

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350148

研究課題名(和文)サルコペニア(加齢性筋萎縮)予防のための機能性マリンフラボノイドの探索

研究課題名(英文)Effect of functional marine flavonoid on muscle atrophy

研究代表者

平坂 勝也(HIRASAKA, Katsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・助教

研究者番号：70432747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、褐藻抽出画分よりフラボノイド類であるモリンを検出することができた。筋萎縮モデルマウスを用いた解析において、0.1%マリンフラボノイド摂取は、筋重量や筋線維面積の減少に対して抵抗性を示した。興味深いことに、マリンフラボノイド摂取はガン増殖も抑制した。C2C12筋管細胞に癌細胞培養上清及びマリンフラボノイドを添加し、形態学的観察を行った。その結果、マリンフラボノイドを添加することにより、筋管細胞の萎縮に対して抵抗性を示した。以上の結果より、海藻中フラボノイドはガン細胞由来液性因子あるいはガン細胞に作用することにより、筋萎縮予防効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found flavonoid, morin in brown algae. Next, we examined the effect of dietary marine flavonoid containing morin, on the wasting of muscle. The wet weight and myofiber size of skeletal muscle in tumor-bearing mice, which is known to muscle atrophy model, significantly decreased, compared with that of vehicle-injected control mice. In contrast, the wet weight and myofiber size of skeletal muscle in tumor-bearing mice fed the marine flavonoid diet were nearly the same as those in vehicle-injected control mice. Moreover, treatment of marine flavonoid in C2C12 myotube inhibited myotube atrophy induced by tumor. These results suggest that dietary marine flavonoid suppresses muscle wasting in tumor-bearing mice. Thus, marine flavonoid may be efficacious in a therapeutic approach against the wasting of muscle.

研究分野：分子栄養学

キーワード：保健機能食品 マリンフラボノイド 加齢

1. 研究開始当初の背景

超高齢者社会を迎えている我国では、加齢による筋萎縮の予防は高齢者の quality of life (QOL)向上と運動器症候群(ロコモティブシンドローム)発症予防に重要である。サルコペニア(老化による筋萎縮)は廃用性筋萎縮(宇宙フライトやベッドレストなど)と異なり、回復するのが困難であるとされている。その予防法としては持続的な筋力トレーニングや十分な栄養摂取などで防ぐしかないのが現状である。我々は、筋萎縮の重要な原因酵素がユビキチンリガーゼ(ユビキチン依存性蛋白質分解経路の律速酵素)であることを発見した。さらに、転写因子である NF κ B や FOXO の活性化が筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ MuRF1 や Atrogin-1 の発現上昇に重要であることを報告した。したがって、ユビキチンリガーゼの活性化をいかに抑制できるかが筋萎縮予防の鍵となる。我々はこれまでに食品中の生理活性物質に着目し、研究を進める中で、カテキンやケルセチンなどのフラボノイド類が抗酸化作用により筋萎縮を予防することを見出した。高い活性をもつフラボノイド類を得るにはそれらを多く含む食物(野菜や山菜など)を大量に濃縮あるいは酵素処理しなければならない。我々が着目した水産物資源(マリンフラボノイド)の生理活性はほとんど研究されていないため、新しい機能性を持った活性の発見が期待される。

2. 研究の目的

老化や寝たきりにより骨格筋は萎縮する。我々は、筋特異的ユビキチンリガーゼが加齢や廃用による筋萎縮の重要な原因因子であることを見出した。さらに、我々はフラボノイド類が筋萎縮予防に効果的であるエビデンスを得た。本研究では、未だほとんど開拓されていない水産物資源(マリンフラボノイド)がサルコペニア予防に効果的であるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

【海藻からフラボノイドの抽出】

褐藻アカモク 1 g を精秤し、氷冷した TBHQ 含む 75%メタノールを加え、試験管用ポリトンホモジナイザーで破碎した。その後、HCl を加え、90°C で 2 時間攪拌した。2,600 rpm で遠心して上清を集めた。10 M KOH、1 M KOH で中和し、pH3.0 に調整した。上清を抽出溶媒で 10 ml に定容し、抽出液とした。

【フラボノイドの分析】

上記で調製した抽出液を超純水で 16 倍に希釈し、0.45 μ m のメンブランフィルター(Advantec Toyo 社製)でろ過後、その 20 μ l を HPLC 分析に供した。

