

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05456

研究課題名（和文）酢酸によるヒト骨格筋GPR43の活性化と骨格筋機能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文）Effect of acetic acid on the activation of GPR43 in skeletal muscle and skeletal muscle function

研究代表者

山下 広美 (Yamashita, Hiromi)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70254563

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）：加齢に伴う生活機能低下の要因の一つとして、骨格筋系の老化が挙げられ、その成因としてミトコンドリアの機能障害が関与することが知られる。本研究では、筋線維タンパク質やミトコンドリアの増化、また骨格筋のエネルギー代謝改善において酢酸がどのような役割を果たすか、ヒト骨格筋細胞を用いて解析した。その結果、ヒト骨格筋細胞において酢酸は呼吸代謝関連因子の発現を誘導し、骨格筋機能改善に寄与すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う生活機能低下の要因の一つとして、骨格筋系の老化や肥満が挙げられ、その成因として、ミトコンドリアの機能障害が関与することが知られている。本研究により、酢酸はヒト骨格筋におけるミトコンドリアの増幅機能、また骨格筋の呼吸代謝改善の機能を有することが示唆された。これより、食品から酢酸を摂取することにより、ヒトの加齢による骨格筋機能の低下やエネルギー代謝異常の改善に寄与できると考える

研究成果の概要（英文）：Aging is accompanied by the loss of skeletal muscle mass and function, with severe consequences on quality of life. Aged muscle contributes to a decline in metabolic, respiratory, and exercise functions. Mitochondrial function in skeletal muscles, which plays an essential role in maintaining health throughout life, declines during aging. In this study, the physiological function of acetic acid on the human skeletal muscle cells. Treatment of acetic acid stimulated the gene expression related to respirator metabolism and mitochondrial function. These results suggest that acetic acid supplementation may contribute to the improvement of skeletal muscle function.

研究分野：食品機能学

キーワード：骨格筋 呼吸代謝 ミトコンドリア 酢酸 AMPK GPR43

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高齢者の生活の質（QOL）の向上は、我が国における重要な課題となっている。加齢に伴う生活機能低下の要因の一つとして、骨格筋系の老化や肥満が挙げられ、その成因として、ミトコンドリアの機能障害が関与することが知られる。ミトコンドリアの生合成に関わる鍵因子として PGC1 α が広く知られ、PGC1 α を活性化しミトコンドリアを増幅させると、筋萎縮並びにそれに関連した代謝疾患を予防・改善できると報告されている。これまで報告者らは、PGC1 α を活性化する AMPK、さらに AMPK 活性化剤として作用する食品中の酢酸に着目して研究を行ってきた。肝臓において酢酸は代謝過程で AMP を生成し、AMP/ATP 比の増加により AMPK を活性化と安定化させ脂肪合成系遺伝子の転写因子 ChREBP をリン酸化して不活性化させる。一方、骨格筋においても酢酸は AMPK を活性化させ、AMPK の活性化により骨格筋では骨格筋分化に関わる転写因子 MEF2A や PGC1 α の活性化、さらにそれらを介して遅筋線維のミトコンドリアへの酸素運搬体として働くミオグロビンや糖輸送体 GLUT4 遺伝子およびたんぱく質の発現が増加し、糖取り込みおよび脂肪酸代謝の促進、脂肪蓄積の抑制、ならびに脂肪酸代謝が活性化されることを示した。一方報告者らは最近、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸である酢酸、酪酸、プロピオン酸をリガンドとして活性化する GPCR のうち、脂肪細胞や免疫細胞に高発現し酢酸によって活性化する GPR43 がラット骨格筋でも発現すること、また骨格筋 L6 細胞では酢酸による GPR43 の活性化により細胞内でのカルシウム放出が促進し、ミトコンドリア増幅因子 PGC1 α の活性化、さらにミトコンドリアおよび筋線維関連因子の発現を促進することを明らかにした。ヒトでの酢酸摂取による糖取り込み促進効果に関する報告から、ヒト骨格筋でも酢酸による GPR43 の活性化が生じている可能性が高い。ヒト骨格筋において酢酸によるミトコンドリアや筋線維タンパク質の増加、また骨格筋のエネルギー代謝改善において GPR43 がどのような役割を果たすのかを明らかにすることができれば、食品から酢酸を摂取することにより、ヒトの加齢による骨格筋機能の低下やエネルギー代謝異常の改善、肥満や生活習慣病抑制、また健康寿命延長に寄与することができると考えた。

