

博士論文

紅茶由来高分子ポリフェノール分画が

骨格筋にもたらす生理作用

令和元年度

筑波大学大学院人間総合科学研究科体育科学専攻

青木祐樹

## 目次

第一章 緒言 .....	1
第二章 先行研究 .....	6
2.1 骨格筋の線維タイプ .....	6
2.2 骨格筋の量を正に制御する分子 .....	8
2.3 骨格筋の量を負に制御する分子 .....	9
2.4 骨格筋に対するお茶由来ポリフェノールの効果 .....	11
2.5 紅茶由来高分子ポリフェノール分画 .....	12
第三章 研究課題設定までの予備検討 .....	25
3.1 除神経を行った骨格筋に対する E80 の効果 .....	25
3.2 代償性過負荷による筋肥大に与える E80 の効果の予備検討	36
第四章 研究課題の設定 .....	42
4.1 研究課題構成 .....	42
4.2 研究課題 1 .....	42
4.3 研究課題 2 .....	43
4.4 研究の限界 .....	43
第五章 紅茶由来ポリフェノールがマウスの代償性筋肥大に与える影 響の検討 (研究課題 1) .....	45
5.1 緒言 .....	45
5.2 方法 .....	46
実験動物 .....	46
紅茶由来ポリフェノール .....	47

飼料 .....	47
共働筋切除手術 .....	47
サンプリング .....	47
ウエスタンプロット解析 .....	48
筋線維横断面積解析 .....	48
統計処理 .....	49
5.3 結果 .....	49
E80 が体重および摂餌量に与える影響 .....	49
筋湿重量及び筋線維横断面積 .....	52
ウエスタンプロット .....	56
5.4 考察 .....	58
第六章 紅茶由来ポリフェノールがマウスでの後肢懸垂による筋萎縮 あるいは再接地による筋量回復に与える影響の検討 (研究課題 2)	62
6.1 緒言 .....	62
6.2 方法 .....	64
実験動物 .....	64
紅茶由来ポリフェノール .....	65
飼料 .....	65
後肢懸垂及び再接地 .....	65
サンプリング .....	65
ウエスタンプロット解析 .....	66
筋線維横断面積解析 .....	66

統計処理.....	67
6.3 結果 .....	67
E80 が体重および摂餌量に与える影響 .....	67
筋湿重量及び筋線維横断面積 .....	69
ウエスタンプロット .....	73
6.4 考察 .....	75
第七章 総合討議 .....	78
第八章 結論 .....	86
謝辞 .....	87
参考文献 .....	88

## Abbreviations

4E-BP1	...	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
AMPK	...	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
AOP	...	Artificially oxidized polyphenol
ATP	...	Adenosine triphosphate
CSA	...	Cross sectional area
Den	...	Denervation
EAA	...	Essential amino acids
EGC	...	Epigallocatechin
EGCG	...	Epigallocatechin gallate
eIF2	...	Eukaryotic Initiation Factor 2
eIF2B	...	Eukaryotic Initiation Factor 2B
eIF4E	...	Eukaryotic Initiation Factor 4E
FDA	...	Food and drug administration
FoxO	...	Forkhead box O
GSK3 $\beta$	...	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HU	...	Hindlimb unloading
IGF	...	Insulin-like growth factor
IL6	...	Interleukin 6
MAF	...	Mitochondria activation factor
MAFbx	...	Muscle atrophy F-Box protein
mRNA	...	Messenger ribonucleic acid
mTOR	...	Mammalian target of rapamycin

mTORC	...	Mammalian target of rapamycin complex
Murf1	...	Muscle RING-Finger Protein-1
OV	...	Overload
PGC-1 $\alpha$	...	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	...	Phosphoinositide 3-kinase
PVDF	...	Polyvinylidene difluoride
qPCR	...	Quantitative polymerase chain reaction
RE	...	Reloading
S6	...	Ribosomal protein S6
S6K	...	Ribosomal protein S6 kinase
TCA	...	Tricarboxylic acid cycle
TGFbeta	...	Transforming growth factor beta
TNFalpha	...	Tumor necrosis factor alpha

## 用語解説

### ATP

アデノシン三リン酸 (Adenosine TriPhosphate) 。全ての生物が、生命活動を行う上で利用するエネルギー源。物質の合成・分解・移動等あらゆる生命活動には ATP が必須である。また、非常に不安定な物質であり、微量しか細胞内に貯蔵できず、循環系や近接細胞からの輸送もできないため、常に生産する必要がある。骨格筋においては、収縮する際に大量の ATP が消費される。

### QOL

Quality of Life。人生の質や生活の質などと訳され、人間が生活する上での満足度をあらわす指標のひとつ。

### q-PCR

Quantitative Polymerase Chain Reaction。DNA や mRNA の総量を間接的に定量する手法。迅速性と定量性に優れている。

### Ubiquitin ligase

Ubiquitin・Proteasome 系において、特異的にタンパク質を認識し、分解に導くという重要な役割を担っている。哺乳類では数百種類存在する。Ubiquitin ligase によって Ubiquitin が付与されたタンパク質は、Proteasome によって分解される。

### ウェスタンブロット

ウエスタンブロット (Western Blot) とは、抗体反応を用いてタンパク質量を定量する手法である。特定のタンパク質を認識・標識する抗原・抗体反応を利用し、目的のタンパク質の量を測定できる。特に、リン酸化されたタンパク質の定量には必須の手法である。

## **カテキン**

カテキンは、お茶に含まれるポリフェノール的一种で、お茶の渋み成分の一つ。ポリフェノールの内フラボノイドのフラバノールに分類される。

## **シグナル伝達**

生物は様々環境や刺激に適応する必要があるが、生物の構成要素である細胞は直接会話する術を持たない。そこで、細胞や組織間で情報をやり取りするシステムの一つにシグナル伝達が存在する。一般的に、細胞膜上の受容体にホルモンなどの細胞外シグナル分子 (リガンド) が結合し、細胞内の下流因子が次々にシグナルを受け渡し、細胞の適応を調節する。タンパク質のリン酸化は代表的な細胞内シグナルの一つである。

## **タンパク質合成**

遺伝子の情報が mRNA として転写され、リボソームという細胞内小器官でアミノ酸が結合され、タンパク質が合成される。タンパク質合成は、シグナル伝達などで増減が制御されており、代表的なタンパク質合成促進シグナルとして、mTOR シグナルが挙げられる。

## **タンパク質分解**



タンパク質をアミノ酸まで分解する機構が存在し、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系に分けられる。骨格筋ではユビキチン-プロテアソーム系が、その増減に大きな影響を与えている。

### **ポリフェノール**

あらゆる植物に存在する苦味や色素成分。その構造の違いにより、フラボノイド、フェノール酸、エラグ酸、リグナン、クルクミン、クマリンなど、様々な種類に分類され、数千種類存在する。カテキンはフラボノイドのフラバンに属する。

### **ポリフェノールオキシダーゼ**

植物細胞内に存在する、ポリフェノールを酸化する酵素。果物を切り時間が経つと表面の色が変化するのは、ポリフェノールオキシダーゼの作用でポリフェノールが酸化されるためである。

### **ミトコンドリア**

真核生物に存在する細胞内小器官である。二重の生体膜からなり、独自の DNA を持ち、ATP 合成の要となっている。ATP 産生以外にも、細胞内カルシウムイオン濃度の調節や免疫反応においても重要な働きをしている。

### **呼吸商**

一定時間において生体内で、栄養素が分解されて ATP に変換するまでの酸素消費量に対する二酸化炭素排出量の体積比。

## 第一章 緒言

骨格筋は随意運動を実行できる唯一の組織であり、身体活動を行う上で必要不可欠な組織である。骨格筋の特徴的な性質として、運動などの外部刺激や内分泌系等の内部刺激によって、その質や量が大きく変化することが挙げられる。運動は骨格筋の質や量を大きく変化させることができ、その目的により運動様式は異なる。長距離走などの持久的トレーニングは骨格筋での脂質代謝を亢進させ、筋繊維の遅筋化をもたらす。高強度間欠的運動は骨格筋内での糖代謝やクエン酸回路などのエネルギー代謝系を亢進する。ウェイトトレーニング等のレジスタンストレーニングは骨格筋の肥大を促進する。生体内の様々な分子メカニズムがこうした適応現象を引き起こす。スポーツの競技力向上のために、競技特性にあわせたトレーニングが必要不可欠であるが、目的の成果を達成するためにはそうした分子メカニズムの理解が大変重要である。骨格筋の適応現象を引き起こす分子メカニズムを探る研究は多数実行されてきたが、未だ不明な点が多いのが現状である。

骨格筋の機能や量を増加させる上で、トレーニングだけではなく摂取する栄養も考慮することは非常に有益である。例えば、ヒトにおいて、必須アミノ酸混合物 (EAA) をレジスタンスエクササイズ後に摂取すると、筋内でのタンパク質合成が高められることが報告されている<sup>1,2</sup>。また、ヒトが運動前にタンパク質と炭水化物を摂取すると、炭水化物だけの群に比べ、自転車運動での疲労困憊までの時間が延長さ

れたとの報告もある<sup>3</sup>。さらに、ライチのポリフェノール抽出物が最大酸素摂取量を増加させる<sup>4</sup>、チョークベリー抽出物が運動後の酸化ストレスを軽減するなどの報告も存在する<sup>5</sup>。当然ながら普段からバランスの取れた食事をとった前提での話となるが、これらの事実は、トレーニングに合わせた栄養を摂取、補填することで、パフォーマンスやトレーニング効果が增强されることを意味するものである。

近年、新たなサプリメント候補としてお茶に含まれるポリフェノールが大変注目されている。お茶は *Camelia sinensis* という、ツバキ科ツバキ属の葉から作られ、その発酵度合いにより緑茶、ウーロン茶、紅茶に分けられる。お茶の葉にはポリフェノールオキシダーゼと呼ばれる酸化酵素があり、お茶に含まれるポリフェノールを酸化させる働きがある。このポリフェノールオキシダーゼがポリフェノールを酸化する過程が発酵であるが、通常、酸化酵素とポリフェノールは別々に存在している。茶葉を揉む、あるいは萎れさせることで両者が混ざり合い、酸化酵素の働きが促進され、ポリフェノールの酸化に伴い茶葉の色が徐々に変化していく。まったく茶葉を発酵させない状態のお茶が緑茶で、カテキンが多く含まれるが、空気中の酸素に酸化されエピガロカテキン (epigallocatechin : EGC) やエピガロカテキンガレート (epigallocatechin gallate : EGCG) となり、これらは緑茶カテキンと呼ばれる。また、発酵が進むと緑茶カテキンはウーロン茶に多く含まれるウーロンテアニンや紅茶に多く含まれるテアフラビンに酸化される。

