

令和元年6月12日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26350109

研究課題名(和文) 運動類似効果をもたらす新規機能成分の解析と食品への利用に向けての基礎研究

研究課題名(英文) Analysis of the new functional ingredient with effects comparable to exercise with the aim of utilization as foods

研究代表者

草野 由理 (KUSANO, Yuri)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90432252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ステロイドサポゲニンであるジオスゲニンが脂質代謝及び骨格筋に与える影響を検討した。ジオスゲニン摂取ラットにおいて骨格筋における筋線維が増大・増加することを見出し、さらに肝臓及び内臓脂肪の蓄積が抑制されること、血中HDLコレステロール濃度が有意に上昇することを見出した。またマウス筋芽細胞由来C2C12細胞を用いて、ジオスゲニンが骨格筋細胞の細胞融合を促し、多核の骨格筋細胞への細胞分化を誘導すること、さらに骨格筋細胞のAMPキナーゼのリン酸化レベルを亢進す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

本研究によりジオスゲニンが骨格筋に与える生理作用を、細胞レベルでの解析結果を伴って、提示することができた。運動不足が「死亡に対する危険因子」に挙げられているが、得られたこれらの成果は、運動時に骨格筋において得られるエネルギー消費の亢進作用及び筋線維の増大・増加作用を示すものと考えている。ジオスゲニンは一部のヤマノイモ属等に多く含まれることから、食品中の機能性成分として期待できる成果が得られたのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the effects of dietary diosgenin, which is a steroid sapogenin, on lipid metabolism and skeletal muscle. As a result, we found that supplementation with diosgenin led not only to both a significant elevation of HDL-cholesterol concentration and inhibition of visceral fat accumulation, but also to expansion of skeletal muscle fibers in the rats. Furthermore, using mouse myoblast-derived C2C12 cells, it was demonstrated that diosgenin induced skeletal muscle cell differentiation by promoting fusion of myoblasts and promoted phosphorylation of AMP kinase in myotubes.

研究分野：食生活学

キーワード：ジオスゲニン 骨格筋 AMPK 細胞融合 筋線維

1. 研究開始当初の背景

私達の身体が「運動」から得る作用は、摂取エネルギーの消費と体内環境の改善作用といえる。これら2つの作用には、運動時に使用する骨格筋における筋線維の筋収縮が大きく関与する。筋収縮にはエネルギー消費を伴うが、骨格筋は、体重の約40%を占める大きな組織であることから、運動に伴う骨格筋の筋収縮により、効率よくエネルギー消費することが期待できる。また運動時の骨格筋における筋収縮に伴い、骨格筋からは運動性サイトカインが分泌されることが知られ、内分泌器官としての骨格筋の役割が報告されている。筋収縮に伴い分泌される運動性サイトカインは体内の各器官を刺激し、インスリン非依存的な血糖値の改善作用などの体内改善効果をもたらされる¹⁾。

「運動不足」は、WHOの「死亡に対する危険因子」に挙げられているが、現代のライフスタイルは身体を動かすことすら少なくなっている。また超高齢化社会を迎え、運動をしたくても実際に運動ができない人が、今後も多くなることが予想される。以上のことから、「運動不足」の解消は、現代の重大な解決事項といえる。

2. 研究の目的

本研究は、運動を実際にしなくてもそれと同等の効果が得られたり、また限られた運動でもその作用をより有効にできる手段を、「食」から安全に構築できないかという立場から研究を行うものである。この運動代替手段の構築は、運動が必要であるが、習慣化が難しい現代の多くの人において有効なものである。それだけでなく、高齢者等、運動を実際にできないが、運動効果が必要な人にとっても、運動の代替手段の開発は望まれるものと考えている。

