第3回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小宮佑介、内田直愛、大津翔平、小林千亜暉、有原圭三
2. 発表標題 オリーブオイル摂取はマウス骨格筋の脂肪代謝関連遺伝子発現を増加し、体脂肪を減少させる
3. 学会等名 第71回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
連携研究者	有原 圭三  (Arihara Keizo)  (00175994)	北里大学・獣医学部・教授   (32607)	
連携研究者	水野谷 航  (Mizunoya Wataru)  (20404056)	麻布大学・獣医学部・准教授   (32701)	
連携研究者	佐藤 祐介  (Sato Yusuke)  (50589520)	宇都宮大学・農学部・講師   (12201)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	鈴木 貴弘  (Suzuki Takahiro)  (80750877)	北海道大学・農学研究院・助教    (10101)	