緑茶カテキンは非常に研究が進んでおり、PubMed で検索すれば様々種類の研究報告がみられる。しかしながら、紅茶由来のポリフェノールに関する報告は少なく、特に骨格筋と関連した報告は緑茶カテキンと比べ顕著に少ないのが現状である。例えば本論文執筆時点で「"green tea" "skeletal muscle"」と PubMed で検索すると 56 件表示されるが、「"black tea" "skeletal muscle"」では 7 件程である。勿論これは検索の一例であり、上記の研究規模すべてが反映されたものではない。しかし、紅茶由来ポリフェノールの研究報告の少なさを示唆しているものと考えられる。

運動生理学の観点から、骨格筋の適応は ATP 産生などの代謝にかかわるものと、肥大や萎縮などの量的変化にかかわるものの 2 つに大別できると考えられる。紅茶由来ポリフェノールが、骨格筋の量的変化に対して与える影響は現在検証されていない。著者が学士課程、修士課程で在籍していた、筑波大学生命環境系沼田治研究室では、世界で唯一紅茶高分子ポリフェノールに着目した研究が行われていた。そこでの先行研究において、紅茶高分子ポリフェノール分画が骨格筋培養細胞の ATP 含有量やミトコンドリア膜電位、またマウスの持久能力向上を促進することが確認されていた。しかし、これらで使用された高分子ポリフェノール分画の抽出には有機溶媒を使用することから、この分画をヒトが摂取するサプリメントへ応用することは困難と思われた。そこで、有機溶媒を使用せずに高分子ポリフェノール分画を水と 80%エタノールで抽出した"E80"というものが考案、作成された。さ

らに、E80 は培養細胞で筋肥大抑制遺伝子である Myostatin の転写活性を抑制することが見いだされた。この事実から、高分子ポリフェノール分画 E80 が骨格筋の量に大きな影響を与える可能性が考えられ、著者の修士課程研究においてその効果を検証した。

まず、予備検討として、Myostatin の活性化が起こる除神経という筋萎縮系モデル実験において、E80 が除神経による廃用性筋萎縮を抑制するかマウスで検討を行った。結果として、E80 の投与により筋萎縮の抑制は出来なかった。また、培養細胞で観察されたように、Myostatin の転写活性の抑制効果も確認されなかった。しかしながら、詳細な機序は不明であるが、炎症性サイトカインの一つである IL6 が、E80 の投与により顕著に抑制されていた。先行研究において IL6 のノックアウトマウスを使った研究で、代償性過負荷という筋肥大系モデル実験において筋肥大が促進することが報告されていた[white]。そこで、E80 は IL6 の抑制を介して代償性過負荷による筋肥大を促進するのではないかと考え、二つ目の予備検討として、代償性過負荷による筋肥大にもたらず E80 の検討をマウスで行った。この実験から、E80 の投与で代償性過負荷による筋肥大が促進されること、代表的な筋肥大シグナルである mTOR シグナルが活性化されることが確認された。以上の予備検討から、E80 は筋量の増加促進効果を有することが示唆された。

本研究では、高分子ポリフェノール分画が骨格筋にもたらず、量的変化への影響を検討すると共に、その過程で起こる分子メカニズムの

解析を行う。

## 第二章 先行研究

### 2.1 骨格筋の線維タイプ

骨格筋は哺乳類の全体重の約 40%を構成し、成人の安静時における代謝の約 30%を占めると言われる<sup>6</sup>。そのため、骨格筋は血糖調整（摂取した糖の内、最大で約 8 割近くを吸収する）や代謝恒常性に重要な役割を果たしている組織である<sup>7</sup>。

骨格筋は多数の筋線維から構成され、筋線維はその収縮特性に基づいて、遅筋線維または速筋線維に分類される<sup>8</sup>。この分類は、筋原線維の太いフィラメントを構成するミオシン重鎖の違いで、タイプ I (遅筋) およびタイプ II (速筋) に大別される。タイプ II 線維はさらにタイプ I との間中型である IIa 型、IIa よりも速筋型である IIx 型、最も収縮速度が速い IIb 型に分けられる。これらの筋線維は、タイプ I は赤く、タイプ IIx や IIb は白色、タイプ IIa の線維はそれらの中間的な色合いをしている。この色の違いは、骨格筋内で酸素貯蔵を担っているミオグロビンタンパク質の量により規定され、ミオグロビンが多いほど赤色を呈す。

筋線維タイプの組成は、競技特性やその経験年数などで大きく異なることが報告されている。一般的な人は、速筋（タイプ IIA および IIX）と遅筋（タイプ I）が約 50/50 の比率であることが報告されている<sup>9</sup>。一方で、長距離および中距離ランナーは筋線維の 60~70%がタイプ I で、反対にスプリンターは 80%が速筋であると言われる。さら

に、一流のパワーリフターやウェイトリフターは、60%が速筋線維であることが報告されている<sup>10</sup>。これらの組成の違いは、筋線維タイプがトレーニングにより変化することに起因している。一般的に、持久的なトレーニングによりタイプ I 線維の割合が、レジスタンストレーニングによりタイプ II a の割合が主に増加する。タイプ I や II a 線維は、持久能力（収縮を持続できる能力）が高く、酸化的筋線維とも呼ばれ、また、タイプ II a 線維は一般人にくらべアスリートに顕著に多いため、アスリートの線維とも呼ばれる。

トレーニングにより筋線維組成が変化するが、前述の通り増加するのは酸化的筋線維であるタイプ I 及び II a 線維の割合のみである。II a や II b などの速筋は、トレーニングによりその割合は増加しない。ただし、遺伝子操作以外で、クレンブテロールという薬剤の投与は、筋線維の白筋化と筋肥大を促進することが知られており、これはドーピング薬にも指定されている。また、ベッドレストなどの徐負荷により一時的に筋線維が白筋化する。しかし、全筋量は減少するので、この白筋化は最大筋力や瞬発的な筋力発揮などのパフォーマンスの向上には寄与しない。

筋線維タイプの移行に関して、タイプ I へ移行するいわゆる遅筋化についてはよく研究が進んでいる。持続的な筋活動に伴う細胞内エネルギー消費と需要の増大により、AMPK が活性化しその下流の PGC-1 $\alpha$  の発現を高める。PGC-1 $\alpha$  は遅筋化のマスター遺伝子と考えられ、この遺伝子を過剰発現したマウスは全身の筋肉が遅筋化する<sup>11</sup>。運動



様式に関わらず、運動を行うと筋細胞におけるエネルギー消費と需要の増大が起こり、AMPKの活性化が起こる。そのため、運動の様式に関わらず筋線維タイプの遅筋化は容易に起こることが想像に難くない。しかしながら、筋線維の白筋化については殆ど研究が進んでおらず、トレーニングによる白筋化現象は現時点では証明されていない。

## 2.2 骨格筋の量を正に制御する分子

骨格筋は外部刺激に対して、代謝などの質的变化、筋肥大等の量的変化が起こりやすい<sup>12</sup>。レジスタンストレーニングは骨格筋に対して、大きな量的変化（筋肥大）をもたらす代表的なトレーニングである。骨格筋の量は、筋の重量や筋線維の横断面積で規定されるが、それらの増減は骨格筋内でのタンパク質の合成と分解のバランスにより制御される<sup>13</sup>。骨格筋内でのタンパク質合成が高まると筋は肥大し、逆にタンパク質分解が高まると筋は萎縮する。

タンパク質の合成を制御している代表的な因子はAkt-mTORシグナルである<sup>13</sup>。Akt-mTORシグナルは、上流のIGFなどの成長因子が筋線維上の受容体に結合すると、PI3Kがリン酸化されAktがリン酸化される（活性化する）(Figure 1)。Aktの標的のひとつであるmTORがAktによりリン酸化されると、複合体を形成し活性化する。さらに、mTORの標的となっているS6Kや4E-BP1がmTOR複合体によりリン酸化されると、さらにその下流のribosomal protein S6

(S6) や eIF-4E が活性化し、タンパク質合成が促進する。また、Akt は GSK3 $\beta$  の活性化を制御しタンパク質合成に影響を与えている<sup>13</sup>。Akt や mTOR は骨格筋以外でも普遍的に存在し、タンパク質合成に与える影響は甚大である。これらのタンパク質を KO されたマウスは胚発生が進まず、胎生致死となる<sup>14,15</sup>。

また、先述の mTOR 複合体は二種類存在し、それぞれ mTORC1 と mTORC2 と呼ばれているが、筋肥大には mTORC1 の影響が大きいと考えられている。その証拠として、筋特異的に mTORC1 の構成要素である raptor を KO されたマウスは mTORC2 の構成要素である rictor を KO されたマウスに比べ、著しく成長が阻害され、寿命も縮む<sup>16</sup>。一方、rictor を KO されたマウスはコントロール群と比べ、さほど成長は阻害されない<sup>16</sup>。

## 2.3 骨格筋の量を負に制御する分子

骨格筋はベッドレストや宇宙での滞在などの不活動や徐負荷によって、急速に萎縮を引き起こす。人間でも 10 日間以上のベッドレストで、一日あたり 0.5-0.6% の筋萎縮を引き起こすと考えられている<sup>17</sup>。骨格筋の量を制負に御している代表的な因子としては Smad2/3 シグナルが代表的である<sup>18</sup>。Smad2/3 は Myostatin などの TGF ファミリーリガンドが受容体に結合し、活性化されることで核内に移行して、標的遺伝子の転写を制御する<sup>19</sup> (Figure 1)。骨格筋において、Smad2/3 を活性化する代表的な TGF ファミリーは Myostatin である。

