食品成分によって抗疲労性筋線維を増やせるか

Possible Contribution of Dietary Functional Food Ingredients to Fatigue-Resistant Myofiber Generation

by

Ryuichi Tatsumi, Wataru Mizunoya

Department of Animal and Marine Biological Sciences,

Graduate School of Agriculture, Kyushu University

ABSTRACT

Proportions of muscle fiber types are responsible for a variety of properties of skeletal muscle, including contractile, metabolic, and sensory (differential tasting-component contents and fat deposition). Therefore mechanisms that regulate these properties, and their manipulation are hot targets of research for human sports and health sciences and animal production.

We recently found that resident myogenic stem satellite cells secrete semaphorin 3A (Sema3A) protein which exclusively impacts the formation of fatigue-resistant fibers (also called slow-twitch fibers) through a cell-membrane receptor (neuropilin2-plexinA3 complex) → myogenin/MEF2D/HDAC7 → slow-myosin signaling pathway 5). Here we report that an 8-week intake of chlorogenic-acid rich materials (APP; polyphenol mixture prepared from unriped apples) in the diet, may stimulate the Sema3A-dependent pathway concerned. Results demonstrated improvement of lower hind-limb muscle endurance based on increased proportions of fatigue-resistant

myofibers (types IIa and I) by the 0.5% APP-feeding to young-adult rats. There was no significant difference in the animal body-phenotypes or locomotor activity shown as total moving distance in light and dark periods. The result indicates that the shift in myosin heavy chain (MyHC) isoforms from fast-to-slow did not include a bias due to greater exercise behavior by the treated rats. Notably, a subsequent *in vitro* study showed that supplementation of APP (500 ng/ml) or the major component chlorogenic acid (10 ng/ml) also up-regulated the expression of slow MyHC and the up-stream signaling molecules, myogenin and MEF2D, in primary cultures of differentiating myoblasts. Other major polyphenols found in APP (procyanidin B1, B2, phloridzin, and catechin) in a range of 10-1000 ng/ml did not induce these effects.

Therefore, the present study highlights a possible contribution of dietary chlorogenic acid intake to antagonizing the Sema3A-signaling pathway responsible for fatigue-resistant fiber formation. The finding may help in developing a novel strategy for application in human sports and age-related health sciences.

要旨

骨格筋の疲労耐性に関わる抗疲労性筋線維(遅 筋型筋線維) の形成を食品成分によって亢進で きるかどうか調べた. 筋幹細胞である衛星細胞 の初代培養系に食事性ポリフェノールであるク ロロゲン酸を添加すると (終濃度 10 ng/ml), 抗 疲労性筋線維の形成を誘導する新奇シグナル軸 (Sema3A リガンド → 細胞膜受容体 neuropilin2plexinA3 複合体 → 転写制御因子 myogenin-MEF2D → 抗疲労性 myosin) が活性化した. ま た、クロロゲン酸を主成分とするポリフェノール 混合物を成熟ラットに8週間給餌すると(添加濃 度 0.5%), 後肢下腿部筋の myosin アイソフォー ム組成が抗疲労性方向ヘシフトし筋持久力が向上 することが確認された. これらの結果より, クロ ロゲン酸が Sema3A 受容体のアゴニストとして抗 疲労性筋線維の形成を促進すると考えられた. 高 齢者やスポーツ競技者などの筋疲労耐性向上への 食品機能学的貢献が期待される.

緒言

骨格筋の主体である筋細胞(細長く巨大な細胞なので"筋線維"と呼ばれる)は、その収縮特性やエネルギー代謝特性の違いから抗疲労性筋線維(遅筋型筋線維とも呼ばれる)と易疲労性筋線維(速筋型筋線維)の2つの型に分類される。骨格筋の筋線維型組成(抗疲労性筋線維と易疲労性筋線維の割合)はヒトの運動機能やQOL(生活の質)などに関わる重要な要素であるので、これを支配している分子機構を解明すると共に、その食品機能学的作動性を検証することが本研究の目的である。特に健康寿命の延伸(健康増進)の観点から社会的意義は極めて大きいと言える。

