

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892020

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮後の筋合成を促進するプレニルフラボノイドの研究

研究課題名(英文) Effect of prenyl flavonoids on recovery from disuse muscle atrophy

研究代表者

向井 理恵 (MUKAI, Rie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：90547978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：不活動状態や無重力状態で引き起こる廃用性筋萎縮からの回復を助ける食品成分に関する研究を行った。実験動物に筋肉の萎縮を誘導し、そのあとにプレニルフラボノイドを混合した飼料を与えることで骨格筋の回復状況を評価した。プレニルフラボノイドを与えることで、骨格筋の萎縮からの回復の程度は改善した。作用メカニズムとしてフィトエストロゲン活性が寄与する可能性が示唆された。今回の成果は筋萎縮によって引き起こされるQOLの低下を改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that prenyl flavonoid improves the recovery of skeletal muscle from the disuse muscle atrophy. Right ankle of hind leg of mouse was fixed to induce disuse muscle atrophy. After that, prenyl flavonoid mixed diet or control diet was supplied to mice. To estimate the atrophy, weight of muscle was measured and ratio of atrophied muscle to control muscle was calculated. Muscle weight in supplementation group showed higher recovery than that in control diet group.

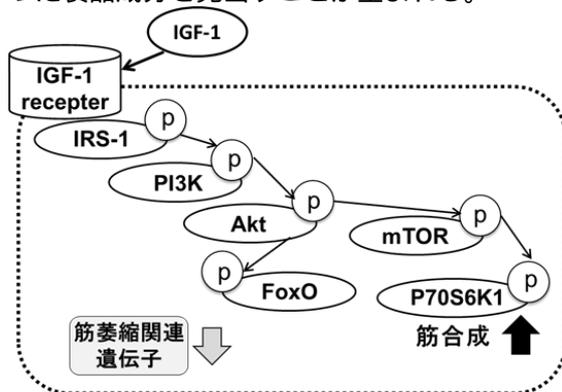
研究分野：食品機能学

キーワード：フラボノイド 筋萎縮 筋合成

1. 研究開始当初の背景

骨格筋はエネルギー代謝や糖(グルコース)の取り込み、そして運動に重要な役割を果たす。メタボリック症候群や寝たきりになる人口を減らすために、運動・栄養不足、加齢などによる廃用性筋萎縮の予防・改善が望まれている。これまでに、アミノ酸¹⁾やクレアチン²⁾が骨格筋量の維持に有効であることが分かっている。臨床の現場では、骨格筋量を増やすためのリハビリテーションが行われている。筋合成時に有用な栄養素としてアミノ酸類が報告されているが、それを補助できる食品成分の探索は少なく、作用機序解明はいまだ十分ではない。

骨格筋を構成するミオシンなどのタンパク質は、合成と分解が繰り返され、その量が保たれている。この筋合成と筋分解のバランスには、IGF-1 (インスリン様成長因子)シグナル経路が関与している。IGF-1は骨格筋の成長に重要な役割を持つ因子であり、肝臓や筋細胞、骨芽細胞で合成され、筋繊維の肥大を促す³⁾。筋合成時には、IGF-1が受容体に結合することで、その下流にあるPI3K/Akt経路が活性化し、その結果筋タンパク質合成が促進し、分解が抑制される(図参照)⁴⁾。反対に筋萎縮時には、IGF-1抵抗性が起こり、PI3K/Akt経路のリン酸化が障害され、筋タンパク質合成が阻害される⁵⁾。さらに下流にあるFoxo1がリン酸化されずに核内に移動し、Atrogin-1、MuRF-1などの筋萎縮関連遺伝子の発現が上昇する⁶⁾。骨格筋には可塑性があり、筋萎縮(筋タンパク質の分解)が亢進するときには、筋合成(筋タンパク質の合成)は低下する。このことから、廃用性筋萎縮の症状に対応するためには、「廃用性筋萎縮の進展を遅くすること」と「廃用性筋萎縮からの回復を早めること」との両方の機能をもった食品成分を見出すことが望まれる。