2. 研究の目的

酢酸には AMPK を活性化し脂質代謝を促進する作用があることを示してきたが、最近、骨格筋において GPR43 が発現し、そのリガンドとして酢酸が活性化に関わり、ホスホリパーゼ C (PLC) 経路を介して細胞内カルシウム濃度を増加させ、カルモジュリン (CaM) の活性化、さらにカルシニューリン/NFAT シグナルを介して遅筋線維を増幅させることが明らかになった。また酢酸によるカルシウムシグナルは CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK) の活性化を通して CaMK や AMPK、さらに PGC1 α を活性化させ、ミトコンドリア増幅に作用することを示している。AMPK は骨格筋において脂肪燃焼促進に作用し、肥満や糖尿病の治療標的として注目される因子であるが、ヒト骨格筋においても、酢酸がその代謝過程においてどのような影響を示すか明らかにするために、ヒト骨格筋細胞を用いて酢酸の作用を解析した。

3. 研究の方法

GPR43 のヒト骨格筋における作用について明らかにするために、以下の項目について実験を行った。

- (1) ヒト筋芽細胞から筋管細胞への分化過程における GPR43 の発現動態の解析、ならびに

その発現における酢酸の影響について解析するために、qRT-PCR 法により分析を行った。

(2) GPR43 のアゴニストによるヒト骨格筋 GPR43 の活性化を細胞内カルシウムの動態解析を行うために、GPR43 アゴニスト ((S)-2-(4-chlorophenyl)-3,3-dimethyl-N-(5-phenylthiazol-2-yl)butanamide) をヒト筋管細胞の培養液に添加し、カルシウム測定試薬 (Fluo-4) を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。同様に酢酸の添加によるカルシウム濃度の変化を測定し解析を行った。

(3) GPR43 アゴニストならびに酢酸を用いて、AMPK のリン酸化、MEF2A、PGC1 α 遺伝子およびタンパク質の発現変化、骨格筋呼吸代謝関連因子の遺伝子発現について解析した。酢酸の作用でこれまでにラットやラット筋管細胞において観察されている細胞内分子がヒト筋管細胞でどのような影響を受けるか qRT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) GPR43 のヒト骨格筋における作用について明らかにするために、ヒト大腿筋筋芽細胞から筋管細胞への分化過程における GPR43 の発現動態の解析、ならびにその発現における酢酸の影響について検討した。ヒト大腿筋筋芽細胞を用いて筋管細胞への分化誘導を行い、分化過程における GPR43 ならびに GPR41 の発現動態の解析を qRT-PCR 法により行った。その結果、分化が進むにつれて GPR43 および GPR41 遺伝子の有意な発現増加が見られた。次に、酢酸によるその発現への影響について調べた結果、GPR43 の発現は酢酸の処理により増加傾向が見られた。ヒト骨格筋細胞においても GPR43 が発現することが示唆された。また、高齢化動物の骨格筋 (腓腹筋およびヒラメ筋) の GPR43 の発現について解析した結果、56 週齢のラットにおいてヒラメ筋の GPR43 発現は殆ど見られなかったが、酢酸の長期補給により GPR43 の発現が観察された。腓腹筋でも酢酸により発現増加傾向が見られた。