本研究代表者らの研究グループはこれまでに、i) 筋線維の周囲に多数存在する筋幹細胞(衛星細胞と呼ばれる筋組織幹細胞)が活性化・増殖し分化・融合する時期に至ると多機能性細胞制御因子 semaphorin 3A (Sema3A) を合成・分泌すること ¹⁻⁴⁾、ii) Sema3A が筋幹細胞の細胞膜受容体 (neuropilin2-plexinA3 複合体)に結合

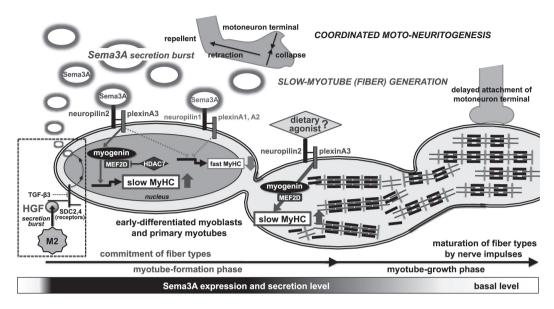


図1 筋幹細胞分泌因子 semaphorin 3A (Sema3A) による抗疲労性筋線維の形成誘導(コミットメント)モデル Sema3A が細胞膜受容体(neuropilin2-plexinA3 複合体)に結合すると、myogenin-MEF2D-HDAC7 転写制御系を介して抗疲労性 myosin (slow myosin) の発現が誘導され抗疲労性筋線維が形成される(出版社 Wiley の許可を得て、引用文献 5 の図 7 を転載・改変)

すると、筋特異的転写制御系である myogenin-MEF2D-HDAC7 を介して抗疲労性 myosin (遅筋 型 myosin) の発現を誘導し抗疲労性筋線維が形 成されることを見出した(図1のモデル図参照) 5). この新規の自律制御軸は、既知の「運動神経 刺激制御系(活動電位の大きさや頻度による制 御) | $^{6-10)}$ や「PPAR δ -PGC1 a 転写制御系 | $^{11-17)}$ が作動する前に筋線維型を初期決定(コミット) する強力な分子機構であること、細胞外リガンド (Sema3A) と細胞膜受容体との結合によってシグ ナルが発生することに大きな特徴がある. このこ とは、Sema3A 細胞膜受容体 (neuropilin2-plexinA3 複合体) のアゴニストによって抗疲労性筋線維 の形成を促進できることを示唆している. 実際, これまでの予備実験により、クロロゲン酸(コー ヒー生豆や幼果皮に多く含まれるポリフェノー ル)が上記のアゴニスト活性を有することを示唆 する実験結果を得ている.

そこで本研究では、上記のクロロゲン酸のアゴニスト活性を明らかにすべく、衛星細胞培養系への添加実験を行った。具体的には、クロロデサントスポーツ科学 Vol. 39

ゲン酸添加によって Sema3A 受容体(neuropilin2-plexinA3 複合体) → myogenin-MEF2D-HDAC7 → 抗疲労性 myosin のシグナル伝達軸が活性化するかどうかを調べた($in\ vitro\$ 実験).また,クロロゲン酸給餌の予備実験として,クロロゲン酸を主成分とするリンゴポリフェノール(APP; リンゴ幼果皮から調製したポリフェノール混合物)をラットに低用量給餌し,筋の疲労耐性に及ぼす効果を検証した($in\ vivo\$ 実験).極めて高価なクロロゲン酸の給餌実験を行う際の有効量を見積もる予備実験である.これらの $in\ vitro\$ および $in\ vivo\$ 実験結果の概要を本研究成果報告書にて報告する.

1. 方 法

1. 1 衛星細胞初代培養系への添加実験

3週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットの背部 および後肢大腿部の骨格筋より、Allen ら ¹⁸⁾ の 方法に従い衛星細胞を調製した、パーコール密 度勾配遠心分離法により衛星細胞を単離した後、 poly-L-lysine・fibronectin・laminin で 3 重 コ ー

