

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15485

研究課題名（和文）オレイン酸による新生および成熟筋線維における遅筋タイプ増加機構に関する研究

研究課題名（英文）Study of muscle fiber type regulation by oleic acid

研究代表者

小宮 佑介 (Komiya, Yusuke)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80791665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はオレイン酸による筋細胞の筋線維タイプ制御機構を細胞ステージに着目して明らかにすることを目的とした。まず細胞試験で、オレイン酸は新生および成熟筋線維のいずれにおいても脂質代謝関連因子の発現量増加を促進するが、遅筋タイプマーカーMyHC1は新生筋線維のみで増加することを見出した。動物実験では、オレイン酸を豊富に含むオリーブオイル7%配合飼料をマウスに8週間摂取させた結果、骨格筋エネルギー基質である筋内脂肪の増加に伴うトレッドミル走行持久力の向上することを明らかにした。また、マウスに10%オレイン酸混合飼料を4週間摂取させた結果、MyHC1の発現量増加および走行持久力の向上が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の特色は、運動トレーニングでしか得ることができない骨格筋特性の変化を食品成分で代替可能であることを示唆するものであり、既知の食品成分であるオレイン酸に「遅筋タイプ増加による脂肪燃焼促進」などの新規機能性を付与できると考える。本成果は筋機能への作用を売りとした運動を模倣する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に貢献できる。また、本研究では細胞ステージにも着目しており、オレイン酸の機能が最大限発揮される骨格筋細胞の状態を解明することで、摂取する場面（運動中、筋再生中など）の提唱にもつながる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of muscle fiber type regulation induced by oleic acid in newly formed myotubes and matured muscle fibers. We found that supplementation of oleic acid increased the mRNA expression levels of genes relating lipid metabolism in both cells. In contrast, only in myotubes treated with oleic acid increased mRNA expression of type 1 fiber marker (MyHC1). We elucidated that dietary olive oil intake improved running endurance with increase of intramuscular triacylglycerol in mice. Moreover, dietary oleic acid intake increased MyHC1 expression, which contributed to improvement of running endurance in mice.

研究分野：食品機能

キーワード：オレイン酸 遅筋 筋線維タイプ 成熟筋線維 新生筋線維 MyHC1 オリーブオイル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は筋線維と呼ばれる多核で細長い筋細胞が束になることで構成されている。この筋線維は特性の違いから遅筋タイプ(1型)、中間タイプ(2A, 2X型)、速筋タイプ(2B型)に分類される。筋組織はこれらの異なるタイプの筋線維がモザイク状に配置されるため、筋線維タイプの比率により筋組織としての収縮や代謝特性が決定される。特に遅筋タイプの筋線維はミトコンドリアを豊富に含み、持久的に力を発揮することや脂質代謝に優れているため、その割合の増加により疲れにくく、痩せ易い体質作りにつながる。申請者は遅筋タイプを増加させる食品成分として n-9 系の不飽和脂肪酸の一種であるオレイン酸に着目している。これまでに申請者はオレイン酸をマウス由来筋芽細胞株 C2C12 から分化誘導した筋管に 6 時間作用させることで遅筋タイプマーカーであるミオシン重鎖 (MyHC) 1、ミトコンドリアに関する PGC1 α 、CPT1 β 、脂質利用を促進する PDK4 などの mRNA 発現量が増加し、さらに筋芽細胞から筋管を形成させる過程において、オレイン酸を 120 時間作用させると、形成される筋管のミトコンドリア量が増加することを明らかにしている (Watanabe and Komiya et al., 2020, Biochem Biophys Res Commun)。また、一般に骨格筋の培養モデルとして筋管が使用されるが、生体を構成する筋線維は成熟筋線維と称され、筋管(新生筋線維)とはその形態や収縮タンパク質の発現量が異なることも我々の研究によりわかっている (Komiya et al., 2015, Anal Biochem, Data in Brief)。しかしオレイン酸の成熟筋線維への作用は不明である。また、オレイン酸摂取が骨格筋特性や機能にどのように影響するかも明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は食品成分であるオレイン酸が骨格筋に作用し、その特性を変化させること(遅筋タイプ増加)ができるかを検証し、そのオレイン酸の作用メカニズムを解明することである。また、骨格筋細胞は物理刺激や筋損傷からの回復時に筋芽細胞が分化融合し形成される筋管(新生筋線維)筋組織を構成している成熟筋線維の異なる状態で存在するため、各細胞へのオレイン酸の影響を検証する。

3. 研究の方法

実験1 オリーブオイル摂取試験 (Komiya et al., 2021, Nutrients)

オリーブオイルはその脂肪酸組成のおよそ 70% がオレイン酸である。8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用し、オリーブオイル 7% 配合飼料を 8 週間給餌した。コントロールには 7% 大豆油配合飼料を用いた。飼育 7 週目にトレッドミルを用いたランニングテスト、経口糖負荷試験 (OGTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行った。飼育期間終了後、血清および骨格筋組織を摘出した。血清は血液生化学試験を行った。摘出した骨格筋は筋内脂肪含有量の測定、mRNA およびタンパク質の発現量解析を行なった。

