

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：33915

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700932

研究課題名(和文)運動器の血管構造 筋クロストーク異常を改善する食品成分の探索と栄養療法の開発

研究課題名(英文)Development of nutrition treatment for improving crosstalk change of blood vessel - skeletal muscle in musculoskeletal system.

研究代表者

近藤 浩代(KONDO, HIROYO)

名古屋女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50333183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：運動器において、ロコモティブシンドロームの原因となるサルコペニアや糖尿病による血管障害は、ともに寝たきりや合併症の誘因になると考えられる。両者に発生する筋肉や血管の変化を予防することを目的に、栄養成分や食品由来成分のスクリーニングを行った。様々な食品について、細胞レベルでスクリーニングを行ったところ、乳製品や抗酸化食品や高アミノ酸食品の抽出物に効果が見出された。これらをモデル動物に投与し、数種類の食品成分に筋-血管クロストークを改善する活性を見出した。3次元構造解析、生化学的解析、組織化学染色、遺伝子発現解析により、運動器の筋萎縮と血管の異常を予防改善する効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Identification of nutrients with significant cross-talk between muscle and vessel potential useful for the development of preventive therapy in sarcopenia has gained increasing importance. Therefore, the aim of this study was investigated the cross-talk between muscle fiber and capillary potential of nutrients against myoblasts and pathological animal models. Several nutrients such as plant and animal food derived extracts showed high proliferation potency in myoblasts. In addition, these nutrients were administered orally to the rats of muscle atrophy. As expected, the nutrients of dairy product extracts, antioxidants, and hyperamino acids attenuated the muscle atrophy and maintained the capillary networks, and oxidative stress levels. These results indicate that nutrients could be an effective therapy for both the muscle and capillary associated with a chronic decrease in neuromuscular activity and/or diabetes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 血管 糖尿病 栄養

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は急速に超高齢化社会を迎え、介護予防の推進などで運動器疾患対策が重要になってきた。運動器疾患は近年、運動・歩行障害を予防するために、メタボリックシンドロームに対応しロコモティブシンドローム(運動器症候群)とされた。その代表はサルコペニア(加齢性筋肉減弱症)を起因とした筋萎縮で、要介護者の大部分を占める(国民生活基礎調査)。また、メタボリックシンドロームと関連し約2210万人存在する糖尿病も、高血糖や不活動から大血管・細小血管障害を起こし、心筋梗塞や脳血管障害をはじめ腎症・網膜症・神経障害や四肢切断など、要介護の原因となる合併症を引き起こす。しかし、栄養についてこれらの検証を行った研究は少なく、エビデンスベースの改善法の開発が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

糖尿病の高血糖による大血管・細小血管障害や、ロコモティブシンドロームの原因となるサルコペニアは、要介護や寝たきりの誘因となる。どちらも特に微小血管構造病変と筋萎縮が起こるために予防をすることが重要であると考えた。そこで栄養サポート療法による筋萎縮と血管構造病変に対する予防効果の検証と作用機序を解明することを目的とした。

代表者は、毎日摂取する食品成分から成る食事や栄養によって、運動器疾患の発症・重症化の予防することができれば、運動療法の効果増強や、運動ができない高齢者や重症患者にも適応できることを着想した。代表者は、これまで運動が担ってきた筋-血管系正常化に着目し、運動と同様に、筋細胞増殖や血管構築に対して分子レベルで作用をする成分を食品から探索し、運動器の筋-血管系異常を正常化するかどうか検証することで、運動器疾患対策の食品・栄養療法を開発することを目的とした。

したがって本研究では、骨格筋細胞の病変の予防作用をもつ食品成分を分子レベルでスクリーニングし、データベース化した。生体内における骨格筋細胞の増殖因子、プロテアソーム、活性酸素種等レギュレータ、血管増殖・抑制因子の調節系を解析し、単独・複合作用を検証し、高齢化社会に必要なとされるエビデンスに基づく運動器の栄養サポート療法の検証・開発を行う事を目的とした。

### 3. 研究の方法

栄養サポートによる筋萎縮と血管構造病変の予防改善効果とメカニズムを解明するために、疫学調査や細胞レベル(培養細胞)などで血管構築に有効な成分、抗酸化成分、ユビキチン化の抑制作用を示す食品由来成分を探索し、データベースを構築した。これら候補から成分を絞り込み、さらにモデル動物に投与し、生体レベルで骨格筋の毛細血管ネ

