

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300254

研究課題名(和文) 骨格筋の脂質利用亢進作用を有する食品因子の探索と生活習慣病予防への応用

研究課題名(英文) Exploring food-derived factors that affect skeletal muscle metabolism for prevention of chronic diseases

研究代表者

飯田 薫子 (Iida, Kaoruko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：50375458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肥満における骨格筋の代謝改善に働きかけるような食品・栄養因子について検討を行い、以下を明らかとした。まず筋ミトコンドリア増生を促す食品因子の探索を行った。その結果、大豆ソフラボン的一种Daidzeinが筋細胞のミトコンドリア量を増加させ電子伝達系に関わる遺伝子の発現を増強させること、その制御メカニズムにNRFなどの転写因子が関わることを明らかとした。またDaidzeinは、転写因子PPAR α や γ の活性化を通じて肥満における慢性炎症を改善する可能性を見いだした。さらに低糖高脂肪食摂取における筋の代謝変化について検討し、筋組織において様々な代謝関連遺伝子の発現が変動することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify food-derived factors that affect muscle metabolism in obesity. For this purpose, we used the C2C12 murine muscle cell line. Screening based on the promoter assay suggested that soy isoflavone daidzein was a potent candidate that regulated mitochondrial biogenesis. Treatment of C2C12 myotubes with daidzein resulted in significant increases in the expression of mitochondrial transcription factor A (Tfam) as well as cytochrome b and COX1 as its targets. We found that the nuclear respiratory factor (NRF) were necessary for the effect of daidzein on Tfam expression. In addition, daidzein regulated cytokine expression through the PPAR α and γ in animal adipose tissue and cultured adipocytes, thereby improving the adverse effects of adipose inflammation in obesity. We also examined the effect of ketogenic nutrient environment on muscle metabolism in mice and found that ketotic states promote transcriptional regulation of various metabolic genes in muscles.

研究分野：応用栄養学

キーワード：骨格筋 食品因子 肥満 ミトコンドリア エネルギー代謝 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進各国では、近年、脂肪摂取増大による摂取カロリー過剰や運動不足による消費カロリーの低下から、脂質の蓄積過剰状態である肥満と、それに基づく糖尿病、脂質異常症、脂肪肝などの生活習慣病が激増しており、その管理予防は現代社会における危急の課題である。これら疾患の病態は、脂肪毒性とよばれる「組織の脂質の蓄積過剰」から生じる生体の機能不全に起因する。このためその病態の改善には、脂質の蓄積、すなわち肥満を解消することが好ましいことがコンセンサスとなっているが、食事制限などによる体脂肪の減少が困難であることもまた周知の通りである。

このような背景を受け、これまでも脂肪の減少を目的とした食品や食品因子の研究が国内外でなされてきた。しかしながらその多くは、脂質そのものを蓄積する臓器である「肝臓」や「脂肪組織」をターゲットとした研究が占めている。しかし脂質の蓄積を解消するためには、蓄積そのものを制御するだけでなく、脂質をエネルギー源として積極的に利用することが重要であり、脂質をエネルギー源とする体内最大の臓器「骨格筋」の肥満制御に果たす役割は極めて大きいと考える。

近年、食品に含まれるポリフェノールの1種 Resveratrol が筋の脂質利用に関連する複数の遺伝子発現を増強し、肥満を改善することが報告され注目を浴びた (Lagouge M et al. Cell 2006)。これらの背景から、肥満の根底には分子レベルでの何らかの骨格筋のエネルギー代謝障害や脂質利用障害が存在し、それを改善することにより肥満を制御し得る可能性が示唆される。また元来骨格筋は、様々な外的因子に依ってエネルギー代謝に関与する遺伝子や蛋白質の発現をダイナミックに変化させることが知られている。食品や栄養因子が骨格筋の分子レベルで脂質やエネルギー代謝促進に働きかけ、肥満を改善しようとしても不思議はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、肥満を中心とした生活習慣病の病態形成に関わる骨格筋の代謝異常の実態を明らかにすること、またその病態の改善に働きかけるような食品・栄養因子を見出すことにより、これら因子を介した、新しい生活習慣病予防のための食生活の提案を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋ミトコンドリア制御効果を有する食品・栄養因子の探索

