

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05419

研究課題名（和文）骨格筋の代謝機能および量的維持に対するイソチオシアネート化合物の作用機序解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of action of isothiocyanates on metabolic function and quantitative maintenance of skeletal muscle

研究代表者

伊藤 芳明 (Ito, Yoshiaki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：50312517

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）：西洋わさび等に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC)は既知の抗酸化活性に加えて、細胞系での解析からAktを介した筋タンパク質分解抑制作用が期待できることが分かった。本研究では、酸化ストレスを伴う尾部懸垂による筋萎縮モデルを用いた解析から、内因性抗酸化機能の亢進が尾部懸垂に伴う骨格筋の酸化ストレスを軽減すること、また筋タンパク質分解を抑制することを見出した。加えて、C2C12細胞で観察されていたPEITC刺激による細胞内シグナル分子の応答が単離筋切片を用いたex vivoインキュベーション系でも見られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネート化合物には、従来から生体の抗酸化機能を惹起する効果があることが知られていた。研究代表者はそれに加え、タンパク質代謝制御に関わるAktの活性化を誘導することを骨格筋細胞の解析から見出していた。本研究で、廃用性筋萎縮モデルで酸化ストレス軽減と筋タンパク質分解抑制効果が見られたこと、また、筋切片をPEITCで刺激した際も細胞と同じ効果が認められたことから、細胞系だけでなく生体においても骨格筋の機能維持に対して、イソチオシアネート化合物の健康有益性を明らかにするものであり、食材成分による疾患の予防や緩和などの応用展開の基礎となるものである。

研究成果の概要（英文）：Phenethyl isothiocyanate (PEITC), found in horseradish and other plants, has been shown to possess antioxidant activity and is expected to inhibit muscle protein degradation through the Akt pathway based on our previous cell line studies. In this study, using a tail suspension-induced muscle atrophy model associated with oxidative stress, we found that enhancing endogenous antioxidant functions mitigates skeletal muscle oxidative stress and inhibits muscle protein degradation. Additionally, we demonstrated that the cellular signaling responses to PEITC stimulation observed in C2C12 cells are also observed in an ex vivo incubation system using isolated skeletal muscles.

研究分野：栄養化学

キーワード：骨格筋 イソチオシアネート 食品機能 糖代謝 タンパク質代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は体重の約40%を占める最大の臓器で、食後血糖の約7割のクリアランスに寄与し、糖代謝調節の上で重要な組織である。加齢に伴う骨格筋量の減少は糖利用器官の量的な低下のみならず、活動低下から来る全身的な糖消費の低下につながり、複合的な代謝障害の要因ともなる。従って、骨格筋における糖利用活性といった代謝機能的な維持と共に、量的な筋肉の維持は、活動力の維持という面だけでなく糖尿病等の代謝性疾患の予防や緩和にも繋がり、我々の健康維持にとって重要である。

日常的な食材でもあるダイコン、わさびやブロッコリーなどのアブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネート化合物は、Nrf2経路を介した抗酸化・解毒活性の誘導効果があることはよく知られている。研究代表者はこの抗酸化機能活性とは別に、マウス骨格筋由来C2C12において西洋わさびやクレソン等に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC)がAktを介したインスリン様活性(糖取り込み活性)を有することを明らかにしている。一方、骨格筋はベツレストなどの不使用により萎縮が起こるが、この萎縮の背景要因の1つに酸化ストレスの増加が指摘されている。抗酸化物質による骨格筋の萎縮抑制効果はアスタキサンチンなどで例はあるが、内因性の抗酸化誘導活性を持つイソチオシアネート化合物での報告はない。骨格筋のタンパク質分解の抑制シグナルであるAktの活性化と抗酸化機能誘導活性を持つイソチオシアネート化合物は、酸化ストレス負荷を伴う筋分解に対して高い保護効果が期待できるが、その効果は不明であった。