筋肉合成時(回復時)のシグナル伝達

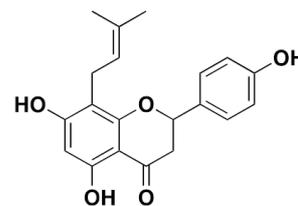
1) Biolo, G. et al., Am J Physiol, 273, E122 (1997)
 2) Hespel, P. et al., J Physiol, 536, 625 (2001)
 3) Crossland, H. et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 305, E183 (2013)

4) Bodine, S. C. et al., Nat Cell Biol, 3, 1014 (2001)
 5) Zhang, P. et al., Med Hypotheses, 69, 310 (2007)
 6) Sanchez, A. M. et al., Cell Mol Life Sci, (2013)

2. 研究の目的

申請者はこれまでに植物性食品に含まれるフラボノイドの機能性研究を行ってきた。有効なフラボノイドを探索するため、プレニル基を有するフラボノイド(プレニルフラボノイド)に着目した。プレニル基を持つことでフラボノイドの細胞膜透過性が向上し、生体利用性が上がり、機能性が向上することが期待できる。我々はプレニルフラボノイドのうちプレニルナリンゲニン(図)に着目した。これは、ホップやビールに含まれている⁷⁾だけでなく、プレニルナリンゲニンの前駆体を含む食品を摂取すると、腸内細菌叢や肝臓の代謝によってプレニルナリンゲニンに変換されることが分かっている⁸⁾。このことから、食を通じた健康維持・増進効果のための有用な食品成分だと考えられる。

申請者はこれまでに廃用性筋萎縮モデルである坐骨神経切除マウスを用いた研究で、プレニルナリンゲニンをあらかじめ食べさせることで、筋萎縮関連遺伝子の発現を低下させ、骨格筋量の減少を抑制することを報告した⁹⁾。この研究成果では、プレニルナリンゲニンの摂取によってAktのリン酸化を活性化することも報告している。Aktのリン酸化は筋タンパク質の合成を正に制御することから、本課題ではプレニルナリンゲニンが廃用性筋萎縮からの回復を促すか否か明らかにする。



プレニルナリンゲニンの構造

7) Stevens, J. F. et al., J Chromatogr A, 832, 97 (1999)
 8) Guo, J. et al., Drug Metab Dispos, 34, 1152 (2006)
 9) Mukai, R. et al., PLoS One, 7, (2012)

3. 研究の方法

マウスの下肢骨格筋に筋萎縮を誘導する固定具を作製した(特願 2015-074324)。その固定具を用いて、マウス下肢に廃用性筋萎縮を誘導した。筋萎縮が十分誘導されたのちに固定具を解除し、骨格筋の回復を評価した。骨格筋の回復の程度は骨格筋の湿重量を測定することで判断した。固定具の解除とともに

にプレニルナリンゲニンの給餌を開始し、骨格筋回復に及ぼす影響を確認した。解剖時に得られた血漿と骨格筋を用いて、骨格筋合成に関連したシグナル経路の変化を検出した。また、血漿中のプレニルナリンゲニンの濃度を測定することで、効果を示す血中濃度を見積もった。

培養細胞を用いた作用メカニズムの検討では、プレニルナリンゲニンの作用濃度と作用時間を変化させてその影響を確認した。マウス骨格筋由来 C2C12 細胞を筋管細胞へと分化させたのち、実験に用いた。脱感作処理を行った後にプレニルナリンゲニンを処理した。骨格筋合成に関連したシグナル経路のリン酸化をウエスタンブロット法で検出した。

4. 研究成果

廃用性筋萎縮からの筋タンパク質合成、つまり筋量回復を評価するための動物実験モデルを構築した。本モデルでは、マウスの右後肢のみ足首を固定することで約 70%まで筋肉が萎縮することを確認し、固定解除後の通常飼育によって、筋量が回復することを確認した。固定解除と同時にプレニルナリンゲニンを含む AIN-93M を与えた。その結果、コントロール食 (C34) 群よりもプレニルナリンゲニン摂取 (PN34) 群で有意に高い値であった。このことから PN 摂取は廃用性筋萎縮からの筋量回復を促進することがわかった。PN の摂取は血中 IGF-1 量を増加させた。骨格筋内のタンパク質合成シグナル経路では、Akt と P70S6K1 のリン酸化が C34 群と異なる傾向が認められた。