ジオスゲニン是一部のヤマノイモなどに多く含まれているステロイドサポゲニンである(図1)。これまでに本研究室では、予備実験として、ジオスゲニンを摂取したラットにおいて、内臓脂肪の蓄積抑制作用があることを見出し、骨格筋の関与を示唆する結果を得てきている。本研究においては、実験動物を用いた個体レベルでのジオスゲニンが示すこれらの作用を明らかにするとともに、骨格筋への作用を明らかにすることを目的とした。またさらにジオスゲニンを食品あるいはメニューとして応用した場合、これらの効果を有効にする調理・加工法を検証することを目的として研究に着手した。

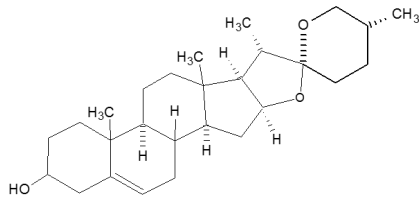


図1、ジオスゲニンの構造

研究を進める中で、ジオスゲニン摂取ラットにおける動物実験において、想定していなかったが、重要な興味深い結果が得られた。そのため、当初の研究の目的を一部変更し、その点を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) ジオスゲニン摂取ラットの骨格筋及び脂質代謝に与える影響

ジオスゲニンが示す個体レベルでの影響を明らかにするために、6週齢のWistar系雄ラットを用いて、次の2つの実験を行った。

<実験1> 継続的なジオスゲニン摂取の影響を明らかにするために、0.5%コレステロール(Chol)を含む高Chol食に0.5%ジオスゲニンをしたジオスゲニン添加食を、6週間摂取させた(D6群)。

<実験2> 継続的な高Chol食を摂取している場合のジオスゲニンの作用を明らかにするために、予め、高Chol食を6週間摂取させた後、ジオスゲニン添加食を4週間摂取させた(C6-D4群)。

いずれの実験においても、飼育終了後の血清および肝臓、大腿筋、糞、腹腔内脂肪(腎臓、睪丸周囲及び腹後壁脂肪)を摘出した。そこに含まれる総Chol及び高密度リポタンパク質-Chol(HDL-Chol)、トリグリセリド(TG)、胆汁酸を測定した。また肝臓及び大腿筋は、4%-パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定後、薄切した切片をヘマトキシリン-エオシン(HE)染色あるいはOil Red O染色し、組織観察を行った。骨格筋への影響は、筋線維のFeret径最少キャリパー長及び断面積を、画像解析ソフトImageJを用いて計測して評価した。また筋線維数は単位面積当たりの線維数を計測して評価した。

(2) ジオスゲニンの骨格筋細胞に与える作用機序の解析

培養細胞として、マウス筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いた。C2C12細胞を多核の筋管細胞に細胞分化する場合は、低血清培地を用いた。骨格筋細胞のエネルギー代謝経路に与える影響は、細胞内の低ATPレベルに反応するエネルギーセンサーであるAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)のリン酸化レベルの変化から評価した²⁾。細胞分化したC2C12細胞を、ジオスゲニン存在下で適当な時間培養し、その細胞溶解液を抽出した。そこに含まれるAMPK

及びリン酸化された AMPK をそれぞれのタンパク質を認識する抗体を用いた Western-blotting 法により検出した。その結果から、AMPK のリン酸化レベルを、リン酸化 AMPK/AMPK により評価した。

骨格筋は筋芽細胞が細胞融合して多核の骨格筋細胞から構成されるが、ジオスゲニンにその細胞融合活性があるかどうかを検証した。細胞増殖期にある C2C12 細胞をジオスゲニン存在下で培養し、Hoechst 33342 を用いて核染色後、1 つの細胞内に核を 2 個以上含む細胞の数を計測することにより評価した。

実験結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の検定は「エクセル統計 2012」Turkey-Kramer の多重比較を使用し、群間の有意差 ($p < 0.05$) を判定した。

4. 研究成果

(1) ジオスゲニン摂取ラットにおける骨格筋の変化と脂質代謝に与える影響

骨格筋の組織構造について、ジオスゲニンを摂取した D6 群では、筋線維間及び筋線維を束ねる筋束間の結合組織が、他の C6 群、コントロール群より低下しており、筋線維の増大を示す結果が得られた。この点を確認するため、筋線維径、その断面積、筋線維数を測定したところ、これらのいずれの結果においても D6 群が有意に増加していた(表 1)。以上の結果から、ジオスゲニンの継続的な摂取は、骨格筋線維の増大を誘導することが示された。