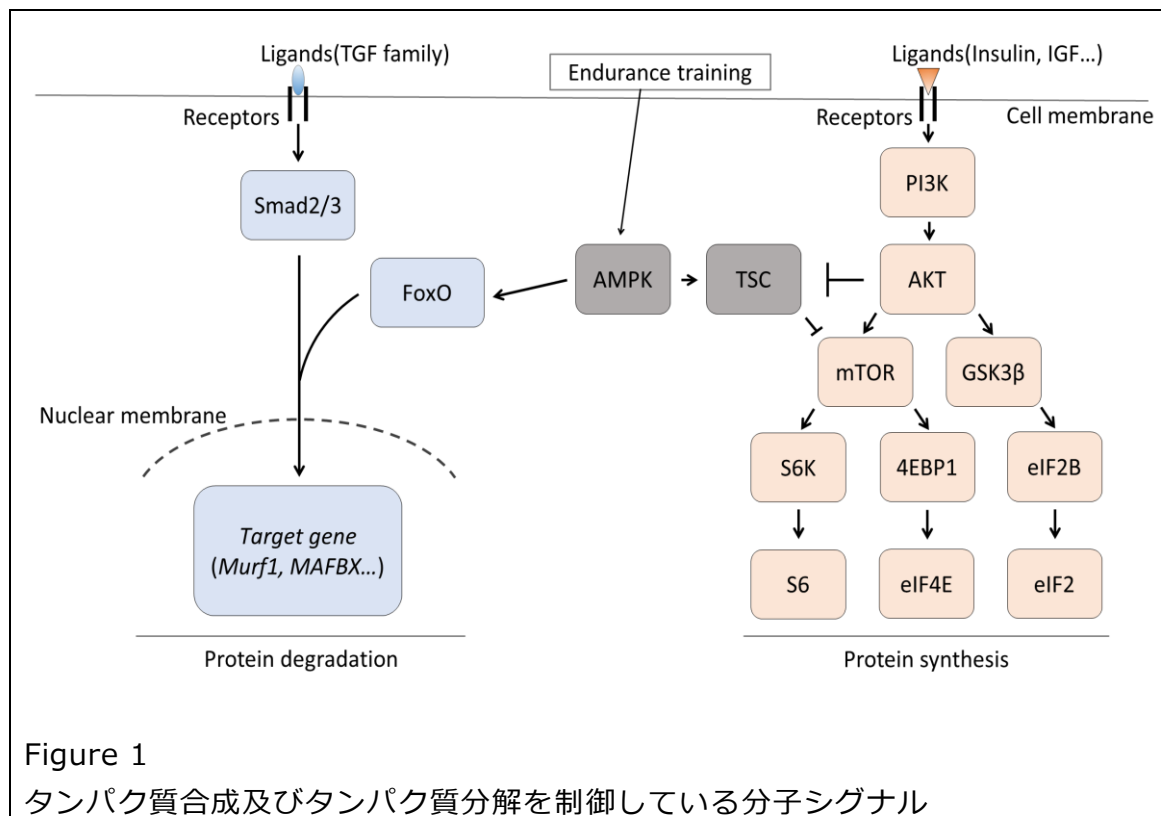
Myostatin を過剰発現すると、著しい筋萎縮がおこる<sup>20</sup>。他方で、Myostatin と拮抗的に働く Follistatin を過剰発現し、Myostatin の機能を阻害されたマウスの骨格筋は顕著な筋肥大を起こす<sup>21</sup>。Smad2/3 を KO されたマウスは、骨格筋に著しい萎縮を起こす除神経実験において、骨格筋の萎縮を起こさない<sup>22</sup>。

Smad2/3 と協調的に働き、筋萎縮に大きな影響を与えている因子として FoxO が挙げられる<sup>23</sup> (Figure 1)。FoxO が過剰発現されたマウスは骨格筋量がコントロール群に比べ減少する<sup>24</sup>。FoxO は核内へ移行することで下流の遺伝子を制御している<sup>25</sup>。骨格筋の量が定常状態や肥大の刺激を受けている間は、Akt によりリン酸化制御を受け核内への移行を抑制されているが、萎縮時など Akt からのリン酸化が弱まると活性化し、FoxO は核内に移行することで、下流の遺伝子の転写を活性化させる<sup>25</sup>。

Smad2/3 や FoxO が活性化し、最終的に筋萎縮を制御しているのは E3 ubiquitin ligase と呼ばれるタンパク質である。骨格筋では特に、筋特異的な E3 ubiquitin ligase である Murf1 と MAFbx/Atrogin-1 が有名である (Figure 1)。Murf1 を遺伝的に消去したマウスでは、後肢懸垂による筋萎縮が抑制され、MAFbx を消去したマウスでは徐神経による筋萎縮が抑制される<sup>26,27</sup>。

また、骨格筋のエネルギー代謝の亢進において必要不可欠な AMPK も骨格筋の萎縮に関与している。AMPK は主に持久性運動で活性化されるが、FoxO のリン酸化とその活性に関わっている<sup>28</sup>。また、AMPK

を不活化させると、マウスにおける後肢懸垂による筋萎縮を軽減することが報告されている<sup>29</sup>。



## 2.4 骨格筋に対するお茶由来ポリフェノールの効果

お茶とは一般的にチャノキ (*Camellia sinensis*) の葉や茎を摘み取り、加工して作られる飲料である。アジアでの歴史は古く、4000年前から利用されていると考えられている<sup>30</sup>。お茶には様々な有効成分が含まれているが、近年カテキンなどのフラバノールと呼ばれるポリフェノールが注目されている。お茶は発酵度合いにより緑茶、ウーロン茶、紅茶に大別され、含まれるポリフェノールも異なる。これら

のお茶の中でも緑茶に多く含まれるポリフェノールについては、多数の有益な効果を示す報告がなされている<sup>31</sup>。効果の具体例として、緑茶抽出物や緑茶に多く含まれる Epigallocatechin gallate (EGCG) の摂取により、体重および/または脂肪組織の増加が大幅に減少し、血糖値またはインスリンレベルが低下し、インスリン感受性または耐糖能が増加するという報告が多数なされている<sup>31</sup>。一方、紅茶抽出物や紅茶ポリフェノールの報告は多くない。これは、紅茶に含まれるポリフェノールである、テアフラビンが経口摂取ではほとんど吸収されないことが考えられる<sup>32,33</sup>。しかしながら、近年紅茶あるいは紅茶由来ポリフェノールが骨格筋での有益な効果をもたらすことが報告されている。Naoto Kudo らはテアフラビンの経口摂取によりマウス骨格筋で AMPK が活性化することを、Tomoaki Eguchi らは紅茶由来高分子ポリフェノール分画がマウスの持久能力を向上させることを発見した<sup>34,35</sup>。これらの報告は紅茶由来ポリフェノールが骨格筋に作用し、何らかの効果をもたらすこと示唆するものであると考えられる。

## 2.5 紅茶由来高分子ポリフェノール分画

著者が学群、修士課程で所属していた、筑波大学生命環境系沼田治教授の研究室（以下、沼田研究室）では紅茶から抽出した高分子ポリフェノール分画を用いた研究を行っている。著者が在籍していた時点で、高分子ポリフェノール分画の研究は生命環境系沼田研究室でしか行っておらず、先行研究は限られていた。そのため、沼田研究室で行

われた研究の結果について、いくつか紹介する。

沼田研究室で高分子ポリフェノール分画に着目するようになったきっかけは、ウーロン茶に含まれるポリフェノールの摂取で、ヒトの呼吸商が下がるという現象が報告されたことである<sup>36</sup>。呼吸商とは、ある期間の間で、生体内で三大エネルギー基質であるグルコース、タンパク質、脂肪酸が基質として分解されて ATP に変換される過程において、酸素消費量に対する二酸化炭素排出量の理論上の割合のことである。呼吸商はグルコース、脂肪酸、タンパク質の基質それぞれで決まっており、以下のような値となっている (Table 1)<sup>37</sup>。

Table 1 基質 1g あたりの酸素及び二酸化炭素発生・消費量

基質	酸素消費量 (L)	二酸化炭素排出量 (L)	呼吸商
グルコース	0.75	0.75	1.0
脂肪酸	2.03	1.43	0.7
タンパク質	0.95	0.76	0.8

ヒト含めた哺乳類は炭素固定を行わないため、理論上の呼吸商最大値は 1 である。つまり、すべてのエネルギー (ATP) の産出に糖質を使用すれば、呼吸商は 1 で最大となる。安静時において呼吸商が下がることが意味するのは、ATP を産生する過程で使用される基質において、糖質の他に脂質あるいはタンパク質の割合が増加したことを意味する。通常、タンパク質は ATP 産生にあまり利用されていないと考え

られているため、呼吸商が下がると脂質の割合が増加したと推定できる。脂質から直接 ATP が産出されるのではなく、いくつかの過程を経て、ATP が産出される (Figure 2) 。まず、脂質はグリセリンと脂肪酸 (Fatty acid) に分解される。血液中に放出された脂肪酸 (遊離脂肪酸) は肝臓や骨格筋などの細胞内に吸収される。細胞内の脂肪酸は、細胞質で活性化されて脂肪酸-Acyl-CoA (Fatty acid-Acyl-CoA) になり、一端、カルニチンと結合し脂肪酸-Acyl-カルニチン (Fatty acid-Acyl-CoA-Carnitine) となりミトコンドリアのマトリックス内に取り込まれる。ミトコンドリアのマトリックス内で再び、脂肪酸-Acyl-CoA に変化する。脂肪酸-Acyl-CoA はミトコンドリア内において三つの代謝過程を経て代謝される。第一段階では、末端のカルボキシル基炭素 (C1) の次の炭素 (C2 =  $\alpha$ 炭素) とさらに次の炭素 (C3 =  $\beta$ 炭素) の間で炭素鎖が切断され、2 個の炭素で構成される Acetyl-CoA が生成される<sup>38</sup>。この過程は $\beta$ 酸化と呼ばれ、脂肪酸-Acyl-CoA から炭素鎖がなくなるまで行われる。第二段階は Acetyl-CoA はクエン酸回路 (tricarboxylic acid cycle: TCA) に送られ二酸化炭素まで酸化され、第三段階では $\beta$ 酸化と TCA で生成された電子が呼吸鎖で電子伝達され、ATP が生成されることになる。この $\beta$ 酸化以降の過程では、糖質代謝に比べ多くの酸素が消費されるため、脂質を多く使うと呼吸商が下がる。また、脂肪酸が細胞内に運ばれ、 $\beta$ 酸化以降で ATP が産生されるまでの反応は、すべてミトコンドリア内部で進行する<sup>39</sup>。以上の理由から、ウーロン茶由来のポリフェノー