実験2 オレイン酸摂取試験

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用し、オレイン酸 10% 配合飼料を 4 週間給餌した。飼育 3 週目にトレッドミルを用いたランニングテストを行った。飼育期間終了後、骨格筋組織を摘出し、mRNA およびタンパク質の発現量解析を行なった。

実験3 オレイン酸が成熟筋線維に及ぼす影響

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの短趾屈筋を摘出し、0.5% コラゲナーゼ溶液で 3 時間インキュベートした。ピペッティングにより組織を筋線維に単離し、それを成熟筋線維とした。100 μ M オレイン酸-30%FBS-DMEM で培養した。6 時間後に細胞を回収し、筋線維タイプや脂質代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現量を qPCR 法により解析した。

4. 研究成果

実験1 オリーブオイル摂取試験 (Komiya et al., 2021, Nutrients)

オリーブオイル摂取により、トレッドミル走行持久力の向上が確認された(図 1)。その要因として、骨格筋のエネルギー基質である筋内脂肪 (IMTG) の増加が確認された(図 2)。IMTG の増加はインスリン感受性の低下などを引き起こすことが知られているため、OGTT および ITT を実施したところ、コントロール群と比較して有意な変化は認められず、オリーブオイル摂取による IMTG の増加はインスリン抵抗性は誘導しないことが示唆された。血液生化学検査においても 2 群間に有意な差は確認されなかった。またインスリン抵抗性の原因とされるジアシルグリセロールは IMTG

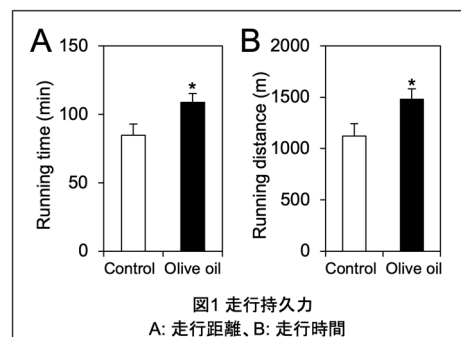


図1 走行持久力

A: 走行距離、B: 走行時間

からは検出されなかった。IMTG 増加に関与する因子を同定するために骨格筋サンプルを用いて脂質代謝に関連する因子のタンパク質発現量を解析した。その結果、トリアシルグ

リセロール合成酵素である DGAT1 の有意な増加が確認された (図 3)。DGAT1 は運動トレーニングによる IMTG の増加にも関与しており、オリーブオイル摂取による IMTG の増加および持久力の向上は運動トレーニングを模倣していることが示唆された。

実験 2 オレイン酸摂取試験

オレイン酸の摂取により、トレッドミル走行持久力の向上が確認された。ウエスタンブロッティングの結果、遅筋タイプマーカーである MyHC1 およびミトコンドリア外膜に存在する Porin の有意な発現量の増加が確認された。また、蛍光免疫化学組織染色の結果、腓腹筋の一部で有意な MyHC1 陽性細胞の増加が確認された (図 4)。以上より、オレイン酸摂取は骨格筋の収縮特性を遅筋タイプへ誘導し、持久力を向上させることが示唆された。

実験 3 オレイン酸が成熟筋線維に及ぼす影響

オレイン酸の添加により短趾屈筋から単離した筋線維で有意な PDK4 などの脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量の増加が確認された。これは C2C12 細胞で確認された作用と類似していた。一方で、MyHC1 などの収縮に関連するタンパク質には有意な変化は確認されなかった。

以上より、オレイン酸は新生筋線維において遅筋タイプマーカーである MyHC1 を増加させる一方で、成熟筋線維においては影響しないことが示唆された。しかし本研究で成熟筋線維の単離に使用した短趾屈筋は MyHC2A および 2X から構成される骨格筋であるため、今回成熟筋線維で確認された結果は 2A と 2X のみにおいて生じた結果である可能性がある。そのため成熟筋線維でのオレイン酸評価をするにあたり、筋線維タイプ毎に細胞を分取する技術が必要である。現在、筋線維タイプに蛍光標識を施した遺伝子組換えマウスを用いて筋線維タイプごとの成熟筋線維の単離に取り組んでいる (図 5)。

また、オレイン酸をリガンドとする核内受容体である PPAR に着目して、遅筋タイプ増加メカニズムの解明に取り組んでいる。現在、CRISPR/Cas9 法により骨格筋特異的 PPAR ノックアウトマウスを作製し、その骨格筋特性の解明に取り組んでいる。

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に貢献できる知見となることを期待する。

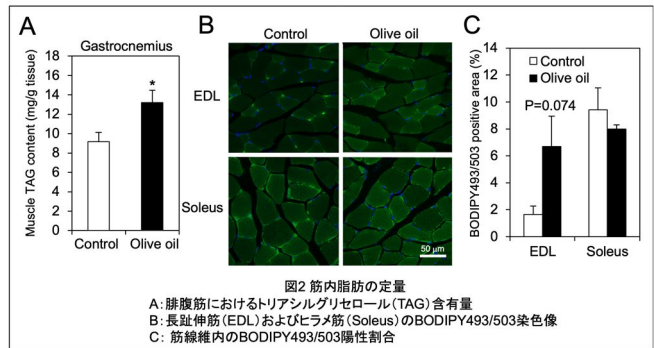


図2 筋内脂肪の定量
A: 腓腹筋におけるトリアシルグリセロール (TAG) 含有量
B: 長趾伸筋 (EDL) およびヒラメ筋 (Soleus) の BODIPY493/503 染色像
C: 筋線維内の BODIPY493/503 陽性割合