使用した HPLC には、以下のシステムを用いた。高速液体カラムクロマトグラフィー自動分析システム(LC-2000 plus series、日本分

光社製)を用い、その内訳はオートサンプラーには AS-2057 を、送液ポンプには PU-2080 を、カラムオープンには CO-2065 を、検出器には UV-2075 を用いた。使用した分析用カラムは島津社製逆送分配カラム TSKgel ODS-80Ts (ϕ 3.9 mm \times 15 cm) を用いた。測定条件は、試料注入量 10 μ l、移動相流量 0.9 ml/min、カラム保持温度 30°C、吸収波長 340 nm で、ピーク面積法により抽出液のフラボノイド量を求めた。

【動物実験】

7 週齢、C57/BL6 系雄マウスは 24 \pm 1°C、午前 6 時から午後 6 時までを明期として飼育した。実験動物の取り扱いには長崎大学実験動物取り扱い指針に則して行った。マウスは普通食を 1 週間自由摂取させた後、筋萎縮モデルを模倣した。その間、普通食群とモリンを重量比 0.1% で配合した飼料を給餌させた群に分け、それぞれの試験食を 3 週間自由摂取させた。

【ガンカヘキシーモデル】

マウス由来ルイス肺ガン(LLC)細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で、増殖培地 [100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、10% 牛胎児血清(FBS)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] で培養した。培養細胞はトリプシンにて剥離し、Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) に懸濁させた。1 \times 10⁶ 個の LLC 細胞は 1 週間の予備飼育を行ったマウス右脚の大腿筋近傍の皮下に移植した。一方、コントロール群は HBSS をマウス右脚の大腿筋近傍の皮下に投与された。投与後、マウスは 4 群(普通食コントロール群; 普通食ガン細胞移植群; フラボノイド食コントロール群; フラボノイド食ガン細胞移植群)に分け、3 週間の飼育を行った後、直ちに後肢の前脛骨筋、腓腹筋を採取した。湿重量を測定し、体重当りの筋湿重量を算出した。このとき、NC の平均筋湿重量を 100% とした。

【共培養実験】

マウス骨格筋由来細胞である C2C12 筋芽細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で、増殖培地 [100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、10% 牛胎児血清(FBS)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] で培養した。C2C12 筋芽細胞が 100% コンフルエントになったところで 2% horse serum を含む DMEM に交換し、分化させた。その 72 時間後、分化した C2C12 細胞に LLC ガン細胞上清を 30 時間処理した。

4. 研究成果

これまでに海藻から抽出したフラボノイドは、陸生植物からのフラボノイドとは若干異なった組成を示すことが報告されている。褐藻中に含まれるフラボノイド類の分離を

行った結果、酸メタノール抽出画分において、様々なフラボノイド様ピークが得られた(図1)。これらのピークの中からモリンを同定した。モリンは褐藻中に含まれているフラボノイドの一つであり、アカモク 100g 中に存在するモリンの量は、約 0.1g であった。

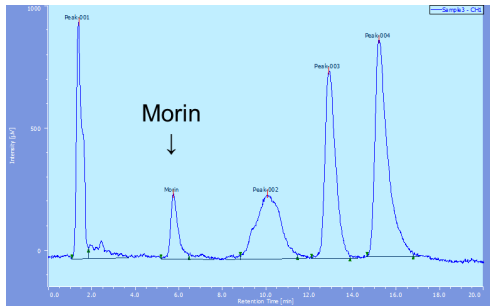


図1. 褐藻中に含まれるフラボノイドの分離

ケルセチンやイソフラボンなどのフラボノイドは筋萎縮抑制作用が報告されており、海藻中に含まれているフラボノイドにおいても同様の効果が認められる可能性が示唆される。そこで、海藻中に含まれるフラボノイド、モリンを用いて筋萎縮抑制作用を有するかどうか検討した。普通食群ではガンカヘキシーマウスにおいて、萎縮筋で観察される筋重量の減少が認められた。これに対して、モリン食群ではガンカヘキシーによる筋重量の減少に対して抵抗性を示した(図2)。興味深いことに、マリフラボノイドの摂取はガン細胞増殖も抑制した。さらに、骨格筋より切片を作成し、筋横断面積を測定した結果、筋湿重量の結果同様、普通食群ではガンカヘキシーマウスにおいて、萎縮筋で観察される筋線維面積の縮小が認められたが、モリン食群ではガンカヘキシーによる筋線維面