ル分画がヒトの呼吸商を下げた理由の一つとして、ミトコンドリアでの脂質代謝が活性化したのではないかと推察された。

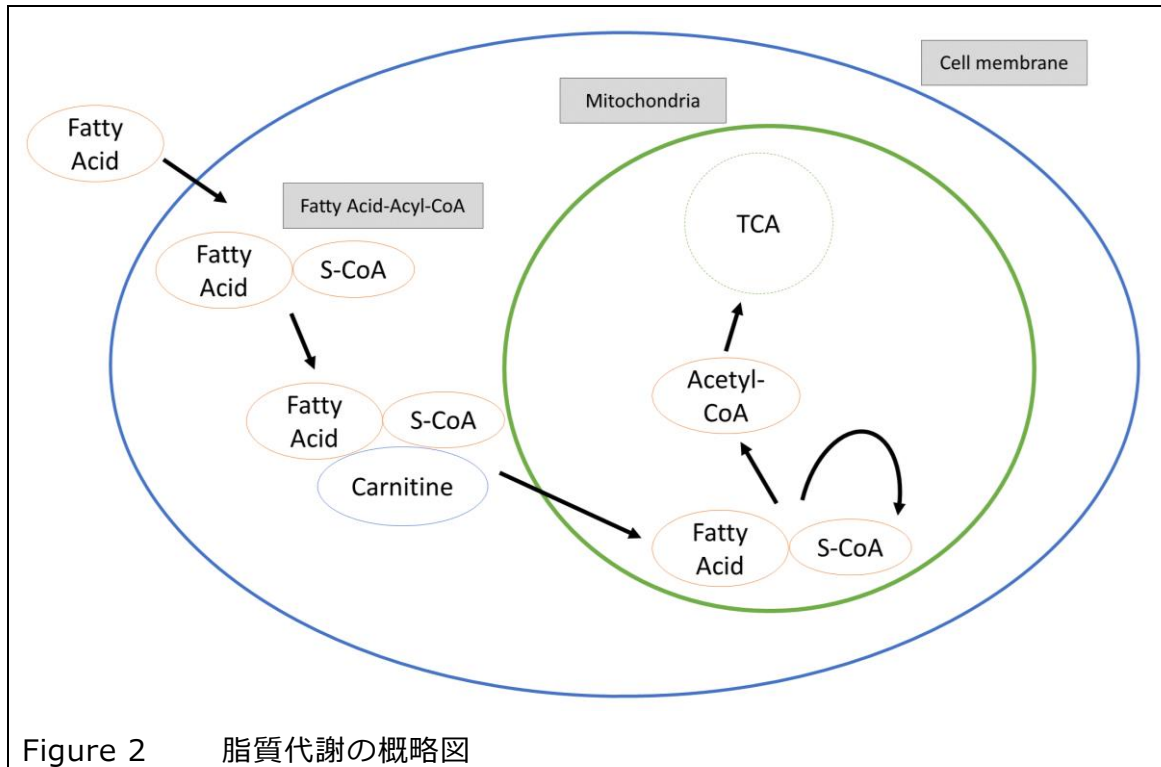


Figure 2 脂質代謝の概略図

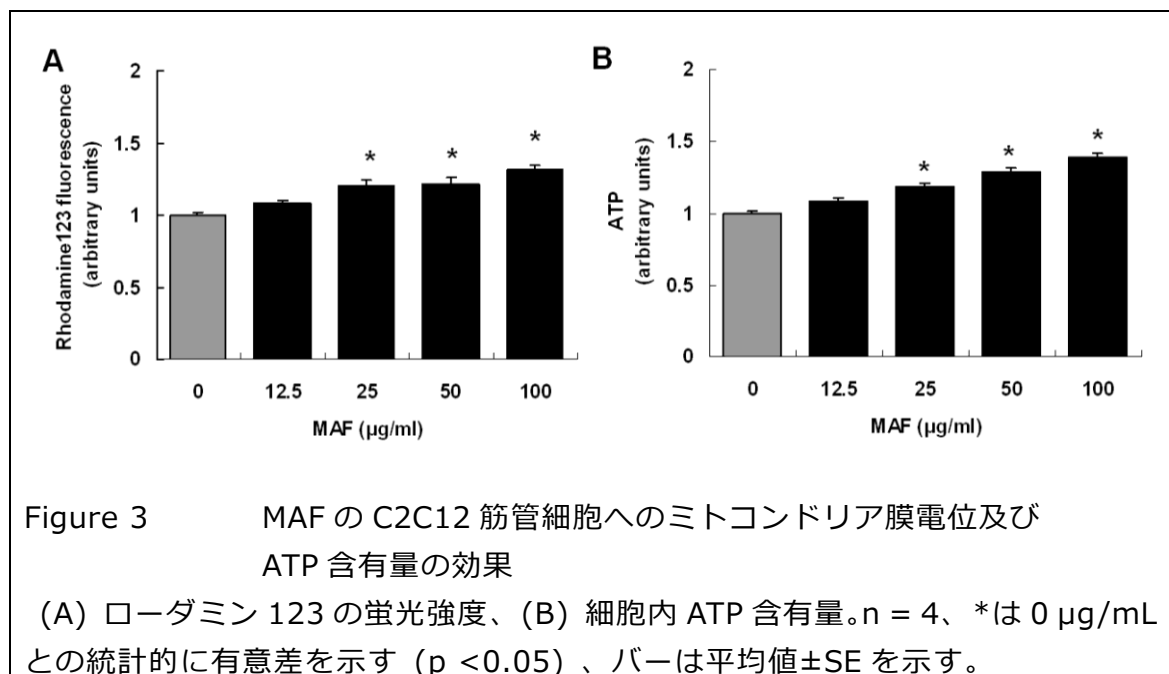
次に、沼田研究室の Takashi Fujihara らはウーロン茶や紅茶などの発酵茶から抽出したポリフェノールがミトコンドリアの機能に影響を及ぼすかについて、テトラヒメナという単細胞の原生生物である繊毛虫の一種を用いて検証を行った<sup>40</sup>。テトラヒメナは Thomas Cech と Sidney Altman が 1989 年にノーベル賞を受賞した Ribozyme の発見に使用するなど、分子生物学分野では非常によく用いられるモデル生物である。完全合成培地で無菌的に飼育が可能で、外界の変化にも強い耐性を持つので、未知の物質の検定には適していると考えられる。この検証では、ウーロン茶と紅茶に含まれるポリフェノールを幾つか



の分画に分類し、それぞれの分画をテトラヒメナの培地に加え、ミトコンドリア機能活性化の指標の一つである膜電位の上昇をローダミン123で計測した。ミトコンドリア膜電位はそのポテンシャルエネルギーが高いほど、ATPの産生能力が高いことが知られている<sup>41</sup>。この検証で、テトラヒメナのミトコンドリア膜電位を最も上昇させたウーロン茶及び紅茶のポリフェノール分画の特性を調べると、分子量が9,000~18,000の高分子ポリフェノール分画であることが判明した。この高分子ポリフェノール分画は代表的な緑茶カテキンであるEGCやEGCGなどに比べ、3倍近くテトラヒメナのミトコンドリア膜電位を上昇させた。この実験ではテトラヒメナという原生生物を使用した。ミトコンドリアはすべての生物でATP産生の重要な役を担っている。また、ミトコンドリア膜電位はATP産生の要である電子伝達系の活性指標でもあり、膜電位の上昇はATP産生に極めて重要である。電子伝達系を特異的に阻害する薬品としてシアン化水素、いわゆる青酸カリという猛毒が有名である<sup>42</sup>。電子伝達系は遮断させるとあらゆる生物で生命活動が困難になるほど、重要な機構である。以上のことは、発酵茶由来の高分子ポリフェノール分画が、他の生物でもミトコンドリアの機能を改善させるうる事が示された結果であると考えられる。また、発酵茶から抽出された分子量が9,000~18,000の高分子ポリフェノール分画は、ミトコンドリアの活性を高めることから Mitochondria Activation Factor (MAF) と名付けられた。

次に、骨格筋培養細胞 (C2C12) で、MAFが動物細胞に及ぼす効果

が熊谷によって検証された。熊谷は、C2C12 が分化した状態である筋管に MAF を投与し、ローダミン 123 によるミトコンドリア膜電位及び ATP 含有量を計測した。実験プロセスとして、分化誘導一週間後、筋管を形成した C2C12 を、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度になるように MAF を溶解した培地で 4 時間インキュベーションを行った。結果は Figure 3 に示す。



MAF を処理することで、濃度依存的にミトコンドリアの膜電位及び ATP 含有量が増加する結果となった。これは、MAF がテトラヒメナという原生生物のみならず哺乳類の骨格筋培養細胞まで、幅広い生物のミトコンドリアの機能を向上させる可能性があることを示唆している。