ットワークの三次元構造、筋原線維蛋白質量、タンパク質分解プロテアソーム系、抗酸化分子SOD活性、血管新生抑制因子等を解析した。

(1) 培養細胞を用いて食品成分の筋肉代謝活性などの影響を検討した。

(2) 作用機能ごとに分類し筋萎縮・血管異常改善のデータベースを作成し、成分の絞り込みを行った。

(3) モデル動物に栄養サポート食品由来成分を投与し、in vivoで生体の筋萎縮・血管異常制御効果を検証した。

(4) 関連のパラメータの分析について、コンフォーカルレーザー顕微鏡による血管構築解析や、組織染色法による免疫組織化学的検査などを利用し、筋肉組織の変性や血管構造異常におけるアポトーシス減少や遺伝子発現、組織の三次元画像解析にて改善効果を分析した。

(5) 食品由来成分による筋肉-血管微小循環への影響とその作用メカニズムを解析した。

以上によって、毛細血管と骨格筋細胞のクロストークによる改善効果から、細胞と生体において分子レベルで解明することにより筋萎縮と血管構造異常のためのエビデンスに基づく栄養サポート療法を開発した。

### 4. 研究成果

約100種類の栄養素や食品由来成分について、水溶性成分と油溶性成分の抽出と検体溶液の精製を行った。骨格筋L6細胞およびC2C12細胞を用いて増殖レベル、遺伝子発現レベルでスクリーニングを行った。その結果、ホエイタンパク質、乳製品抽出物、大豆抽出物、魚肉タンパク質、その他アミノ酸高含有食品など、いくつかの食品成分に有意に筋萎縮を改善する活性が見出された。特に、動物性の乳、魚肉由来の抽出物において骨格筋培養細胞に高い活性が認められた。また、ロイシンや必須アミノ酸などを含むアミノ酸高含有食品群において骨格筋細胞の活性化が共通していた。そこで活性種類別に候補物質の絞り込みを行った。高アミノ酸抽出物や抗酸化物質のアスタキサンチンなどの食品成分について、さらに培養細胞に対する細胞代謝活性や調節因子の影響について測定を行った。その結果、アスタキサンチンはmRNAレベルでユビキチン-プロテアソーム系の活性の上昇を有意に抑制した。また、骨格筋細胞の直径の減少を有意に抑制し、コントロールレベルに改善した。以上から、アスタキサンチンは活性酸素種が増悪しているような筋萎縮において、萎縮の予防につながることで見出された。また、これらの食品成分を筋

萎縮モデル動物に投与し、サルコペニアや糖尿病などにおこる筋血管系の異常に対して、その改善効果を組織レベル、遺伝子レベルにおいて測定した。経時的に血液の生化学検査を行い、下肢の骨格筋など各組織を摘出し、組織切片を作成して組織化学染色、蛍光免疫組織化学染色、筋原線維たんぱく質解析、血管構造解析を行った。その結果、酸化リン酸化系のコハク酸脱水素酵素活性は、萎縮筋で有意に低下したが、高アミノ酸抽出物群において、コントロール群と有意差がないレベルに回復していた。また、筋萎縮群で有意に低下していた毛細血管-筋線維比においても、高アミノ酸抽出物群においてコントロール群と有意差のないレベルに回復していた。さらに、ミトコンドリア新生に関わる mRNA の発現を検討したところ、投与群において、萎縮群よりも有意に高値を示した。また、アスタキサンチンは筋萎縮に伴う毛細血管退行を改善した。これらの結果から、高アミノ酸成分などの投与によって、筋萎縮による骨格筋代謝活性の低下を減衰し、毛細血管退行を予防したものと考えられた。以上の結果より、ホエイタンパク質や魚肉タンパク質を含む高アミノ酸食品群やアスタキサンチンなど抗酸化食品において、骨格筋細胞の代謝活性の低下を減衰し、骨格筋のクロストーク構造に対する予防改善効果や、運動器の組織障害に対して保護作用を示す効果が認められた。さらに筋血管系の異常に対する改善効果について組織レベル、分子レベルの解析をすすめて、効果の作用範囲やそのメカニズムに関する検証を行っている。

本研究結果から、ロイシンや必須アミノ酸を多く含む高タンパク食・高アミノ酸食には、筋萎縮を予防改善する作用があり、また、アスタキサンチンをはじめとする抗酸化物質を含む食品には筋-血管クロストークを改善する効果が認められた。以上の成果より、今後は骨格筋の健全性を保つために、運動の重要性とともに食事や栄養の重要性に焦点をあて、ロコモティブシンドロームや糖尿病の予防改善や、様々な運動器疾患予防の効果的な栄養療法として役立てていくことが期待される。

#### 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 6 件)

Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Roy RR, Ishihara A, Regressed three-dimensional capillary network and inhibited angiogenic factors in the soleus muscle of non-obese rats with type 2 diabetes., *Nutr Metab*, 8, 2011, 6pages

Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Takeda I, Tsuda K, Ishihara A. High-fat diet-induced reduction of peroxisome

proliferator - activated receptor - coactivator - 1 messenger RNA levels and oxidative capacity in the soleus muscle of rats with metabolic syndrome., *Nutr Res*, 32, 2012, 144-151

Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Tsuda K. Lifestyle-related disease and skeletal muscle: A review., *J Phys Fitness Sports Med*, 1, 2011, 1-11

Kanazashi M, Okumura Y, Al-Nassan S, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Protective Effects of Astaxanthin on Capillary Regression in Atrophied Soleus Muscle of Rats., *Acta Physiol*, 207, 2013, 405-415

Okumura Y, Kanazashi M, Kanazawa Y, Fujita N, Kondo H, Fujino H. Differential Effects of Astaxanthin on Oxidative Key Enzyme and Capillarization in the Deep and Superficial Layers of Unloading-induced Atrophied Muscle., *J Phys Ther Sci*, 25, 2013, 349-353

Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ohira Y. Decreased Succinate Dehydrogenase Activity of Gamma and Alpha Motoneurons in Mouse Spinal Cords Following 13 Weeks of Exposure to Microgravity., *Neurochemical Research*, 38, 2013, 2160-2167

[学会発表](計 14 件)

Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A., Three-dimensional microcirculatory measurements and the protective effects of endurance exercise on its complications in non-obese type 2 diabetic muscle., *American society for cell biology*, 2011.12, Denver, USA

Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A., Three-dimensional visualization of capillary and prevention of capillary regression by antioxidant supplementation in disused skeletal muscle., *American society for cell biology*, 2011.12, Denver, USA

Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Morifuji T, Fujita N, Tanaka M, Ishihara A., Effects of exercise training on adipokines and glucose tolerance in non-obese spontaneously type 2 diabetic torii rats., *Experimental Biology* 2012, 2012.4, San Diego, USA

Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Reduction In Muscle Capillary Is Inversely Associated With Vegf Expression In Non-obese Type 2 Diabetic Rats. 59th American College of Sports Medicine. 2012, 5, San Fransisco,

USA

Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Ameliorative effects of antioxidant astaxanthin on capillary regression in hindlimb unloading-induced atrophied muscle. Integrative Biology of Exercise VI, 2012.10, Colorado, USA

Fujino H, Kondo H, Murakami S, Tanaka M, Nagatomo F, Ishihara A. Effects of exercise training of different intensities on capillary network in skeletal muscle with nonobese type 2 diabetes. American College of Sports Medicine, 2013. 05, Indianapolis, USA

Fujino H, Kondo H, Murakami S, Tanaka M, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Treadmill running improves diabetes-induced capillary regression in skeletal muscle through activation of VEGF and angiopoietin pathways without inhibition of thrombospondin-1. Experimental Biology, 2013. 04, Boston, USA

Tanaka M, Kanazashi M, Tanaka M, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Fujino H. Beneficial effect of exercise combined with licorice flavonoid oil supplementation on visceral adipose tissue. Experimental Biology, 2013. 04, Boston, USA

Kanazashi M, Tanaka M, Tanaka M, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Fujino H. Protective effects of loading combined with astaxanthin on capillary regression of disused muscle. Experimental Biology, 2013. 04, Boston, USA

Tanaka M, Tanaka M, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Fujino H. Comparison of rectangular and sine waveforms on electrical stimulation to atrophy of rat soleus muscle. Experimental Biology, 2013. 04, Boston, USA

Kondo H, Fujino H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Vitamin D receptor and Estrogen receptor alpha Genotype affects Exercise related Bone mass in Japanese healthy women. Experimental Biology, 2013. 04, Boston, USA

Kanazashi M, Tanaka M, Tanaka M, Hirayama Y, Nagatomo F, Fujita N, Kondo H, Murakami S, Ishihara A, Fujino H. Astaxanthin Protects Oxidative Stress and Metabolic Disorders of Atrophied Soleus Muscle in Rats. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, 2013. 06, Toyohashi, JAPAN

Takegaki J, Kondo H, Fujino H. Astaxanthin attenuates

lipopolysaccharide - induced atrogen-1 expression in C2C12 myotubes Experimental Biology 2014. 04, San Diego, USA

Kondo H, Fujino, Nagatomo F, Ishihara A. Relation of genetic polymorphisms and nutrient with bone density and skeletal muscle mass in Japanese young women, Experimental Biology 2014. 04, San Diego, USA

〔図書〕(計 2 件)

近藤浩代他, 公衆衛生学実験・実習 建帛者, 2011, 152 pages

近藤浩代他, カレント 社会・環境と健康 公衆衛生学, 建帛者, 2014, 194 pages

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 浩代 (KONDO Hiroyo)

名古屋女子大学・家政学部・准教授

研究者番号: 5 0 3 3 3 1 8 3

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