本研究ではまず骨格筋における脂質代謝の中心的役割を果たすミトコンドリアに着

目し、ミトコンドリア増生を促す食品因子を探索することを試みた。実験には培養系筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。ミトコンドリア関連遺伝子の発現制御やミトコンドリア量の制御に中心的な役割を果たす転写因子である Tfam のプロモーター配列にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを作成し、C2C12 細胞に導入したのち、食品因子を負荷して Tfam のプロモーター活性を測定した。候補食品因子としては、ポリフェノール類を中心とした食品因子、および栄養代謝関連因子を中心に、幅広く検討を行った。プロモーター活性の上昇が認められた因子については、実際に Tfam およびその標的遺伝子の発現が上昇するかについて Real-time PCR を用いた検討を行うとともに、実際の細胞内ミトコンドリア量についても定量を行った。さらに動物に、これらの候補因子を投与することにより *in vivo* での効果についても検討を行った。

(2) エネルギー欠乏に対する骨格筋の適応変化についての検討

肥満を基礎としてインスリン抵抗性が生じると、エネルギー源となる糖の正常な代謝が障害され、多量のエネルギー消費を必要とする臓器での絶対的なエネルギー供給の不足を招く。これまでに、高脂肪食投与や肥満モデルマウスなどを用いた「エネルギー過剰状態」での筋の代謝変化についてはいくつかの研究が散見されるが「エネルギー過剰」と表裏をなす「エネルギー欠乏」状態での筋のエネルギー代謝変化についての包括的な研究はなかった。

そこで本研究ではエネルギー欠乏下での筋のエネルギー代謝変化について検討を行うこととした。C57BL/6J マウスを、普通食群 (Con; タンパク質 26%、脂質 13%、炭水化物 61%)、低糖質食群 (Ketogenic Diet, KD; タンパク質 11%、脂質 88%、炭水化物 1%)、タンパク質を普通食と同程度まで増やした低糖質食群 (Ketogenic Diet with Protein, KD-P; タンパク質 26%、脂質 73%、炭水化物 1%) に分け、それぞれの飼料下で長期飼育した。これらのマウスを用い、全身の代謝状態、および生体内の主要なエネルギー消費臓器である心臓・骨格筋の遺伝子発現変化について検討を行った。

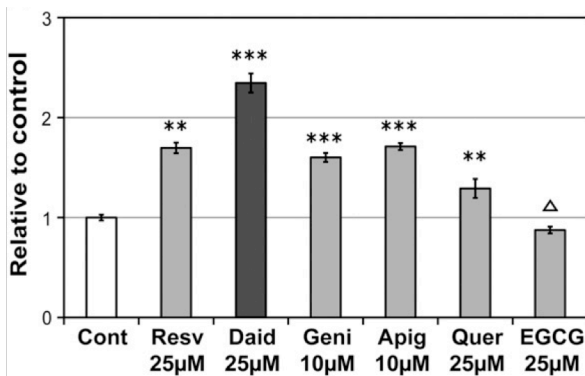
4. 研究成果

(1) 筋ミトコンドリア制御効果を有する食品・栄養因子の探索

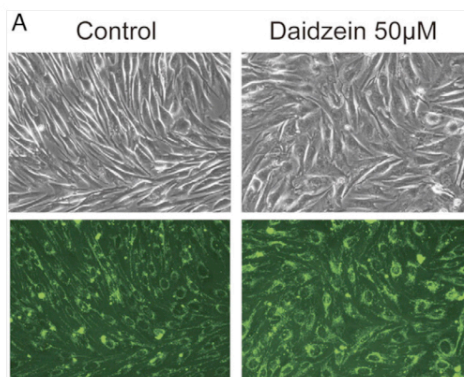
Tfam のプロモーター配列を用いたスクリーニングの結果、複数の食品由来ポリフェノールが、その活性を上昇させることを見出した (図1)。