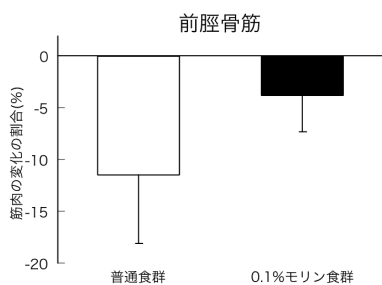


図2. ガンカヘキシーによる筋萎縮に対するフラボノイドの作用(マウスを用いた解析)

積の減少に対して抵抗性を示した(データは示さず)。

モリンの筋細胞に対する作用が調節的かどうかを検討するために、C2C12 筋管細胞に癌細胞培養上清及び 0, 1, 10, 20 μM のモリンをそれぞれ同時に添加し、筋管細胞の形態学的観察を行った。低濃度のモリンでは筋管萎縮抑制効果は認められなかったが、10, 20 μM のモリンを添加することにより、筋管細胞の

萎縮に対して 50%程度筋萎縮抑制作用を示した(図3)。

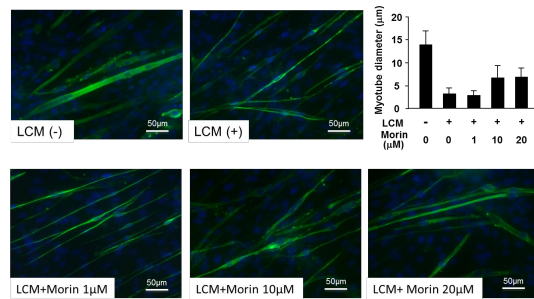


図3. ガンカヘキシーによる筋萎縮に対するフラボノイドの作用(細胞を用いた解析)

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 9 件)

1. Hirasaka K, Saito S, Yamaguchi S, Miyazaki R, Wang Y, Haruna M, Taniyama S, Higashitani A, Terao J, Nikawa T, Tachibana K. Dietary Supplementation with Isoflavones Prevents Muscle Wasting in Tumor-Bearing Mice. *J Nutr Sci Vitaminol*, 査読有, 62(3): 178-184, 2016, DOI: 10.3177/jnsv.62.178.
2. Mukai R, Matsui N, Fujikura Y, Matsumoto N, Hou DX, Kanzaki N, Shibata H, Horikawa M, Iwasa K, Hirasaka K, Nikawa T, Terao J. Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *J Nutr Biochem*, 査読有, 31: 67-76, 2016, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.001.
3. Abe T, Hirasaka K, Kohno S, Tomida C, Haruna M, Uchida T, Ohno A, Oarada M, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Choi I, Aoyama T, Terao J, Nikawa T. Capric Acid Up-Regulates UCP3 Expression without PDK4 Induction in Mouse C2C12 Myotubes. *J Nutr Sci Vitaminol*, 査読有, 62(1): 32-39, 2016, DOI: 10.3177/jnsv.62.32.
4. Nakazono S, Cho K, Isaka S, Abu R, Yokose T, Murata M, Ueno M, Tachibana K, Hirasaka K, Kim D, Oda T. Anti-obesity effects of enzymatically-digested alginate oligomer in mice model fed a high-fat-diet. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 査読有, 7(2): 1-8, 2016, DOI: 10.1016/j.bcdf.2016.02.001.
5. Hirasaka K, Mills EM, Haruna M, Bando A, Ikeda C, Abe T, Kohno S, Nowinski SM, Lago CU, Akagi K, Tochio H, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Nikawa T. UCP3 is associated with Hax-1 in mitochondria in the presence of calcium ion. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 472(1): 108-113, 2016, DOI:

- 10.1016/j.bbrc.2016.02.075.
6. Ohno A, Ochi A, Maita N, Ueji T, Bando A, Nakao R, Hirasaka K, Abe T, Teshima-Kondo S, Nemoto H, Okumura Y, Higashibata A, Yano S, Tochio H, Nikawa T. Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. Arch Biochem Biophys, 査読有, 594: 1-7, 2016, DOI: 10.1016/j.abb.2016.02.014.
 7. Hashimoto R, Sakai A, Murayama M, Ochi A, Abe T, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Yanagawa H, Yasui N, Inatsugi M, Doi D, Takeda M, Mukai R, Terao J, Nikawa T. Effects of dietary soy protein on skeletal muscle volume and strength in humans with various physical activities. J Med Invest, 査読有, 62(3-4): 177-183, 2015, DOI: 10.2152/jmi.62.177.
 8. Kawai N, Hirasaka K, Maeda T, Haruna M, Shiota C, Ochi A, Abe T, Kohno S, Ohno A, Teshima-Kondo S, Mori H, Tanaka E, Nikawa T. Prevention of skeletal muscle atrophy in vitro using anti-ubiquitination oligopeptide carried by atelocollagen. Biochim Biophys Acta, 査読有, 1853(5): 873-880, 2015, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.024.
 9. Ochi A, Abe T, Nakao R, Yamamoto Y, Kitahata K, Takagi M, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Taesik G, Choi I, Kawamura T, Nemoto H, Mukai R, Terao J, Nikawa T. N-Myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. Arch Biochem Biophys, 査読有, 570: 23-31, 2015, DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.006.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 平坂勝也、ユビキチンリガーゼを介した筋萎縮の分子メカニズムと機能性食品によるその予防法、第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会 日本宇宙生物科学会第 30 回大会 合同大会、2016 年 10 月 13 日-15 日、愛知医科大学たちばなホール(愛知県長久手市)
2. 平坂勝也、微小重力環境下における筋萎縮の分子メカニズムと栄養素によるその予防法、日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会、2016 年 9 月 15 日-16 日、長崎大学文教キャンパス 環境科学部・教養教育講義棟(長崎県長崎市)
3. 平坂勝也、ロコモティブ・メタボリックシンドローム予防のための栄養学的アプローチ、第 26 回 体力・栄養・免疫学会大会、2016 年 8 月 27 日-28 日、長崎大学文教キャンパス文教スカイホール(長崎県長崎市)
4. Katsuya Hirasaka, Takeshi Nikawa, Yao

- Wang, Takayuki Uchida, Reiko Nakao Shigeto Taniyama, Katsuyasu Tachibana. Dietary flavonoids prevent ubiquitin ligases-mediated muscle wasting in tumor-bearing mice、 「Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease」 conference、2016 年 6 月 6 日-11 日、Asilomar Conference Grounds (Pacific Grove, CA, USA)
5. 高木麻理奈、平坂勝也、齋藤志伸、宮崎里帆、谷山茂人、橘勝康、二川健、食事性イソフラボン摂取はカヘキシーによる筋萎縮を予防する、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 13 日-15 日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)
 6. 平坂勝也、山田明德、内田貴之、中尾玲子、二川健、IGF-1 シグナル経路の活性化を介した廃用性筋萎縮予防法、第 30 回宇宙環境利用シンポジウム、2016 年 1 月 19 日-20 日、宇宙航空研究機構 宇宙科学研究所 相模原キャンパス(神奈川県相模原市)
 7. 平坂勝也、齋藤志伸、宮崎里帆、谷山茂人、二川健、橘勝康、カヘキシーによる筋萎縮に対するフラボノイド類の効果、平成 27 年度 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2015 年 10 月 30 日-11 月 1 日、沖縄県市町村自治会館(沖縄県沖縄市)
 8. Katsuya Hirasaka, Shinobu Saito, Saki Yamaguchi, Riho Miyazaki, Shigeto Taniyama, Takeshi Nikawa, Katsuyasu Tachibana、Dietary flavonoid intake prevents muscle wasting in tumor-bearing mice、第 69 回日本栄養・食糧学会大会、12th Asian Congress of Nutrition、2015 年 5 月 14 日-17 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 9. 平坂勝也、これからの食品機能研究をリードするための米国での分子栄養学に関する在外研究、平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 27 日-31 日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)
 10. 平坂勝也、廃用性筋萎縮予防に関する分子栄養学的研究、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日、札幌市教育文化会館大ホール(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST?ISTActId=FINJPDetail&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=100000917>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平坂 勝也 (HIRASAKA, Katsuya)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)・助教

研究者番号：70432747

(2) 研究分担者

二川 健 (NIKAWA, Takeshi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・教授

研究者番号：20263824

(3) 連携研究者

橘 勝康 (TACHIBANA, Katsuyasu)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)・教授

研究者番号：20171712