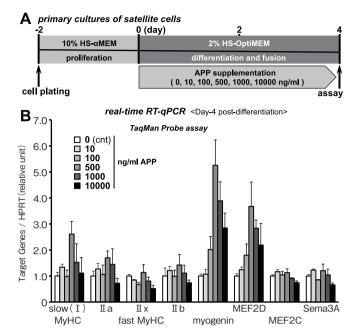


図2 衛星細胞の初代培養系におけるリンゴポリフェノール(APP)の添加実験(陽性コントロール実験) ラット骨格筋より単離した衛星細胞の分化・融合期に APP を種々の濃度で添加し(終濃度 10-10000 ng/ml),抗疲労性 MyHC アイソフォーム(MyHC I)・易疲労性 MyHC アイソフォーム(MyHC IIb,IIx,IIa)・myogenin・MEF2D・MEF2C・Sema3A の mRNA 発現変化を RT-qPCR により調べた.データは,内部標準を HPRT とした 3 ウェルの平均値 ± 標準誤差(パネル B).*, P < 0.05,**, P < 0.01 vs. コントロール(cnt: 0 ng/ml APP 区).パネル A:細胞培養系のデザイン

トした培養用プレートに 1×10^4 個 $/ \text{cm}^2$ の細胞密度で衛星細胞を播種した。10% 正常ウマ血清 (HS) を含む a MEM 培地で 2 日間前培養した後、2% HS-OptiMEM 分化誘導培地で 4 日間培養し、抗疲労性 MyHC アイソフォーム(MyHC I)・易疲労性 MyHC アイソフォーム(MyHC IIb,IIx,IIa)・myogenin・MEF2D の発現を RT-qPCRにより調べた(TaqMan Probe 法;内部標準は HPRT)。上記の分化誘導培地には,APP およびポリフェノール精製標品(クロロゲン酸,フロリジン,プロシアニジン B1,B2,エピカテキン)を種々の濃度で添加した(図 2A に示した培養デザインを参照)。

1. 2 APP 低用量摂餌実験

実験動物として、12 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット(KBT オリエンタル社)を供試した、搬入後約2 週間の馴致飼育の後(室温 22 ± 2 C、

湿度 $55 \pm 10\%$, 12:12 明暗 サイクル), AIN-93G 準拠食に APP(アサヒビール社製)を 0.5%(w/w)添加した飼料を,自由摂食飲水条件にて 8 週間給餌した(n=9 匹)、初期体重,総摂食量および体重増加量はいずれも対照群(APP 非給餌群, n=9 匹)と有意な差がないことを確認した.

Iwata ら ¹⁹⁾ の方法を一部改変し、筋持久力を 測定した。すなわち、麻酔下で脛骨神経の電気刺 激(電圧 60 V、パルス幅 1 ms、250 Hz)により 発生する後肢下腿部後方筋(ふくらはぎの筋)の 最大発揮張力を測定し、その経時的減衰曲線から 0.5%APP 給餌群と対照群の筋持久力を比較した。 また、ミオグロビンの発現変化はアクチンを内部 標準とした ECL-Western blotting 法により解析し た。これらの動物実験は全て、日本学術会議が定 める動物実験実施ガイドラインに従い九州大学動 物実験審査委員会の承認の下実施した。

2. 実験結果と考察

2. 1 クロロゲン酸添加による抗疲労性筋線 維の形成誘導軸の活性化

抗疲労性筋線維の形成誘導を担う Sema3A 細 胞膜受容体 (neuropilin2-plexinA3 複合体) → myogenin-MEF2D-HDAC7 転写制御系→ 抗疲労 性 MvHC の新奇シグナリング軸がクロロゲン酸 によって活性化するかどうかを調べた. 先ず, 陽 性コントロールとして. 単離・培養した衛星細胞 が分化・融合し筋管(幼若な筋線維)を形成する 時期に APP を種々の濃度で培養液に添加し(最 終濃度 10-10000 ng/ml), 抗疲労性 MyHC (MyHC I) の発現に及ぼす影響を調べた(図 2B). MyHC I の mRNA 発現は有意に増加し、その効果は 500 ng/ml で最大となった. MyHC I タンパク質の 発現量の増加は Western blotting によって確認 された (data not shown). また, Sema3A 依存 的な MyHC I 発現誘導シグナリング軸を構成す る myogenin および MEF2D の発現も APP 添加 により大きく増加し、その効果も 500 ng/ml で 最大となった. Sema3A および MEF2C の発現 はAPP添加により変化しないことから、上記 の myogenin・MEF2D・MyHC I の 発 現 増 加 が Sema3A 発現増加によるものではなく、APP 成分 による直接的な効果であると考えられた. これら の陽性コントロール添加実験の結果から、本培養 実験系が APP の活性成分をアッセイする方法と して適切であることが確認された.