### 2. 研究の目的

上記の背景を基に、本研究ではアブラナ科野菜の食材に含まれるイソチオシアネート化合物の一つPEITCの健康有益性の評価研究として、最大の糖消費器官であり、運動などの活動を支える重要器官でもある骨格筋の機能維持に対する効果と作用機序を明らかにすることを目的として、1.酸化ストレスを伴う尾部懸垂モデルによる後肢の廃用性筋萎縮において、骨格筋のタンパク質分解抑制に対するPEITCの有効性評価、2.骨格筋切片を用いたex vivoインキュベーション系によるPEITCに対する細胞内シグナル応答の解析、について取り組むこととした。以上から、PEITCの骨格筋の量的維持効果とそれによる代謝機能維持に関して、より生体に近い系での有効性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)尾部懸垂モデルにおけるPEITCによる骨格筋タンパク質分解に対する影響に関する解析方法  
実験動物として4週齢Wistar系雄性ラット(60~80g)を用いた。ラットは個別にステンレスケージに入れ、室温 $22 \pm 1$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ の条件下で、午前6時から午後6時までの12時間明暗サイクルで飼育した。水は水道水を自由飲水させた。当初飼料はAIN-93G組成20%カゼイン食を自由摂食させた。その後、時間制限給餌を行い、摂食時間を9時間(9:00~18:00)に制限した。群分けは20%カゼイン食、20%カゼイン+0.1%PEITC食の2群とし、約1週間給餌した後、尾部懸垂を施さず20%カゼイン食を与えるC群、尾部懸垂を施し20%カゼイン食を与えるHC群、尾部懸垂を施し20%カゼイン+0.1%PEITC食を与えるHP群にさらに群分けし、所定日数の間、尾部懸垂を施した。屠殺後、速やかに肝臓と長指伸筋、ヒラメ筋、腓腹筋などの筋肉を採取し、重量測定後、凍結保存した。一部の骨格筋切片は筋タンパク質の分解速度の指標として3-メチルヒスチジン(3-MeHis)の緩衝液中への放出量の測定に供した。また、その他、凍結組織からlysateを調製しWestern blottingによる抗酸化酵素および筋タンパク質分解関連因子の測定および組織の酸化レベルの指標としてTBARS法にてマロンジアルデヒド量を測定した。

(2)Ex vivoインキュベーション系による単離筋切片のPEITCに対する応答に関する解析方法  
実験動物より分離した長指伸筋やヒラメ筋といった摘出筋を生理的条件を模した緩衝液(KRB緩衝液)で一定時間インキュベーションすることで、緩衝液中に放出された3-MeHisの濃度から筋原線維タンパク質の分解速度を評価することができるが、ここではその系を利用して、緩衝液中にPEITCを添加するex vivo実験系を構築し、PEITCによる骨格筋タンパク質分解抑制効果について解析を行った。

Wistar系雄性ラットから単離した長指伸筋とヒラメ筋をKRB緩衝液にいれ、37、30分間のブレインキュベーションを行った後、新たな緩衝液に替え、本インキュベーションを行った。筋肉を新たな緩衝液に移し替えた直後にPEITCを種々の濃度(20P群:PEITC 20  $\mu$ M、30P群:PEITC 30  $\mu$ M、40P群:PEITC 40  $\mu$ M)で加えた。コントロール群(C群)ではPEITCの溶媒であるエタノールをPEITC添加群と等量となるように添加した。インキュベーション終了後、筋肉をKRB緩衝液から取り出し筋重量を測定した。筋肉および緩衝液は分析するまで-80で凍結保存した。緩衝液中の3-MeHis量および筋切片からlysateを調製しWestern blotting分析に供した。

### (3)統計処理

データは平均値(Mean)と標準誤差(SE)で表し、有意差はMacintosh InStat3.0(Graphpad

Software) を使用し、一元配置の分散分析 (ANOVA) を行った。群間に有意差が認められた場合には Tukey multiple comparison post test により多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 尾部懸垂モデルにおける PEITC による骨格筋タンパク質分解に対する影響評価

初めに PEITC 摂取が肝臓および骨格筋における抗酸化酵素の発現応答に与える変化を Western blotting にて追跡した。その結果、図 1 に示すように PEITC で活性される転写因子 Nrf2 の下流で制御される抗酸化酵素、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)、gamma-glutamylcysteine synthase (GCLC) のうち、NQO-1 において肝臓およびヒラメ筋における PEITC に応答した変化が認められた。