そこで、このうち最も活性を上昇させた因

子の1つである大豆イソフラボン Daidzein を用いてさらに検討を進めた。その結果、Daidzein は C2C12 細胞において Cytochrome b や ATPsynthase などのミトコンドリア伝達系に関わる遺伝子の発現を増強させること、さらにその制御メカニズムには NRF-1, NRF-2, PGC-1 α などの転写因子に関わる可能性を見いだした。さらにミトコンドリアの定量解析において、Daidzein が筋細胞のミトコンドリア量を増加させること (図2)、RNAi を用いた発現抑制実験により、これら Daidzein の効果はヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 を一部介していること、などを明らかとした (J Nutr Biochem. 26(11):1193-99, 2015)。



【図1】C2C12 細胞での Tfam プロモーター活性 (発表論文3より)

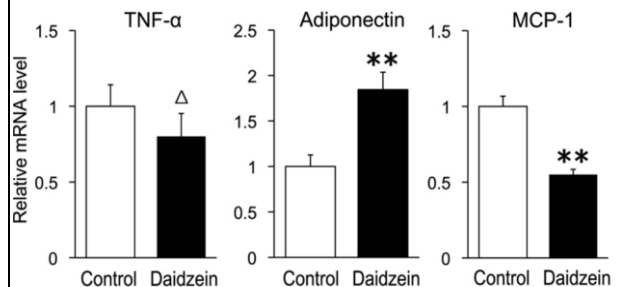


【図2】C2C12 細胞でのミトコンドリア定量 (蛍光はミトコンドリアを示す) (発表論文3より)

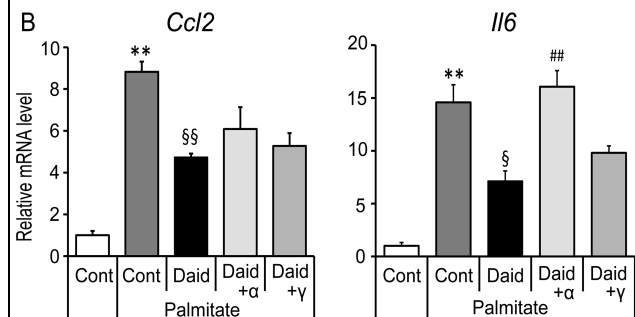
一方、生体内での Daidzein の効果を検討するために C57BL6 マウスに高脂肪高ショ糖食とともに Daidzein を投与したところ、Daidzein 負荷群では体重増加が有意に抑制され、インスリン抵抗性が改善することを明らかとした。この Daidzein 負荷群においては、骨格筋でのミトコンドリア関連遺伝子の発現量に増加傾向が認められることから、Daidzein が骨格筋におけるこれらの遺伝子の発現を促進することで、肥満制御の一助となる可能性を示した (未発表データ)。また Daidzein 負荷を行ったマウスにおいては脂肪組織における PPAR γ の発現が誘導され、脂

肪細胞が有意に小型化し、脂肪組織における炎症性サイトカイン(MCP-1, TNF α) の発現が軽減すること (図3)、また脂肪細胞への炎症細胞の浸潤が抑制されることなどを明らかとした (Mol Nutr Food Res 58:718-26, 2014)。

このように Daidzein が脂肪細胞における炎症反応を抑制する分子メカニズムを明らかとするために、3T3-L1 脂肪細胞および Raw264 マクロファージ細胞を用いて、さらに検討を行った。その結果、Daidzein の抗炎症メカニズムとして、PPAR γ だけでなく PPAR α に対する活性化作用も一部関与する可能性を示した (図4) (PLoS One 11(2) :e0149676, 2016)。



【図3】脂肪組織における遺伝子発現 (発表論文4より)



【図4】PPAR α および PPAR γ の阻害剤を用いた検討 (発表論文1より)

本研究においては主に、大豆イソフラボンである Daidzein の効果を中心に検討を行ったが、図1で示されたミトコンドリア増生効果の期待できるその他の食品因子についても、今後引き続き検討を行って行く予定である。