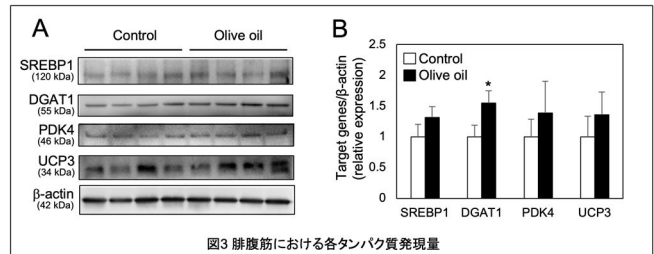


図3 腓腹筋における各タンパク質発現量

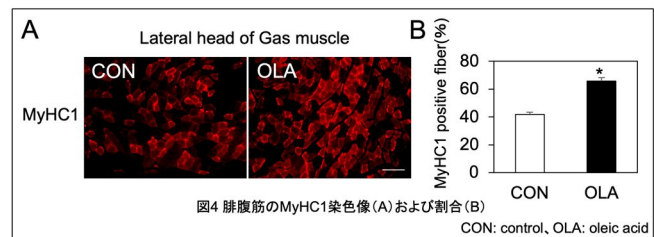


図4 腓腹筋の MyHC1 染色像 (A) および割合 (B)
CON: control, OLA: oleic acid

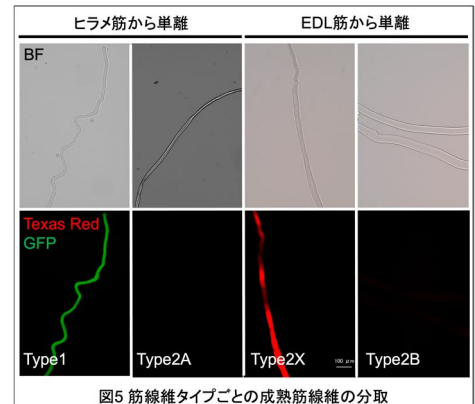


図5 筋線維タイプごとの成熟筋線維の分取

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Komiya Yusuke, Sugiyama Makoto, Ochiai Masaru, Osawa Nanako, Adachi Yuto, Iseki Shugo, Arihara Keizo | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Dietary Olive Oil Intake Improves Running Endurance with Intramuscular Triacylglycerol Accumulation in Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 1164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13041164 | 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 Yusuke, Mizunoya Wataru, Kajiwara Kurumi, Yokoyama Issei, Ogasawara Hideki, Arihara Keizo | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Correlation between skeletal muscle fiber type and responses of a taste sensing system in various beef samples | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Animal Science Journal | 6. 最初と最後の頁 e13425 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13425 | 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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小宮佑介、渡辺裕介、田中康之、藤田彩夏、長竿淳、有原圭三 |
| 2. 発表標題 オレイン酸摂取はマウス骨格筋の遅筋タイプを増加させ、持久力を向上させる |
| 3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊関柊吾、有原圭三、小宮佑介 |
| 2. 発表標題 オレイン酸がマウス成熟筋線維の筋線維タイプに及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 足立優斗、有原圭三、小宮佑介 |
| 2. 発表標題 ロイシンジペプチドがマウス骨格筋に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小宮佑介、落合優、有原圭三 |
| 2. 発表標題 オリーブオイル摂取によるマウス筋内脂肪蓄積の促進はDGAT1の増加に起因する |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yusuke Komiya, Shugo Iseki, Yuto Adachi, Keizo Arihara |
| 2. 発表標題 Oleic acid supplementation up-regulates transcript expression of oxidative metabolic genes in murine isolated muscle fiber |
| 3. 学会等名 67th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小宮佑介 |
| 2. 発表標題 筋細胞のオレイン酸応答性の研究-筋線維特性に着目したアプローチ- |
| 3. 学会等名 第24回日本畜産学会若手企画シンポジウム 若手が考えるこれからのアニマルサイエンス2022 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小宮佑介、久野萌花、小島千佳、横山杏成、長竿淳、有原圭三 |
| 2. 発表標題 メイラード反応生成物はマウス筋細胞の筋管サイズを肥大させる |
| 3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shugo Iseki, Koichi Ojima, Keizo Arihara, Yusuke Komiya |
| 2. 発表標題 The effects of oleic acid on matured muscle fibers isolated from mice: fiber type-specific analysis |
| 3. 学会等名 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yusuke Komiya, Wataru Mizunoya, Keizo Arihara |
| 2. 発表標題 EPA activates PPAR and AMPK pathways in L6 myotubes |
| 3. 学会等名 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 特許権 | 発明者 小宮佑介、有原圭三 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-75569 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|