表 1、ジオスゲニン摂取ラットにおける骨格筋の変化*

	D6群	C6群	コントロール群
Feret径最少 キヤリパー長	174 ± 35.4 ^a	139 ± 28.7 ^b	164 ± 23.3 ^c
断面積 (× 10 ³)	34.1 ± 10.8 ^a	20.7 ± 7.11 ^b	29.5 ± 5.75 ^c
単位面積当 りの筋線維数	251 ± 52.3 ^a	233 ± 48.6 ^b	170 ± 24.4 ^b

*異なる文字は有意差があることを示す

一方、脂質代謝においては、肝臓組織における脂質の蓄積が抑制されており、Chol 含量は有意に低下し、糞中胆汁酸含量及び Chol 含量の増加、血中 HDL-Chol 濃度の増加がみられた。また肝 TG 含量は普通食を摂取したコントロール群と有意差が認められず ($p = 0.609$)、

内臓脂肪については、有意差はなかったものの、コントロール群及び C6 群に比べ低下していた。血中 TG 濃度はコントロール群に比べ有意に低下していた(表 2)。以上の結果は、ジオスゲニンの継続的な摂取は、骨格筋の増大・増加の誘導を伴って、Chol 及び TG ともにその体内での蓄積が抑制されることを示しており、運動に伴って示される筋力の増大、脂質代謝の改善作用が認められることが明らかになった。

表 2、ジオスゲニン摂取ラットにおける肝臓及び内臓脂肪含量*

	D6群	C6群	コントロール群
肝脂肪含量 (mg/肝重量)	211 ± 38.1 ^{ab}	267 ± 51.3 ^a	182 ± 60.4 ^b
内臓脂肪 (体重比、%)	3.60 ± 0.410 ^a	4.05 ± 0.650 ^a	4.57 ± 0.876 ^a

*異なる文字は有意差があることを示す

このようなジオスゲニンが示す生理作用は、継続的に高 Chol 食を摂取している場合において有効であるかどうかという点に関して検証した。その結果、C6-D4 群における変化は、血中 HDL-Chol 濃度の増加、肝臓及び骨格筋における組織レベルでの脂質の蓄積低下が認め

られるにすぎなかった。また骨格筋に対する作用においては、C6-D4 群の筋線維間の結合組織の低下が認められ、また筋線維数が有意に増加していたが、筋線維径、その断面積においては層化傾向を示すにすぎなかった。以上の結果から、既に蓄積されている脂質に関しては、十分な低減はみられなかったものの、肝臓における油滴の低下などの一部の影響はみられたことから、ジオスゲニンには脂質の蓄積抑制だけでなく低減作用もあるのではないかと考えられた。しかし 4 週間という期間では不十分であり、特に骨格筋に対する作用はその摂取期間に影響される可能性が示された。この点はさらなる追試が必要であると考えている。

(2) ジオスゲニンが骨格筋細胞の細胞機能に与える影響

まず、ジオスゲニンが骨格筋細胞の細胞増殖に影響するかという点を、細胞増殖期にある C2C12 細胞を用いて検討した。その結果、ジオスゲニンは C2C12 細胞の細胞増殖を抑制することがわかった。そこで、骨格筋細胞の細胞分化に与える影響を検討したところ、ジオスゲニン存在下で C2C12 細胞を培養すると、多核の C2C12 細胞数が増加した(図 2)。この結果から、ジオスゲニンは C2C12 細胞の細胞増殖というより、細胞融合を亢進する活性があることが示され、また得られたこの結果は、ジオスゲニン摂取ラットを用いて個体レベルで示された骨格筋増大効果を裏付ける結果と考えられた。