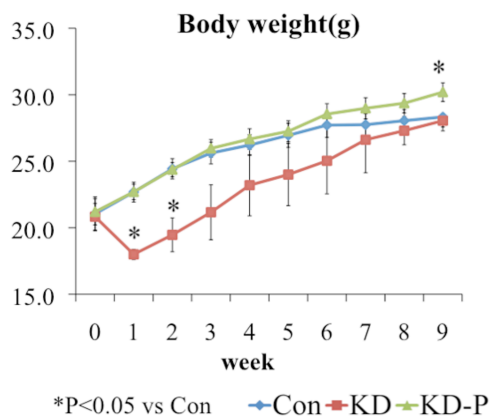
(2) エネルギー欠乏に対する骨格筋の適応変化についての検討

KD 群では投与開始後数週間は体重減少が認められたが、その後コントロールとの体重差は消失した。一方 KD-P 群では、投与開始後数週間はコントロールとの間に差は認められなかったが、長期投与によりむしろ体重は増加し (図5)、この結果、インスリン抵抗性の惹起を認めた。

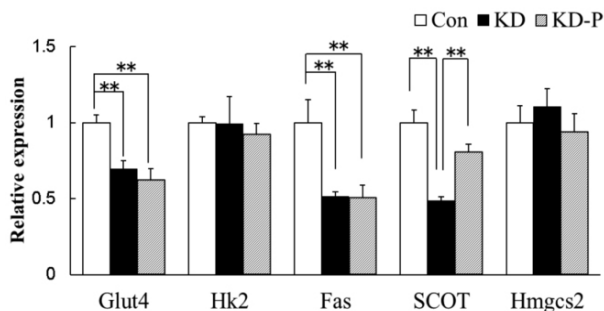
各代謝臓器の遺伝子発現について検討したところ、心臓では、KD・KD-P 群の両群でケトン体利用の主要酵素である SCOT

(Succinyl-CoA transferase) 遺伝子の有意な発現低下が確認され、ケトン体利用が抑制されていることが示された。また心臓では、ケトン体合成に関連する *Hmgcs2* (Hydroxymethylglutaryl - CoA synthase 2) の発現が KD・KD-P 群で有意に上昇すること、一方骨格筋では、KD・KD-P 群において糖取り込みに関連する *Glut4* (Glucose transporter type 4) や脂肪酸合成に関連する *Fas* (Fatty acid synthase) の発現が低下することなどを明らかとした (図6) (学会発表 3, 6, 7)。

今後は、エネルギー源欠乏状態で認められた骨格筋および心筋でのエネルギー代謝関連遺伝子の発現変化について、どのような体内シグナルを介してこれらの変化が引き起こされるのかを明らかとしていく予定である。



【図5】ケトン食投与による体重の推移



【図6】骨格筋組織におけるエネルギー代謝関連遺伝子の変化

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 4 件)

1. Sakamoto Y, Kanatsu J, Toh M, Naka A, Kondo K, Iida K. The Dietary Isoflavone Daidzein Reduces Expression of Pro-Inflammatory Genes through PPAR α / γ and JNK Pathways in Adipocyte and Macrophage Co-Cultures. PLoS One. 11(2):e0149676, 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0149676. 査読有
2. Sawada Y, Sakamoto Y, Toh M, Ohara N,

- Hatanaka Y, Naka A, Kishimoto Y, Kondo K, Iida K. Milk-derived peptide Val-Pro-Pro (VPP) inhibits obesity-induced adipose inflammation via an angiotensin-converting enzyme (ACE) dependent cascade. Molecular Nutrition and Food Research. 59(12):2502-10, 2015. 査読有
3. Yoshino M, Naka A, Sakamoto Y, Shibasaki A, Toh M, Tsukamoto S, Kondo K, Iida K. Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. Journal of Nutritional Biochemistry. 26(11):1193-99, 2015. 査読有
4. Sakamoto Y, Naka A, Ohara N, Kondo K, Iida K. Daidzein regulates pro-inflammatory adipokines thereby improving obesity-related inflammation through PPAR γ . Molecular Nutrition and Food Research 58:718-26, 2014. 査読有

〔学会発表〕 (計 14 件)