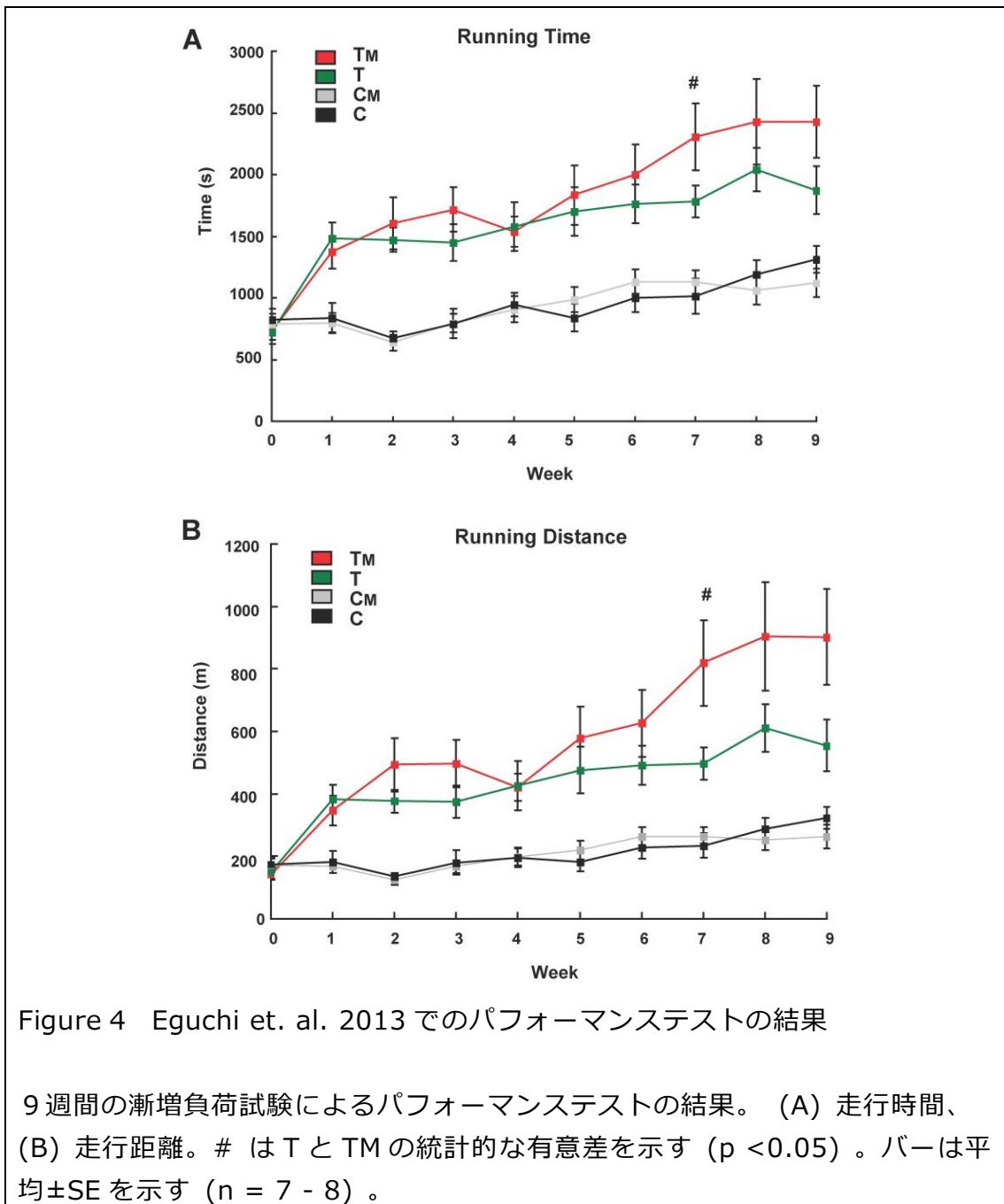
次に、MAF が細胞でなく生体に及ぼす影響を検討するためマウスが

使用された。ミトコンドリアは ATP という生体内で唯一のエネルギー源を効率よく作り出す有酸素代謝の中核となる細胞内小器官であるため、ミトコンドリアを活性化する MAF は生体での ATP 産生も向上されることが推察された為である。骨格筋において、ミトコンドリアの量や機能は一定でなく、インターバルトレーニングや持久的トレーニングによってダイナミックな容量増加、機能向上が引き起こされる<sup>43</sup>。特に、持久的トレーニングはミトコンドリア内で、 $\beta$ 酸化や TCA に関連する酵素の活性を上昇させる<sup>44</sup>。 $\beta$ 酸化や TCA の活性はミトコンドリアの膜電位に寄与するため、MAF はマウスの持久能力に影響を及ぼす可能性が推定された。そこで、マウスに継続的に MAF を摂取させ、持久能力の向上を評価する実験が行われた<sup>35</sup>。この実験のプロトコルおよびパフォーマンステストの結果は以下の表およびグラフのようになっている。実験群は、トレーニングを行うか行わないか、MAF を摂取するかしないかで 4 通りの群分けとなっている (Table 2)。Table 2 に記載されている一週間のスケジュールで、計 9 週間にわたり実験が行われた。各週の 6 日目にパフォーマンステストを行い、その結果は Figure 4 に記されている。

Table 2 Eguchi et. al. 2013 における実験プロトコルを記載  
 C、T:蒸留水、CM、TM : 蒸留水に 0.04%の MAF 溶解。各群自由摂取  
 n = 7 - 8  
 TR (Training)  
 15 m/min のトレッドミル運動を 30 分間行う  
 PT (Performance Test)  
 10%の傾斜で、10 m/min で 4 分間トレッドミル運動を行わせる。さらに、4 分毎に 2 m/min ずつ速度を上昇させ、最大 36 m/min まで上昇させる。途中マウスがトレッドミル上に留まらなくなったら、その個体のテストを終了しパフォーマンスを計測した。

Rest  
 休養日

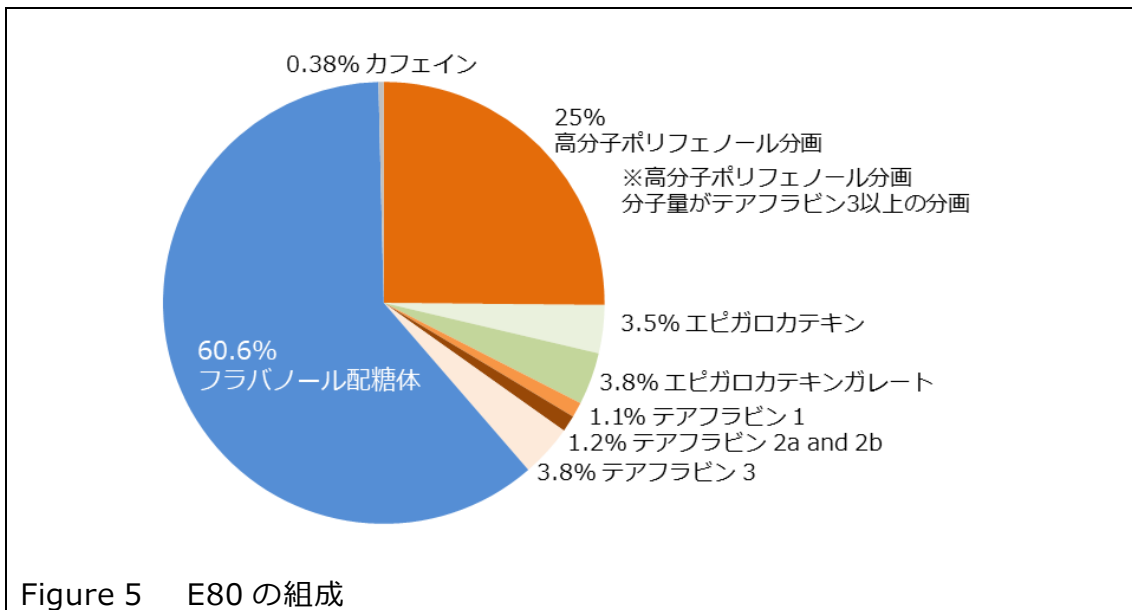
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
C	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	PT	Rest
CM	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	PT	Rest
T	TR	TR	TR	TR	TR	PT	Rest
TM	TR	TR	TR	TR	TR	PT	Rest



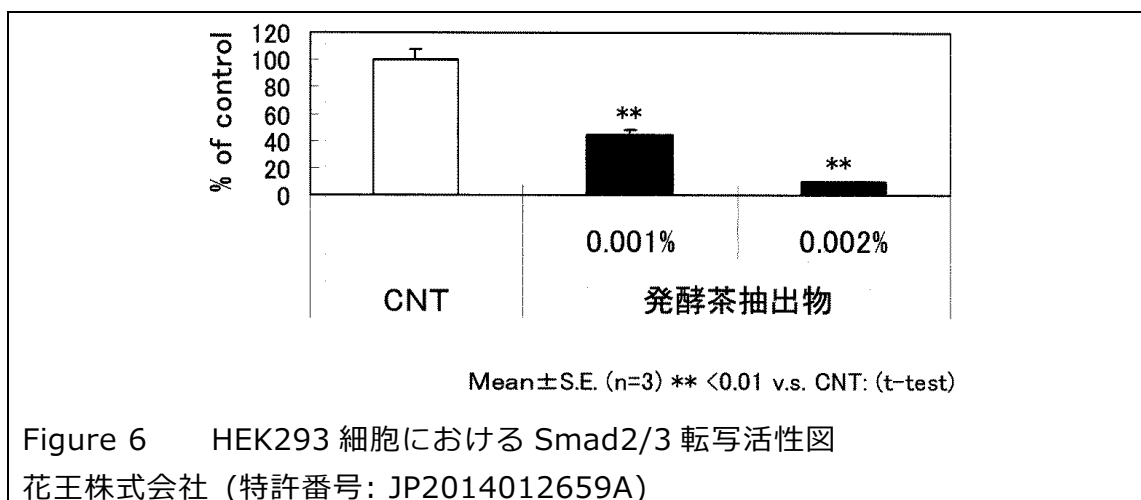
この実験において、トレーニングを行わないCおよびCMは、当然ながら9週間の実験期間中にパフォーマンステストでのパフォーマンスは向上していない。さらに、両群でパフォーマンスに違いは見られなかった (Figure 4)。トレーニングを行ったTでは、CおよびCM

に比べパフォーマンスは向上した。さらに、トレーニングと MAF を併用した TM ではさらにパフォーマンスが向上する結果となった (Figure 4) 。

以上の実験により MAF は、ミトコンドリアの機能やマウスの持久能力向上に貢献することが示された。しかしながら、MAF の抽出にはアセトンやブタノールを使用する問題点があった。有機溶媒は、食品衛生法で厳しく残渣が規制されており、それらを使用して製造・精製されたものは容易には食品として使用できない。将来、ヒトへの応用を想定したとき、この問題は大きな障壁となりうる。そのため、アセトンやブタノールなどの有機溶媒を使用せずに発酵茶から高分子ポリフェノール分画を抽出する方法が、生命環境系沼田研究室の小澤哲夫博士により考案された。この方法では、水とエタノールのみを使用し、高分子ポリフェノール分画を抽出しているため、食品として扱うことができる。この分画は 80%エタノールを使用し抽出するため、E80 と命名された。組成の特徴は Figure 5 に示す。E80 の組成の特徴として、カフェインの含有量が 0.38% と非常に低いことが挙げられる。また、25% と多くの高分子ポリフェノール分画が含まれている (Figure 5) 。



E80 は MAF と異なり、フラバノール配糖体や他のお茶ポリフェノールを含んでいる。しかしながら、紅茶から抽出したポリフェノール分画という点で MAF と同質のものであり、骨格筋においてその作用は検証されていなかった。また、花王株式会社より、腎培養細胞 HEK293 において、E80 が Myostatin の下流の因子である Smad2/3 の転写活性を低下させることが確認された (Figure 6)。



当初、MAF はミトコンドリアの機能やマウス持久力に効果があることが実験で示され、将来のヒト介入試験に向けて E80 を作成したところ、E80 は筋量調節を担っている Myostatin の機能に影響を与えている事が示唆された。HEK293 は骨格筋とは由来が異なる細胞であるが、Myostatin 自体の分子シグナルに対する機能は同じである。E80 と MAF は同一のものではないが、紅茶由来の高分子ポリフェノール分画としては同じ性質のものであり、骨格筋の量に着目した検証は行われていなかった。そこで、著者が生物学類で所属していた沼田研究室で、E80 の骨格筋の量に与える影響の検討を行った。