そこで、本研究のターゲット成分であるクロロゲン酸に対して先と同様の実験条件で添加実験を行った(最終添加濃度 10-1000 ng/ml). 図 3 に示すように、クロロゲン酸に強力な MyHC I 発現誘導効果が認められ、その効果は 10 ng/ml で最大となった. フロリジン(10 ng/ml)にも有意な効果が認められたが、その程度はクロロゲン酸に比べ小さいものであった. また、myogenin および

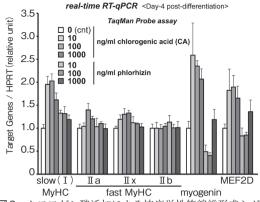


図3 クロロゲン酸添加による抗疲労性筋線維形成シグ ナル軸の要素のmRNA 発現増加

図 2 と同様に、衛星細胞の分化・融合期にクロロゲン酸あるいはフロリジンの精製標品を種々の濃度で添加し(終濃度 10-1000 ng/ml)、RT-qPCR により解析した。 *,P < 0.05, **,P < 0.01 vs. コントロール(cnt: 無添加区)

MEF2D の発現も 10 ng/ml クロロゲン酸添加により有意に増加した. 一方, フロリジンを添加すると myogenin の発現が減少したことから, 先のAPP 添加実験ではクロロゲン酸(促進因子)とフロリジン(抑制因子)が拮抗的に作用していると推察され, これが APP 濃度依存性がベル型となる要因であると推察された. APP に含まれる他の主要なポリフェノール成分(プロシアニジンB1, B2, エピカテキン)の精製標品に対しても同様の添加実験を行ったが(最終濃度 10-1000 ng/ml), MyHC I 発現に有意な変化は認められなかった(data not shown).

以上の結果から、APPに含まれるクロロゲン酸が活性成分であり、MyHCI・myogenin・MEF2Dの発現を誘導する因子であることが明らかになった。従って、クロロゲン酸がSema3A細胞膜受容体に結合すると前述の細胞膜受容体/myogenin/MEF2Dからなるシグナリング軸が活性化され MyHCIの発現誘導、即ち、抗疲労性筋線維の形成が促進されると考えられた。

2. 2 APP 摂取が筋線維型組成に及ぼす影響

上記の細胞培養系でのクロロゲン酸のアゴニスト効果を in vivo で検証するためには、クロロゲ

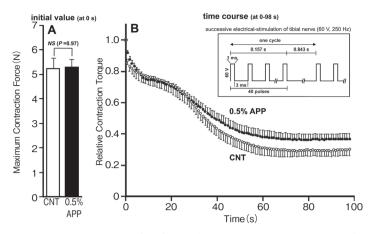


図4 0.5% リンゴポリフェノール(APP)添加食の8週間給餌による筋持久力の向上 麻酔下で脛骨神経の電気刺激(電圧 60 V、パルス幅 1 ms、250 Hz:パネル B の挿入図参照)により発生する後肢下腿部後方筋(ふくらはぎの筋)の最大発揮張力を測定し(パネル A)、その経時的減衰曲線から 0.5% APP 給餌群とコントロール群(CNT)の筋持久力を比較した(パネル B : 各群 n=9).有意差は繰り返し 2-way ANOVA test により検定した。NS、Student's t-test にて有意差なし

ン酸の摂取実験を行う必要がある。その予備実験として、クロロゲン酸の精製標品は極めて高価であるため、先ず、クロロゲン酸の有効最低投与量を推定することとした。これまでに、5%(w/w)APP 添加食を8週間給餌するとラット後肢下腿部筋の持久力が有意に向上することを観察しているので、その10分の1のAPP 添加量でも効果があるかどうかを調べた。その結果、図4に示すように、成熟ラットにAPPを0.5%含む通常食を8週間給餌すると、脛骨神経の電気刺激により発生する後肢下腿部筋の最大発揮張力の経時的減衰が抑制される傾向が観察された(F(98,1372)=1.246.P=0.0574)。