(2) ヒト大腿筋細胞における酢酸による骨格筋関連遺伝子の発現レベルの変化を解析した。分化誘導したヒト大腿筋培養細胞に酢酸または GPR43 アゴニスト処理後の骨格筋分化因子 MEF2A、ミオグロビン、PGC1 α 、SDH、およびチトクローム c 遺伝子の発現レベルを解析した。酢酸または GPR43 アゴニストを処理すると、酢酸により GPR43、MEF2A、ミオグロビン、および SDH 遺伝子が有意に増加し、GPR43 アゴニスト処理では GPR43、MEF2A、ミオグロビン、PGC1 α 、SDH 遺伝子が有意に増加していた。酢酸または GPR43 処理後の AMPK のリン酸化レベルを解析すると、酢酸処理において有意に AMPK のリン酸化が増加していた。GPR43 アゴニストでは増加傾向であった。酢酸処理において有意に増加した AMPK のリン酸化が AMPK 阻害剤で低下していた。酢酸処理後に、有意に上昇したミオグロビンおよびチトクローム c 遺伝子の発現が、AMPK 阻害剤で低下した。一方、酢酸または GPR43 アゴニスト処理により細胞内カルシウム放出が有意に増加した。

(3) 大腿筋以外のヒト骨格筋細胞として、ヒト腹直筋細胞を用いて解析を行った。腹直筋細胞に酢酸を作用させると、GPR43 遺伝子の発現は増加傾向であった。GPR43 アゴニストを作用させると GPR43 の発現は有意に増加した。酢酸の作用より、MEF2A、ミオグロビン、PGC1 α 、SDH、およびチトクローム c 遺伝子の発現が有意に増加した。GPR43 アゴニストを作用させると、MEF2A、ミオグロビン、PGC1 α の発現が有意に増加した。一方、AMPK 阻害剤の処理により、MEF2A、ミオグロビン、PGC1 α 、SDH、およびチトクローム c 遺伝子の酢酸による発現上昇が全て抑制された。AMPK のリン酸化レベルは酢酸により有意に増加し、AMPK 阻害剤によりその増加が抑制された。また MEF2A および PGC1 α タンパク質の発現レベルも酢酸により有意に増加し、AMPK 阻害剤により発現増加が抑制された。一方で、酢酸による細胞内カルシウム放出は腹直筋細胞でも見られたが、その程度はアゴニストより低い傾向が見られた。以上より、ヒト骨格筋細胞における酢酸の

作用とその機序は、骨格筋の種類により作用レベルに違いがあるが、細胞内カルシウムレベルを上昇させ、AMPK を活性化させることにより、呼吸代謝関連因子の発現を誘導し、ミトコンドリア増幅に作用すると示唆された。

<引用文献>

- ① Marzetti, E., et al., *Biofactors*, 35, 28-35 (2009).
- ② Migliavacca, E., et al., *Nat Commun.*, 10, 5808 (2019).
- ③ Sandri, M., et al., *PNAS*, 103, 16260-16265 (2006).
- ④ Cannavino, J., et al., *J. Physiol.*, 592.20, 4575-4589 (2014).
- ⑤ Kawaguchi T, et al., *J Biol Chem* **277**: 3829-35 (2002).
- ⑥ Yamashita, H., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1236-43 (2007).
- ⑦ Yamashita, H., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 570-6 (2009)
- ⑧ Maruta, H., et al., *PLOS ONE*, 11(6), 1-19 (2016).
- ⑨ Maruta, H. and Yamashita, H., *PLOS ONE*, 15(9), 1-19 (2020).
- ⑩ Mitrou, P., et al., *Eur. J. Clin. Nutr.*, 69, 734-9 (2015).
- ⑪ Kimura, I., et al., *Nat. Commun.*, 4, 1829 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸田ひとみ、山下広美
2. 発表標題 酢酸のL6筋管細胞におけるGPR43アゴニストの影響
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 丸田ひとみ、山下広美
2. 発表標題 酢酸のL6筋管細胞におけるGPR43の活性化と細胞内Ca ²⁺ 放出誘導
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
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
---------	---------