E80 が HEK293 細胞で Myostatin の下流因子である Smad2/3 の転写を下げている。前述の通り、Myostatin や Smad2/3 は筋量を負に制御している。そのため、E80 が HEK293 と同様に、骨格筋においてこれらの働きを抑制するならば、骨格筋の萎縮を抑える作用があると考えた。そこで、筋萎縮の実験系としてよく用いられている除神経

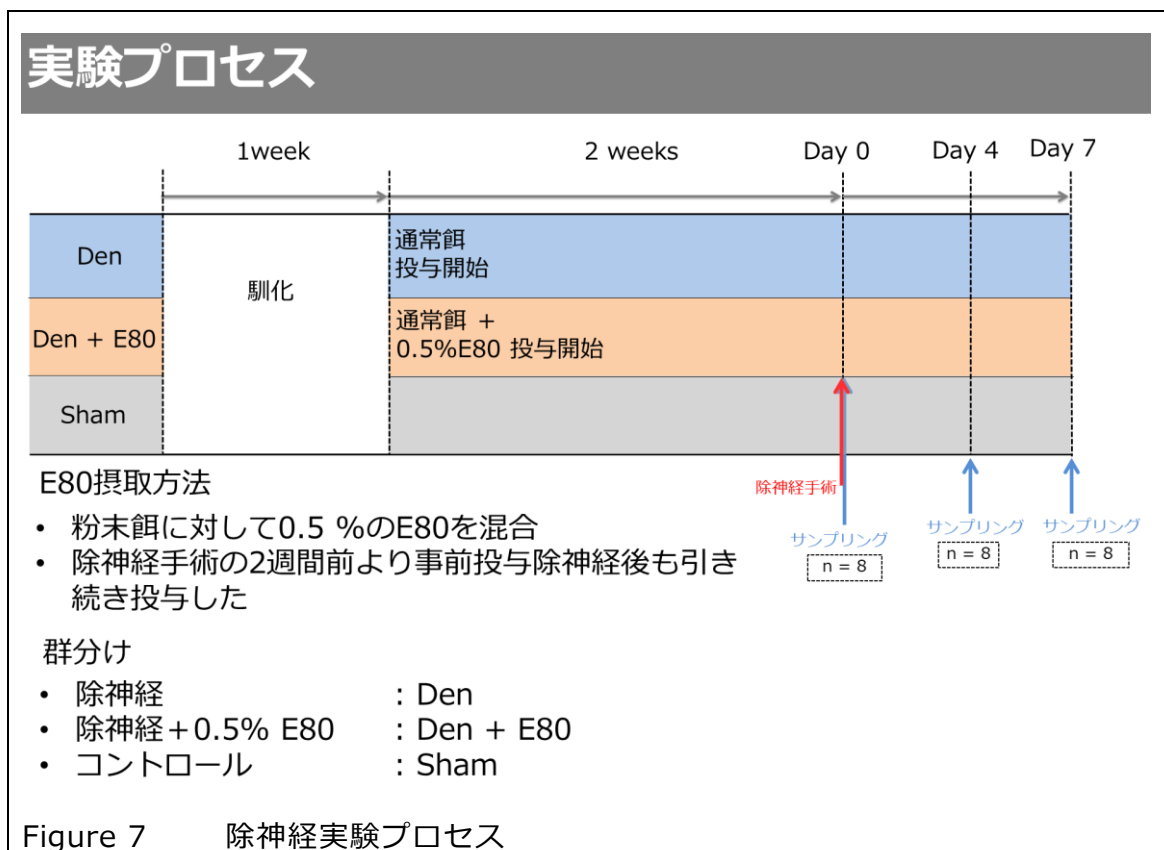


で、E80 の作用を検証することにした。除神経は、マウスの座骨神経を大腿部で切除するため、マウスの下腿の筋肉で著しい筋萎縮が起こる。再現性があり、手術も比較的容易であるため、筋萎縮を誘導する方法としてよく用いられている<sup>45</sup>。

## 第三章 研究課題設定までの予備検討

### 3.1 除神経を行った骨格筋に対する E80 の効果

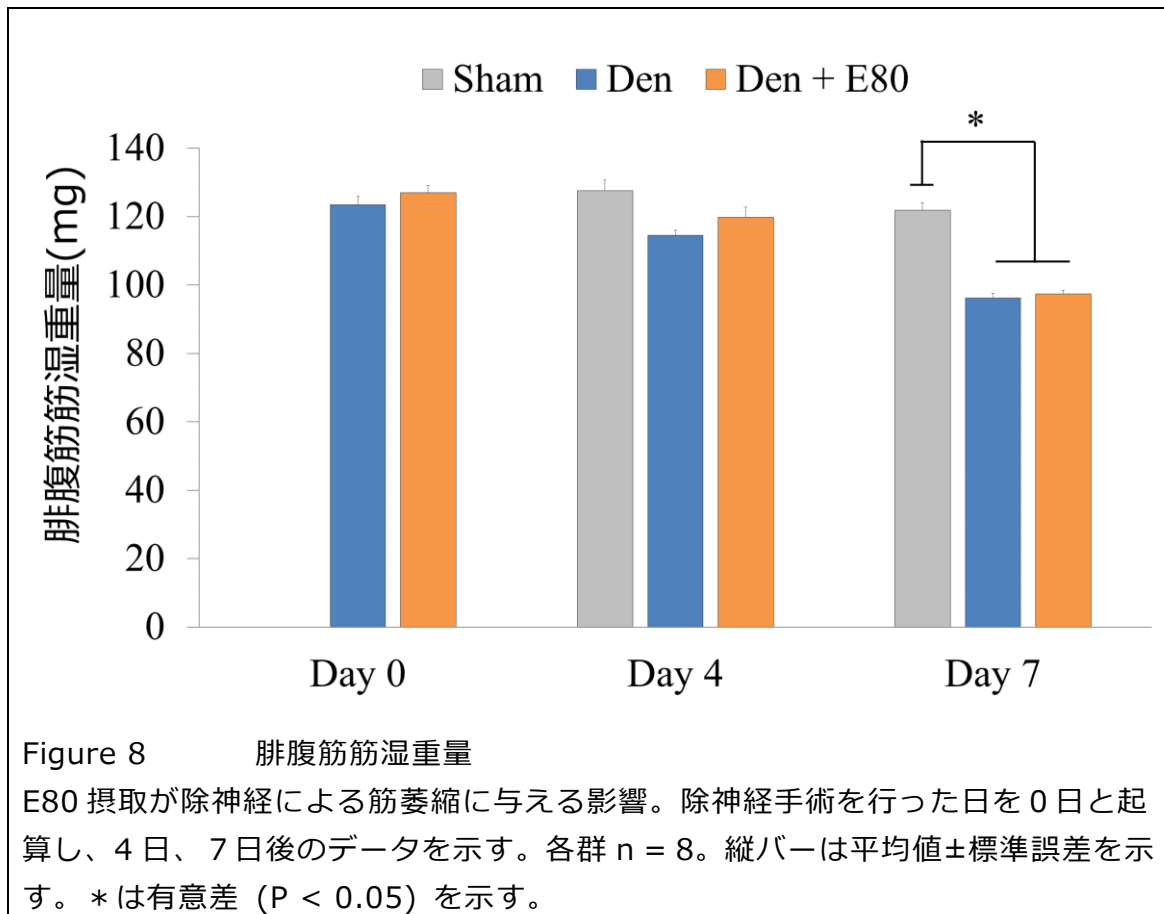
E80 の骨格筋の量に与える影響を検討するため、坐骨神経切除術を施した C57Bl/6 マウスに E80 を投与し、実験を行った。実験プロセスは以下に示した。



群分けとして、除神経を行う Den、除神経を行い E80 を投与する Den + E80、皮膚切開のみを行う Sham を設けた。除神経手術 4 日後、7 日後にサンプリングを行った。Day 0 に関しては、除神経手術を行っていないので、実質 Day 0 の Den がコントロールで、Day 0

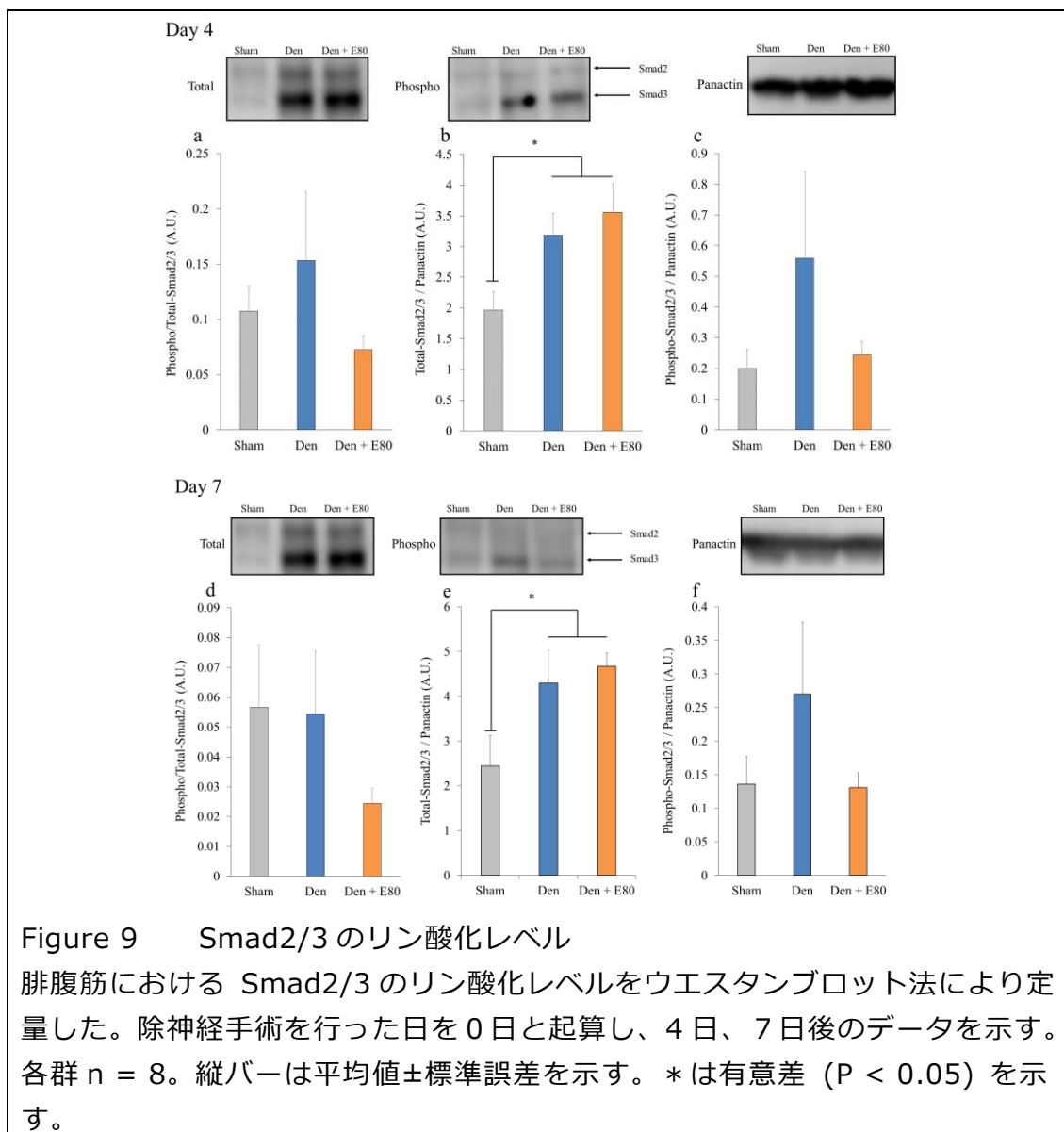
の E80 は 2 週間 E80 を摂取させた E80 のコントロールとなる。また、除神経手術前に 2 週間事前投与期間を設けたのは、Theaflavin などの紅茶に含まれるポリフェノールの吸収率が著しく悪いため、体内に蓄積するのに時間を要することが推察されたからである<sup>46</sup>。さらに、0.5%の濃度の根拠として明確なものはなかったが、E80 の高分子分画の摂取量が Eguchi らの報告で摂取した MAF の倍程度になるように見積もり、設定した。また、解析に用いた骨格筋はすべて腓腹筋である。