マウス骨格筋由来細胞 C2C12 を用いた実験では、プレニルナリンゲニンの作用濃度が生体内で存在しうる濃度付近で実施した。その結果、骨格筋合成に関わる PI3K/Akt/P70S6K1 経路のリン酸化が上昇した。本経路が PN によって刺激され骨格筋回復が促進されることが示唆された。

プレニルナリンゲニンのエストロゲン様活性に起因するか否か明らかにするため卵巣切除 (OVX) マウスを用いて同様の実験を行った。プレニルナリンゲニン投与群とエストロゲン投与群で同程度の回復促進効果が認められた。阻害剤実験の実施が今後の課題であるが、本試験で得られた結果からプレニルナリンゲニン摂取はエストロゲンの補充と同様に筋量回復を促進することがわかった。

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)

Rie Mukai, Naoko Matsui, Yutaka Fujikura, Norifumi Matsumoto, De-Xing Hou, Noriyuki Kanzaki, Hiroshi Shibata, Manabu Horikawa,

Keiko Iwasa, Katsuya Hirasaka, Takeshi Nikawa, Junji Terao. Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 査読あり, 2016, **31**, 67-76, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.001.

Chiemi Kamada, Rie Mukai, Akari Kondo, Shinya Sato and Junji Terao. Effect of quercetin and its metabolite on caveolin-1 expression induced by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 査読あり, 2016, **58**, 193-201 DOI: <http://doi.org/10.3164/jcbrn.16-2>

向井理恵, 寺尾純二、プレニル化は体内滞留時間を延長させて、組織への蓄積を高める、化学と生物、査読無し、2015、**53**, 71-73.

Kyuichi Kawabata, Rie Mukai, and Akari Ishisaka. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food & function*. 査読あり, 2015, **6**, 1399-1417, DOI: 10.1039/c4fo01178c

向井理恵, 寺尾純二、プレニル化はフラボノイドの機能性を増強する、バイオサイエンスとインダストリー、査読無し、2015、**74**, 73-76.

Junji Terao, and Rie Mukai. Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 査読あり, 2014, **559**, 12-16, DOI: 10.1016/j.abb.2014.04.002.

〔学会発表〕(計 3 件)

Pei Yi Lin, Rie Mukai, Hitomi Horikawa, Junji Terao: 8 Prenylation enhances the recovery from disuse muscle atrophy of mice with cast immobilization. 2015, 14-18 May, 12th Asian congress of Nutrition, Pacifico Yokohama (Yokohama・Kanagawa)

Rie Mukai, Naoko Matsui, Takeshi Nikawa, Junji Terao: Pre-intake of quercetin slow the progression of disuse muscle atrophy by mitochondrial dysfunction. 2014, 2-6, September, 2014, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, Nagoya University (Aichi・Nagoya)

向井理恵, 堀川瞳、二川健、根本尚夫、河

村知志、寺尾純二：プレニルナリンゲニンは
廃用性筋萎縮からの回復を促進する。2014年
5月30日～6月1日、第68回日本栄養・食
糧学会大会、酪農学園大学（北海道・札幌）

〔図書〕(計 1 件)

Terao J., Mukai R. et. al., CRC Press,
Clinical Aspects of Functional Foods and
Nutraceuticals. Chapter 7. Food Functions
Preventing Muscle Atrophy. 2014、474
(105-114)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：実験動物の下肢筋肉に廃用性筋萎縮を
惹起する器具
方法：動物の下肢の間接を固定し、筋萎縮を
誘導する。
発明者：向井理恵
権利者：国立大学法人徳島大学
種類：特許
番号：特願 2015-074324
出願年月日：平成 27 年 3 月 31 日
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：筋萎縮抑制剤
発明者：寺尾純二、向井理恵
権利者：国立大学法人徳島大学
種類：特許
番号：第 5885962 号
取得年月日：平成 28 年 2 月 19 日(登録日)
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

向井 理恵 (MUKAI, Rie)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：90547978