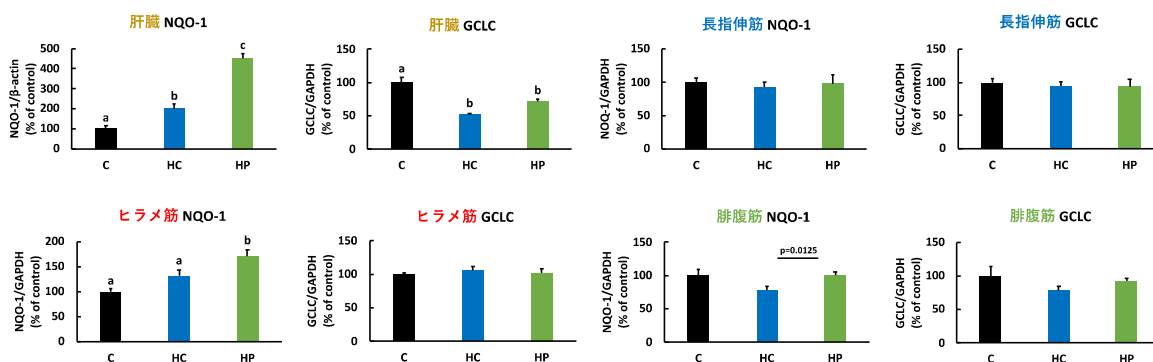


図 1 20%カゼイン食、20%カゼイン食+0.1% PEITC 食の給餌下において非懸垂あるいは 3 日間尾部懸垂を行った時の肝臓、長指伸筋、ヒラメ筋および腓腹筋における抗酸化酵素 (NQO1 および GCLC) の発現量の変化

値は Mean  $\pm$  SE (n=6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)、C:20%カゼイン食群、HC:20%カゼイン食+尾部懸垂群、HP:20%カゼイン+0.1% PEITC 食+尾部懸垂群

次に酸化ストレスの指標として、懸垂 7 日目における腓腹筋における TBARS 量を測定したところ、懸垂群に対して PEITC 食を給餌した懸垂群 (HP 群) で減少する様子が認められ、懸垂で上昇した酸化ストレスが PEITC の摂取により低下することが認められた (図 2)。

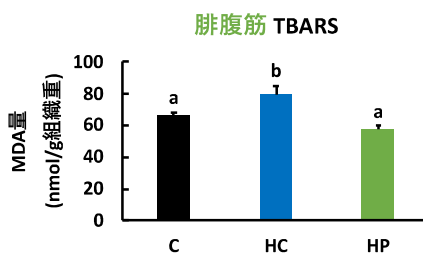


図 2 20%カゼイン食、20%カゼイン食+0.1% PEITC 食の給餌下において非懸垂あるいは 7 日間尾部懸垂を行った時の腓腹筋における過酸化脂質 (TBARS) 量の変化

値は Mean  $\pm$  SE (n=6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)、C:20%カゼイン食群、HC:20%カゼイン食+尾部懸垂群、HP:20%カゼイン+0.1% PEITC 食+尾部懸垂群

次に筋タンパク質分解に及ぼす影響を検討した。その結果、非懸垂群に対して懸垂によりユビキチン・プロテアソーム系に關与するユビキチンリガーゼの 1 つである Murf1 の発現上昇がみとめられ、PEITC の給餌により抑制が認められた。一方、その際、その発現制御に關わる可能性があり、また PEITC により活性化が誘導されることが認められていた細胞内シグナル分子である Akt の活性化レベルを検討したが、それについては PEITC 摂取による影響は認められなかった (図 3 および図 4)。

さらに、筋原線維の分解指標である 3-MeHis の放出速度を測定したところ、これについても PEITC の摂取により有意な低下が認められた (図 5)。これらのことから、PEITC の摂取は懸垂により上昇した酸化ストレスを軽減し、酸化ストレスに伴う筋タンパク質分解の亢進に対して抑制効果を有する可能性が考えられた。しかしながら、今回の摂取では懸垂による筋重量の低下は

抑制しきれいでいなかった。このことから、PEITC の摂取は一過的あるいはある程度の筋タンパク質の分解は抑制できる可能性があるが、懸垂による著しい筋タンパク質の重量減少そのものを抑制できるほどの効果は期待できないと考えられた。

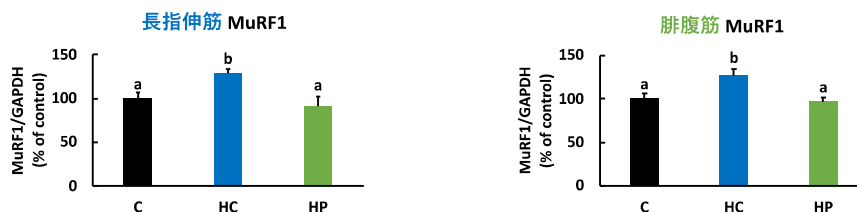


図3 20%カゼイン食、20%カゼイン食+ 0.1% PEITC 食の給餌下において非懸垂あるいは3日間尾部懸垂を行った時の長指伸筋および腓腹筋における筋タンパク質分解関連因子 (MuRF-1) の発現量の変化