まず、腓腹筋の筋湿重量を以下に示す。Day 0 に関しては、Den と Den + E80 で変化はなかった (Figure 8) 。これは、2 週間の E80 摂取は、筋湿重量の増減に影響を及ぼさないことを示唆するものと考えられた。Day 4 において、Sham、 Den、 Den + E80 間で有意差はなかったが、除神経を行った群の値が Sham より 10%小さくなり、先行研究の値とも一致する<sup>47</sup> (Figure 8) 。除神経一週間後の Day 7 では、Den および Den + E80 は Sham に比べ 25%と大きく筋湿重量が減少した。しかしながら、Den と Den + E80 で違いは観察されなかった (Figure 8) 。この結果から、E80 の摂取自体は筋湿重量の増減に影響せず、また除神経による筋萎縮を抑制する効果がないことが示唆された。



続いて、E80 は除神経による筋湿重量の減少を抑制することが出来なかったが、先行研究で示されるような Myostatin や Smad2/3 といった因子に影響を与えるか検証した。Myostatin は活性型と不活型が存在し、活性型が受容体にどれくらい結合しているかがその機能の指標となる<sup>48</sup>。しかしながら、Myostatin と受容体がどれ程結合しているかどうかを確認するための解析は、当時在籍した研究室では困難であった。そこで、Smad2/3 は Myostatin の下流にあるため、Smad2/3 の活性を測ることで間接的に Myostatin の影響を解析した。解析は、Smad2/3 の活性化の指標であるリン酸化レベルを計測

するため、ウエスタンブロット解析を行った。Day 0 においては、Smad2/3 のリン酸化レベルは除神経を行っていないため、検出が難しいと想定されたため、Day 4 と Day 7 の解析を行った。結果を以下に示す。



Day 4、 Day 7 のリン酸化レベルデータにおいて、Phospho-Smad2/3 を Total-Smad2/3 で除した値は、Sham、Den、Den + E80 で有意差はなかった (Figure 9a、 d)。除神経を行った Den 及び Den + E80 で Sham 比べて上昇していることを想定していたが、Phospho-Smad2/3 と Total-Smad2/3 の発現量が Den 及び Den + E80 で共に上昇していた為、その割合が変化しなかった。そこ

で、Phospho-Smad2/3 と Total-Smad2/3 を内部標準遺伝子である Actin (Figure 9 の Panactin は細胞内のすべての Actin アイソフォームを意味する) でそれぞれ除した。Day 4、 Day 7 において、Total-Smad2/3 を Panactin で除したデータは、Den 及び Den + E80 で Sham よりも優位に上昇していた (Figure 9b、 e) 。しかしながら、Den 及び Den + E80 で変化はなかった。Phospho-Smad2/3 を Panactin で除したデータに関しては、Den 及び Den + E80 で変化はなく、Sham との有意差はなかった (Figure 9c、 f) 。除神経では Total-及び Phospho-Smad2/3 の発現量が上昇していることが報告されていたが<sup>49</sup>、本実験では Phospho-Smad2/3 の発現量上昇が確認されなかった。原因の一つとして、Phospho-Smad2/3 を検出する一次抗体で、効率よく働くものがなく、また、著者の手技不足もあり検出がうまくいっていなかったことが考えられる。いずれにせよ、ウェスタンブロットティングによる Smad2/3 では Total の上昇は確認され、先行研究に付随したものであることは確認された。

次に、Smad2/3 と協調的に働き、筋萎縮に大きな影響を与えている FoxO タンパク質のウェスタンブロットティング解析を行った。これは、Myostatin が FoxO に影響与えているという報告があったため<sup>50</sup>、E80 が Myostatin を阻害するならば FoxO にも影響与えるはずだと考えたからである。解析は、Smad2/3 と同様に、活性化の指標である FoxO リン酸化レベルをウェスタンブロット解析で計測した。Day 4 と Day 7 の解析結果を以下に示す。

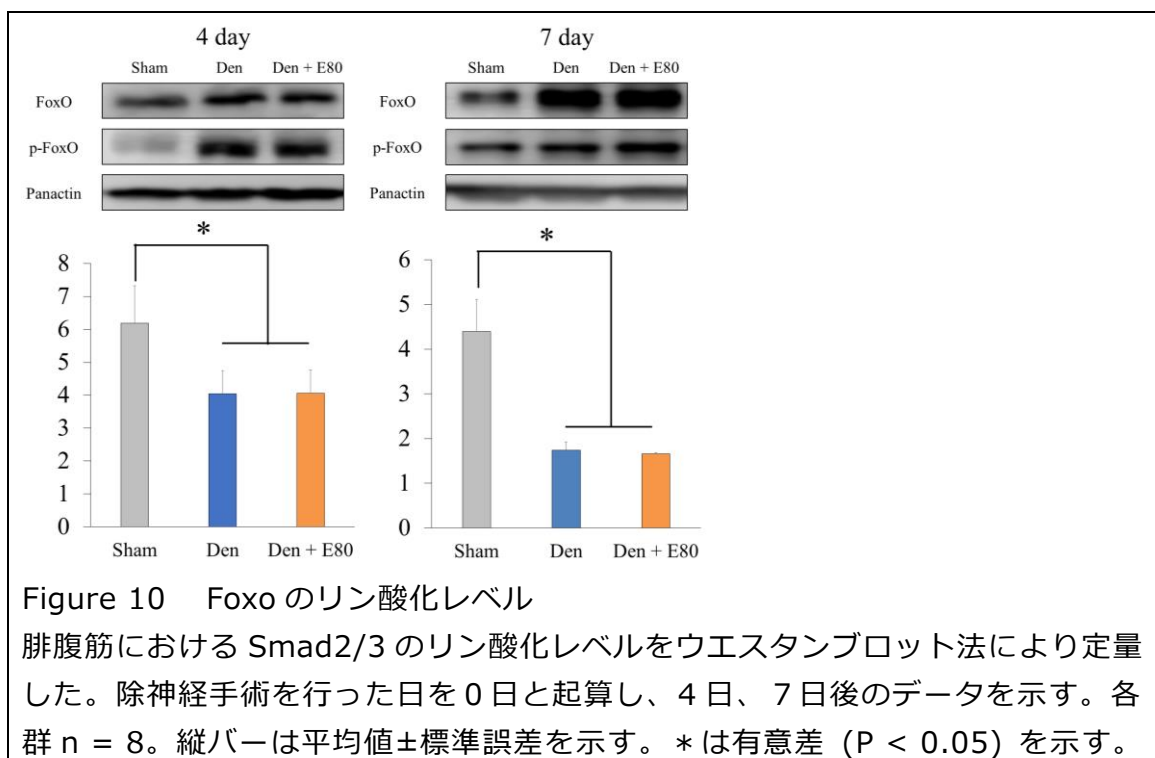


Figure 10 Foxo のリン酸化レベル

腓腹筋における Smad2/3 のリン酸化レベルをウエスタンブロット法により定量した。除神経手術を行った日を0日と起算し、4日、7日後のデータを示す。各群 n = 8。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

Day 4 において、除神経を行った Den 及び Den + E80 の FoxO リン酸化レベルが有意に減少していた。Day 7 においても Den 及び Den + E80 の FoxO リン酸化レベルが有意に減少していた。これらの結果は先行研究とも一致する<sup>51</sup>。しかしながら、Day 4、Day 7 において、Den と Den + E80 のリン酸化レベルに変化は全くなかった (Figure 10)。これは、筋質重量のデータを補強する結果となった。

最後に、筋萎縮を最終的に制御している Ubiquitin ligase の解析を行った。Ubiquitin ligase はタンパク質に Ubiquitin を付加し、プロテアソームによる分解を促す働きがある。骨格筋特異的に発現している Ubiquitin ligase として MAFbx および Murf-1 が存在し、これらの遺伝子をノックアウトしたマウスでは、除神経による筋萎縮に著しい



抵抗性を示す<sup>47</sup>。そのため、筋萎縮の評価において非常に大きな指標となっている。Smad2/3やFoxOと異なり、当時MAFbxおよびMurf1を検出することに定評のある抗体が市販されていなかったため、mRNAの発現量をq-PCR法を用いて解析した。Shamに関しては、発現量が非常に低く、定量における正確性の問題からDenおよびDen E80の結果を以下に示す。