また、後肢下腿部筋の筋線維型組成を高分解能 SDS-PAGE²⁰⁾ で解析したところ、MyHC アイソフォーム組成が抗疲労性方向へ有意にシフトしており、具体的には、IIb 型あるいは IIx 型の減少と IIa 型と I 型の増加であり、また、抗疲労性筋線維に多く含まれるミオグロビンの含量も有意に増加した(data not shown). 0.5% APP 給餌によってラットの明期・暗期の自発運動量に有意な差は認められなかったことから、上記の抗疲労性方向へのシフトは運動による 2 次的効果ではないと考えられた。これらの結果より、0.5% APP 摂取に

より筋線維型組成が持久性に富む抗疲労性方向へシフトすることが明らかになった.

APP にはクロロゲン酸が約 20% 含まれていることから、今回の給餌実験は 0.1%(w/w)クロロゲン酸相当となり、現在、その給餌実験を行っているところである。結果は別の機会に報告する予定である。

3. 結論

クロロゲン酸を約20%含有するリンゴポリフェノール(APP)を0.5%(w/w)添加した餌を成熟ラットに8週間与えると、後肢下腿部筋のmyosin重鎖アイソフォーム組成が抗疲労性方向へシフトし筋持久力が向上することが確認された(in vivo 実験)。また、筋幹細胞である衛星細胞の培養系にクロロゲン酸を添加すると、抗疲労性 myosin の発現を誘導する Sema3A 細胞膜受容体(neuropilin2- plexinA3 複合体)・myogenin-MEF2D 転写制御系からなるシグナリング軸5)が活性化することから、クロロゲン酸が Sema3A 受容体のアゴニストになりうると考えられた(in vitro 実験)。従って、クロロゲン酸の低用量給餌によって抗疲労性筋線維の形成を促進できると期待できる。現在、0.1% クロロゲン酸の給餌実験

を行っており、その実験結果を別の機会に報告する。

今後、クロロゲン酸と neuropilin2-plexinA3 複合体との結合性を直接的に証明しなければならない。また、衛星細胞特異的 Sema3A-cKO マウス (Pax7CreERT2-Sema3Aflox) 5) にクロロゲン酸を給餌する実験を行い、クロロゲン酸のアゴニスト活性を in vivo で実証する予定である。同様に、成長期・成熟期・老齢期のマウスあるいはラットに対してクロロゲン酸をそれぞれ給餌し抗疲労性筋線維の増加効果に違いがあるかを調べることも重要である。

研究成果は、加齢筋医科学・健康科学・スポーツ科学への食品機能学的貢献が強く期待される。即ち、加齢や不活動(寝たきりや無重力環境暴露)に伴う筋持久力の低下を抑制することやアスリートの持久運動能力の向上に貢献する他、脂肪酸をβ酸化しエネルギー源として代謝する抗疲労性筋線維の増加は体脂肪を減少させるので生活習慣病の予防ひいては健康寿命の延長やQOLの改善に寄与する可能性が期待される。

謝辞

本研究に対して貴財団平成29年度研究助成を賜りましたことに、あらためて深謝致します。本紙面を借りてお礼申し上げますと共に、貴財団の益々のご発展を祈念します。

なお,本研究課題のその他の共同研究者は当研究室の赤星眞理子氏,鈴木貴弘氏,松吉祐児氏,宮原英生氏,中村真子氏です。本研究の実施にあたり多大なご協力を頂いたことに対して,感謝の意を表します。

文 献

 Tatsumi R., Sankoda Y., Anderson J. E., Sato Y., Mizunoya W., Shimizu N., Suzuki T., Yamada M., Rhoads R. P. Jr., Ikeuchi Y., Allen R. E., Possible implication of satellite cells in regenerative

- motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 297, C238-C252 (2009)
- Do M.-K. Q., Sato Y., Shimizu N., Suzuki T., Shono J.-I., Mizunoya W., Nakamura M., Ikeuchi Y., Anderson J. E., Tatsumi R., Growth factor regulation of neural chemorepellent Sema3A expression in satellite cell cultures, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 301, C1270-C1279 (2011)
- 3) Suzuki T., Do M.-K. Q., Sato Y., Ojima K., Hara M., Mizunoya W., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Anderson J. E., Tatsumi R., Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and edl muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression, *Int. J. Biochem.* Cell Biol. 45, 476-482 (2013)
- 4) Sakaguchi S., Shono J.-I., Suzuki T., Sawano S., Anderson J. E., Do M.-K. Q., Ohtsubo H., Mizunoya W., Sato Y., Nakamura M., Furuse M., Yamada K., Ikeuchi Y., Tatsumi R., Implication of antiinflammatory macrophages in regenerative motoneuritogenesis: promotion of myoblast migration and neural chemorepellent semaphorin 3A expression in injured muscle, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 54, 272-285 (2014)
- 5) Tatsumi R., Suzuki T., Do M.-K. Q., Ohya Y., Anderson J. E., Sibata A., Kawaguchi M., Ohya S., Ohtsubo H., Mizunoya W., Sawano S., Komiya Y., Ichitsubo R., Ojima K., Nishimatsu S.-I., Nohno T., Ohsawa Y., Sunada Y., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Nishimura T., Yagi T., Allen R. E., Slowmyofiber commitment by semaphorin 3A secreted from myogenic stem cells, Stem Cells, 35, 1815-1834 (2017)
- Buller A. J., Eccles J. C., Eccles R. M., Controlled differentiation of muscle, *J. Physiol*. (Proceedings of the Physiological Society, 31 May 1958) 143, 23-24 (1958)
- Buller A. J., Eccles J. C., Eccles R.M. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb, *J. Physiol.* 150, 399-416 (1960a)
- Buller A. J., Eccles J. C., Eccles R. M., Interactions between motoneurones and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses, *J. Physiol*. 150, 417-439 (1960b)
- 9) Salmons S., Vrbová G., The influence of activity of

- some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles, *J. Physiol.* **201**, 535-549 (1969)
- 10) Sréter F. A., Gergely J., Salmons S., Romanul F., Synthesis of fast muscle myosin light chains characteristic of slow muscle in response to long term stimulation, *Nat. New Biol.*, 241, 17-19 (1973)
- 11) Lin J., Wu H., Tarr P. T., Zhang C. Y., Wu Z., Boss O., Michael L. F., Puigserver P., Isotani E., Olson E. N., Lowell B. B., Bassel-Duby R., Spiegelman B. M., Transcriptional co-activator PGC-1 a drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, 418, 797-801 (2002)
- 12) Luquet S., Lopez-Soriano J., Holst D., Fredenrich A., Melki J., Rassoulzadegan M., Grimaldi P. A., Peroxisome proliferator-activated receptor δ controls muscle development and oxidative capability, FASEB J., 17, 2299-2301 (2003)
- 13) Wang Y. X., Zhang C. L., Yu R. T., Cho H. K., Nelson M. C., Bayuga-Ocampo R., Ham J., Kang H., Evans R. M., Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ, PLoS Biol., 2, e294 (2004); erratum in PLoS Biol., 3, e61 (2005)
- 14) Lin J., Handschin C., Spiegelman B. M., Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators, *Cell Metab.*, 1, 361-370 (2005)
- 15) Ahn B.-H., Kim H.-S., Song S., Lee I. H., Liu J.,

- Vassilopoulos A., Deng C.-X., Finkel T., A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 14447-14452 (2008)
- 16) Ehrenborg E., Krook A., Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor δ , *Pharmacol. Rev.*, **61**, 373-393 (2009)
- 17) Gan Z., Rumsey J., Hazen B. C., Lai L., Leone T. C., Vega R. B., Xie H., Conley K. E., Auwerx J., Smith S. R., Olson E. N., Kralli A., Kelly D. P., Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism, *J. Clin. Invest.*, 123, 2564-2575 (2013)
- Allen R. E., Temm-Grove C. J., Sheehan S. M., Rice G., Skeletal muscle satellite cell cultures, *Methods Cell Biol.*, 52, 155-176 (1997)
- 19) Iwata A., Fuchioka S., Hiraoka K., Masuhara M., Kami K., Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles, *Muscle Nerve*, 41, 694-701 (2010)
- 20) Mizunoya W., Wakamatsu J.-I., Tatsumi R., Ikeuchi, Y., Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system, *Anal. Biochem.*, 377, 111-113 (2008)