1. 坂本友里、柴崎絢子、吉野真希子、藤万里子、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 食物イソフラボンであるダイゼインは TFAM およびミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御する 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.2
2. 柴崎絢子、吉野真希子、藤万里子、坂本友里、中彩乃、飯田薫子 筋芽細胞 C2C12 における Daidzein のミトコンドリア活性化作用の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.2
3. 清水梢、畑中由衣子、十文字沙樹、中彩乃、飯田薫子 ケトン食がマウスのエネルギー代謝に与える影響の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.1
4. 金津純子、藤万里子、坂本友里、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 脂肪酸誘導性の炎症反応に対するイソフラボン daidzein の効果の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.1
5. Yuri Sakamoto, Makiko Yoshino, Ayano Naka, Ayako Shibasaki, Mariko Toh, Kazu Kondo, Kaoruko Iida Dietary isoflavone daidzein regulates mitochondrial biogenesis in muscle cells by regulating transcriptional networks. 第 12 回アジア栄養学会議 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2015.5.16
6. Yuiko Hatanaka, Ayano Naka, Kozue Shimizu, Kaoruko Iida Ketogenic diet induces a unique metabolic state in heart and skeletal

muscles 第 12 回アジア栄養学会議 パシフィ
コ横浜（神奈川県横浜市）2015.5.15

7. 畑中由衣子, 清水梢, 中彩乃, 飯田薫子
ケトン食が生体のエネルギー代謝に及ぼす
影響の検討 第 5 回機能油脂懇話会 明治大
学リバティータワー（東京都千代田区）
2014.11.8

8. 坂本友里, 澤田容子, 藤万里子, 飯田
薫子 酸乳由来トリペプチド VPP が脂肪組
織の炎症反応に及ぼす影響の検討 第 36 回
日本臨床栄養学会総会/第 35 回日本臨床栄養
協会総会 第 12 回大連合大会 JP タワーホー
ル&カンファレンス（東京都千代田区）
2014.10.5

9. 坂本友里, 内堀寛容子, 藤万里子, 中彩乃,
近藤和雄, 飯田薫子 転写因子 PPAR を介し
た Daidzein の炎症抑制作用の検討 第 68 回
日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学（北
海道江別市）2014.6.1

10. 畑中由衣子, 吉野真希子, 塚本咲翔, 坂
本友里, 中彩乃, 近藤和雄, 飯田薫子
Daidzein の筋ミトコンドリア活性化作用の
検討 第 68 回 日本栄養・食糧学会大会 酪
農学園大学（北海道江別市）2014.6.1

11. 塚本咲翔, 中彩乃, 劉子寧, 畑中由衣子,
坂本友里, 飯田薫子 Lactate が筋分化に及ぼ
す作用の検討 第 68 回 日本栄養・食糧学会
大会 酪農学園大学（北海道江別市）2014.6.1

12. 澤田容子, 前岡舞, 吉野真希子, 藤万里
子, 畑中由衣子, 坂本友里, 中彩乃, 飯田薫
子 酸乳由来トリペプチド VPP が脂肪組織
の炎症反応に及ぼす影響の検討 第 68 回 日
本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学（北海
道江別市）2014.5.31

13. 飯田薫子, 坂本友里, 中彩乃, 近藤和雄
大豆イソフラボン Daidzein は PPAR γ を介し
て肥満誘導性炎症を改善する 第 34 回日本
肥満学会 東京国際フォーラム（東京都千代
田区）2013.10.11

14. 坂本友里, 吉野真希子, 菊地美里, 小原
希実, 中彩乃, 飯田薫子 Daidzein 摂取が食
餌誘導性肥満モデルマウスに及ぼす影響
第 67 回 日本栄養・食糧学会大会 名古屋大
学（愛知県名古屋市）2013.5.25

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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 0 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

飯田 薫子 (IIDA, Kaoruko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：50375458

(2) 研究分担者

近藤 和雄 (KONDO, Kazuo)

東洋大学・食環境学部・教授

研究者番号：30153711

鈴木 恵美子 (SUZUKI, Emiko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：80154524

(3) 連携研究者

()

研究者番号：