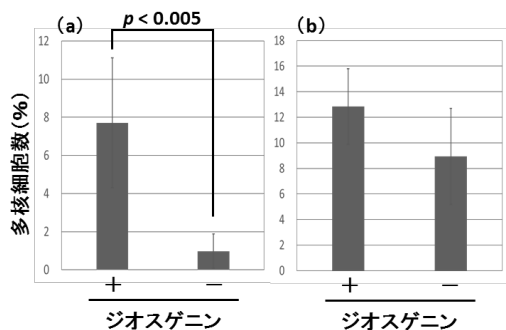


図2、ジオスゲニンの細胞融合への影響
細胞増殖期(a)あるいは細胞分化初期(b)のC2C12細胞をジオスゲニン存在下、非存在下で培養し、2個以上の核を含む細胞数を計測した。

することに加え、骨格筋におけるエネルギー代謝レベルを亢進し、脂肪の蓄積抑制、低減作用を誘導するのではないかと考えられた。

(3) ジオスゲニンによる間接的効果

本研究のラットを用いた動物実験において、ジオスゲニンを摂取する D6 群ラットでは、ジオスゲニンを摂取しない群に比べ、血中の胆汁酸濃度が増加していることを見出した。近年、胆汁酸は脂質の排泄、消化・吸収に関わる役割だけでなく、代謝調節作用をもつシグナル分子としても報告されている。得られたこの結果は、研究開始当初、予期せぬ結果であったが、ジオスゲニンによる新たな脂質代謝調節機構の発見と考えられ、大変興味深い結果であった。本研究ではこの点に関して、胆汁酸が示す骨格筋への作用を検討し、胆汁酸が骨格筋細胞の細胞機能に影響する結果を得た。この点について、さらなる検討を行っている。

〔引用文献〕

- 1) Pedersen BK et al, *J Appl Physiol*, 103, 1093-1098 (2007)
- 2) Iwabu M et al, *Nature*, 464, 1313-1319 (2010)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- Kusano Yuri, Tsujihara Nobuko, Masui Hironori, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Takeuchi Wakako. Diosgenin supplementation prevents lipid accumulation and induces skeletal muscle-fiber hypertrophy in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 査読あり in press
- Kusano Yuri, Tsujihara Nobuko, Masui Hironori, Kozai Hana, Takeuchi Wakako. Consumption of Japanese yam improves lipid metabolism in high-cholesterol diet-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 査読あり 62(5), 2016, 350-360 DOI: 10.3177/jnsv.62.350

〔学会発表〕(計3件)

- 笠原玲奈、坂東春佳、升井洋至、柴田貴広、内田浩二、草野由理、ジオスゲニンの脂肪蓄積抑制効果における骨格筋の関与、第75回日本栄養・食糧学会中部支部大会、2018年
- 草野由理、植物ステロールが脂質代謝に与える影響、第6回分子食品機能研究会、2015年
- 升井洋至、辻原命子、草野由理、竹内若子、ジオスゲニンによる脂質代謝亢進作用の検討、日本食品科学工学会第61回大会、2014年

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：竹内 若子
ローマ字氏名：(TAKEUCHI, Wakako)

研究協力者氏名：辻原 命子
ローマ字氏名：(TSUJIHARA, Nobuko)

次に、ジオスゲニン摂取ラットにおいて、TG 低下が認められたことから、ジオスゲニンが骨格筋のエネルギー代謝経路を活性化し、個体の代謝レベルを上げる活性があるのではないかと考え、その点を検討した。細胞分化した C2C12 細胞をジオスゲニン存在下で培養した結果、ジオスゲニンはその濃度依存的に AMPK のリン酸化レベルを亢進することを明らかにした。さらに AMPK キナーゼ及び下流シグナルを検討し、ジオスゲニンは AMPK のリン酸化を介した細胞内のエネルギー代謝経路を活性化し、骨格筋細胞における脂肪酸の代謝レベルを亢進することを明らかにした。以上のことから、ジオスゲニンは骨格筋細胞に直接作用し、細胞融合を亢進

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。