値は Mean  $\pm$  SE (n=6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)、C:20%カゼイン食群、HC:20%カゼイン食+尾部懸垂群、HP:20%カゼイン+ 0.1%PEITC 食+尾部懸垂群

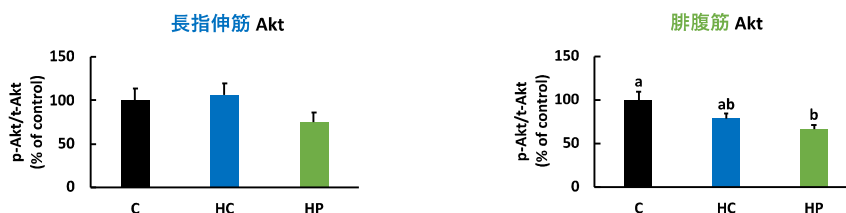


図4 20%カゼイン食、20%カゼイン食+ 0.1% PEITC 食の給餌下において非懸垂あるいは3日間尾部懸垂を行った時の長指伸筋および腓腹筋における Akt 活性の変化

値は Mean  $\pm$  SE (n=6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)、C:20%カゼイン食群、HC:20%カゼイン食+尾部懸垂群、HP:20%カゼイン+ 0.1%PEITC 食+尾部懸垂群

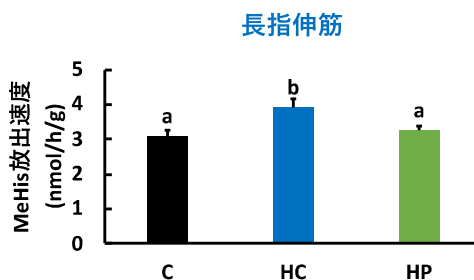


図5 20%カゼイン食、20%カゼイン食+0.1%PEITC 食の給餌下において非懸垂あるいは2日間尾部懸垂を行った時の長指伸筋における 3-MeHis 放出速度の変化

値は Mean  $\pm$  SE (n=6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)、C:20%カゼイン食群、HC:20%カゼイン食+尾部懸垂群、HP:20%カゼイン+ 0.1%PEITC 食+尾部懸垂群

## (2) Ex vivo インキュベーション系による単離筋切片の PEITC に対する応答評価

上記の検討では、骨格筋におけるイソチオシアネート化合物による抗酸化活性の惹起が不使用による骨格筋タンパク質の分解に対して抑制効果をもたらす可能性が示された。一方、これまでに細胞系による検討で PEITC は糖代謝促進に関わる Akt の活性化を引き起こすことを見出している。Akt は骨格筋タンパク質の分解抑制にも寄与しうることから、上記ではその活性の変化も見たがその変化は認められなかった。細胞系でみられた Akt 誘導が生体組織では起こらないのかを明らかにするために ex vivo インキュベーション系における PEITC 刺激における Akt とその他のシグナル分子の動態と、同インキュベーション系における PEITC 刺激による骨格筋タンパク質分解抑制効果を検討した。

初めに、インキュベーション緩衝液に種々の濃度の PEITC を添加したときの長指伸筋およびヒラメ筋からの 3-MeHis 放出速度の変化を検討したところ、長指伸筋において PEITC の添加による 3-MeHis 放出の抑制が見られた。一方、ヒラメ筋では低下する動きは見られるが有意な変化

には至らなかった(図6)。このことからC2C12細胞と同様な効果は生体においても認められる可能性があると考えられるが、その効果は骨格筋組織により異なる可能性が考えられた。現段階では、この差異が骨格筋の性質の違い、すなわち、赤筋であるヒラメ筋と白筋である長指伸筋の違いによるものなのかどうかまでは明確ではなく、刺激誘導のメカニズムも含めて今後の検討が必要であると考えられる。

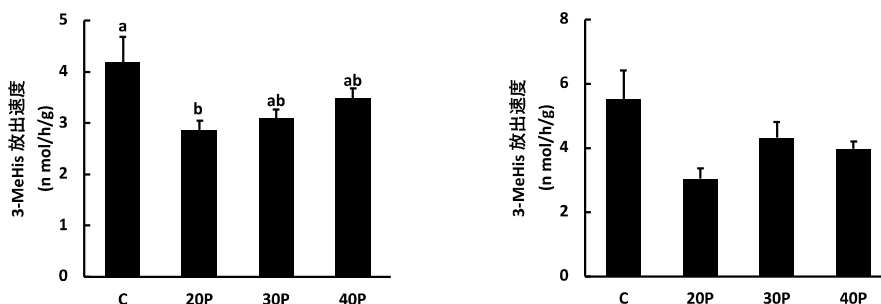


図6 異なる濃度のPEITCによるラット長指伸筋(左)およびヒラメ筋(右)における3-MeHis放出速度の変化  
 値はMean ± SE(n=4)。異なる記号間で有意差あり(p<0.05)。C:非添加群、20P:PEITC 20μM 添加、30P:PEITC 30μM 添加、40P:PEITC 40μM 添加

次にそれぞれの単離筋切片を刺激した際の細胞シグナル分子の活性応答について Western blotting で追跡した。その結果、図7に示すようにAkt、Erk および p38MAPK などの応答が認められた。ここでもヒラメ筋よりも長指伸筋の方が明確な応答が得られる様相を示した。

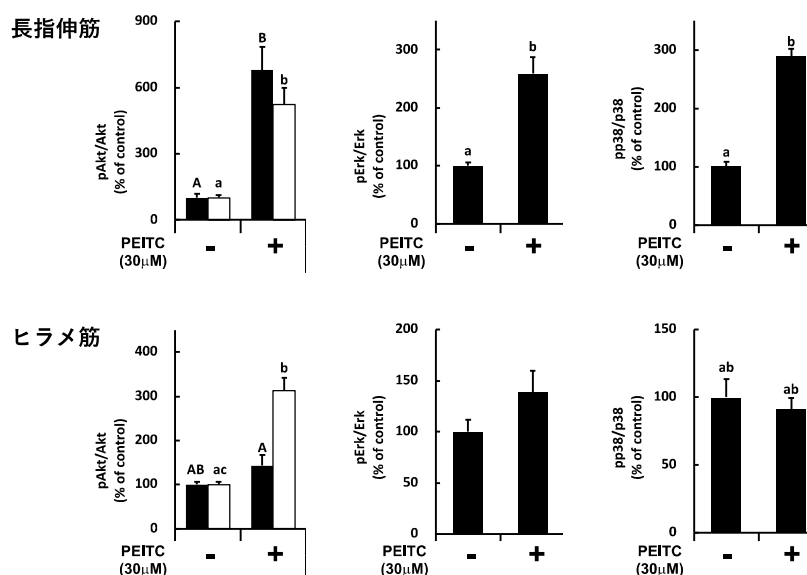


図7 PEITCによるラット長指伸筋(上段)およびヒラメ筋(下段)におけるAkt,Erk および p38MAPK のリン酸化応答の変化  
 インキュベーション系において、PEITC30μMで刺激した時の応答を示す。また、AktのグラフではblackがThr308をwhiteがSer473のリン酸化応答を表す。値はMean ± SE(n=6)。異なる記号間で有意差あり(p<0.05)。

以上から、PEITCは酸化ストレスを背景因子の1つに持つ不使用による廃用性筋萎縮モデルにおいて、酸化ストレスを軽減し、筋タンパク質の分解を抑制することが分かった。また、生体により近い単離筋切片を用いた系において、PEITCで刺激することにより細胞系で認められたものと同様な筋タンパク質分解抑制作用と細胞内シグナル分子の活性化を惹起することが明らかとなり、PEITCの生体における骨格筋の量および機能的な維持に対する有用性が期待できる知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山木大輔、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 尾部懸垂による骨格筋萎縮に対する フェネチルイソチオシアネート摂取の有効性解析
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石沢清太、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 Ex vivo実験法を用いたフェネチルイソチオシアネートによる骨格筋タンパク質分解抑制効果の解析
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 石沢清太、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 フェネチルイソチオシアネートによる骨格筋タンパク質分解抑制効果の作用機序解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会東北支部（第55回大会）・北海道支部（第51回大会）合同支部大会およびシンポジウム
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------