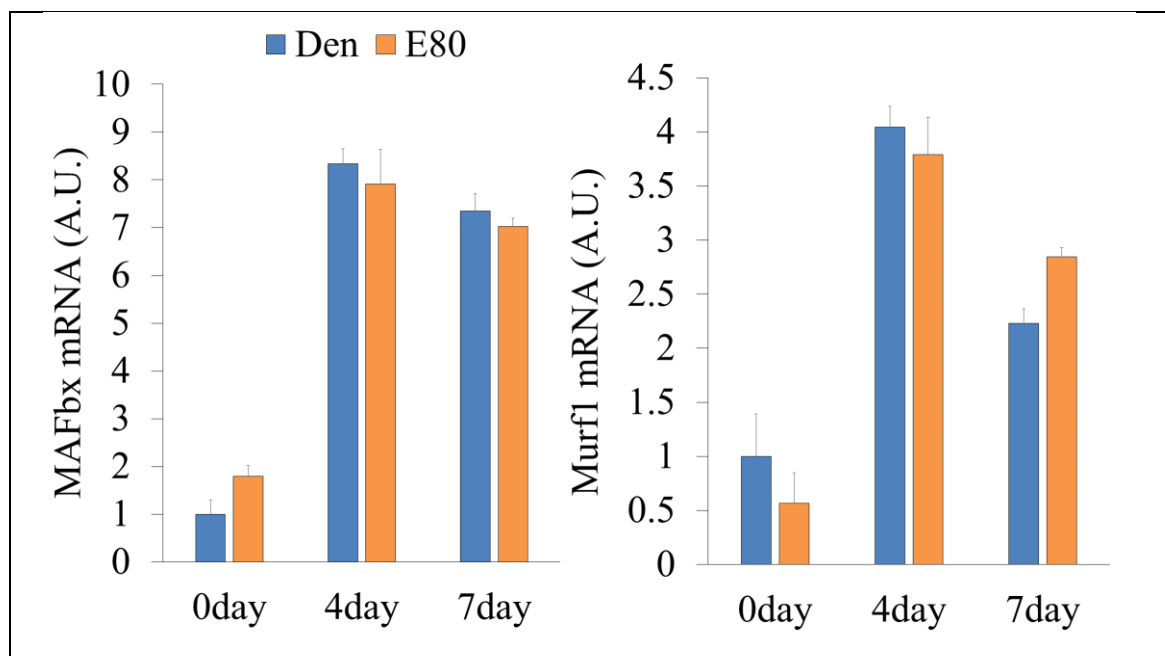


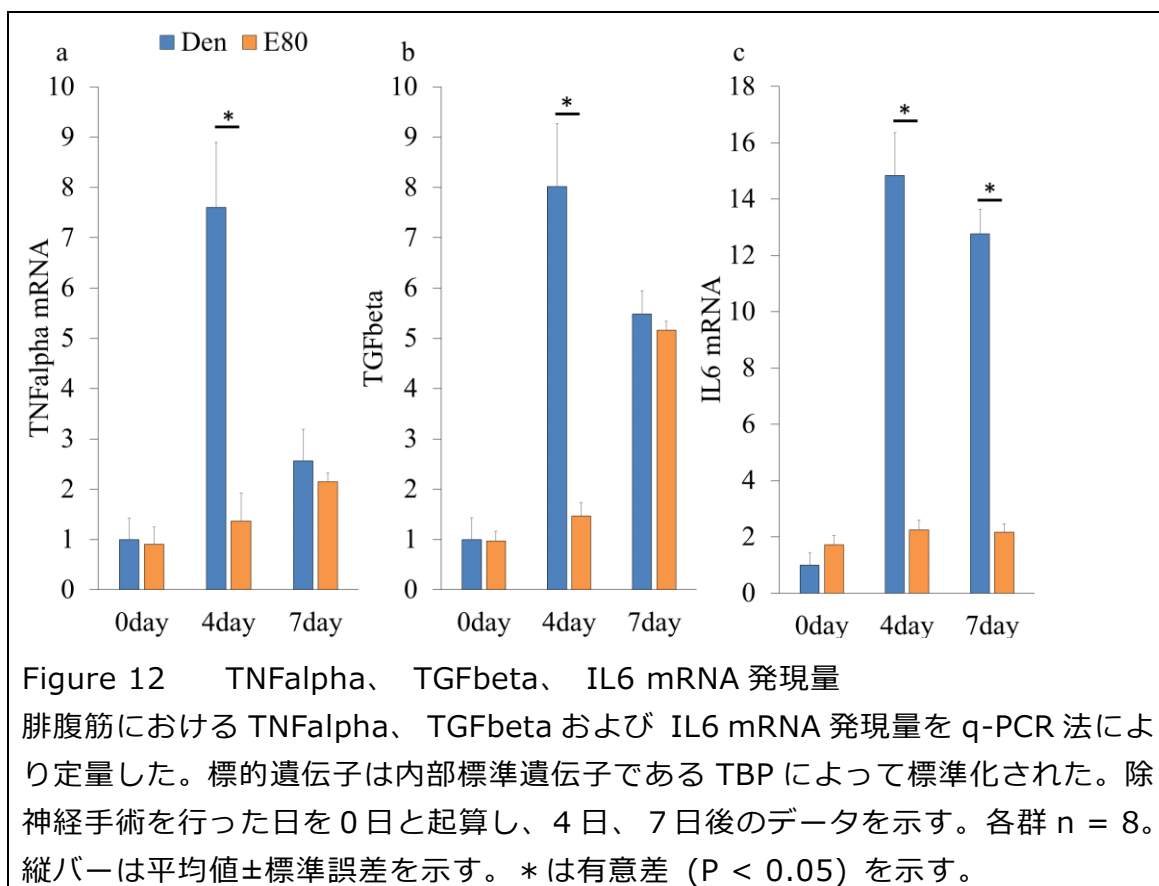
Figure 11 MAFbx および Murf1 mRNA 発現量

腓腹筋におけるMAFbxおよびMurf1 mRNA発現量をq-PCR法により定量した。標的遺伝子は内部標準遺伝子であるTBPによって標準化された。除神経手術を行った日を0日と起算し、4日、7日後のデータを示す。各群n = 8。縦バーは平均値±標準誤差を示す。

いくつかの先行研究で、これらの筋萎縮遺伝子であるUbiquitin ligaseの発現量が増加することは報告されており、本実験でも同様の結果と

なった。除神経により、Ubiquitin ligase の発現量が数倍増加しているが、Den と Den + E80 の間で変化は観察されなかった。

ここまでで、E80 が Myostatin の転写活性を抑制するという結果により、除神経による筋萎縮に与える影響を検討した。結果として、筋萎縮の抑制や Myostatin 関連シグナルタンパク質の活性、筋萎縮遺伝子の発現に E80 の効果は観察されなかった。そこで、当時研究室で検証できるあらゆる遺伝子の発現量を q-PCR 法で確認することにした。すると、E80 の投与により、おもに細胞の炎症を制御している Cytokine である TNFalpha、 TGFbeta、 IL6 の mRNA 発現量に変化が観察された。結果を以下に示す。



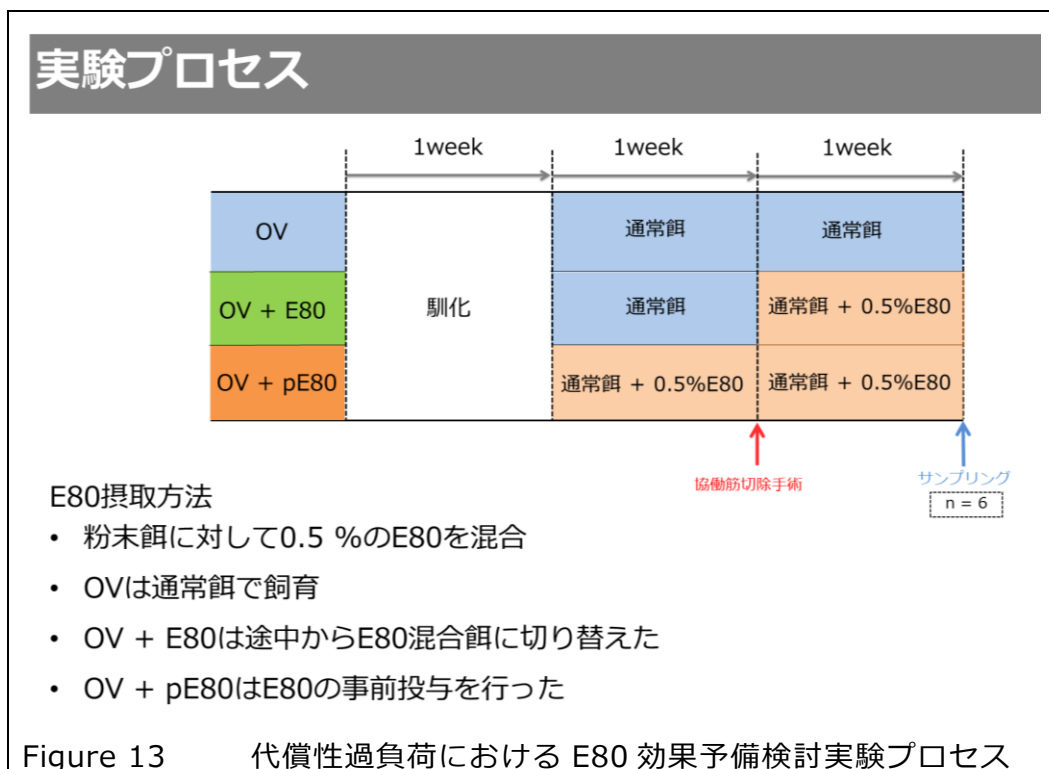
Day 4 において、TNFalpha、 TGFbeta および IL6 mRNA 発現量が E80 を投与した群で有意に減少していた (Figure 12a、 b、 c) 。IL6 では Day 7 でも顕著に減少していた (Figure 12c) 。

これらの原因について、言及している文献はほとんど見つからなかったが、ただ一つ IL6 に関連した論文で、関心を引くものがあった。論文の内容として、IL6 をノックアウトしたマウスでは、代償性過負荷による筋肥大を促進するというものであった<sup>52</sup>。この実験では、IL6 を遺伝的に消去したマウスを使用しているが、IL6 の抑制が代償性過負荷による筋肥大を促進することを示唆するものであった。E80 や紅茶由来ポリフェノールが筋肥大にもたらす影響は検証されておらず、

単純に E80 が IL6 の上昇を抑制すれば筋肥大を促進するのではないかと考えた。そこで、E80 が筋肥大に与える影響を検証するため、代償性過負荷による筋肥大の実験系において E80 の効果を検討する予備実験 (3.2 に示す) を行った。

### 3.2 代償性過負荷による筋肥大に与える E80 の効果の予備検討

実験プロセスを以下に示す。



この実験では、代償性過負荷による筋肥大において、E80 が及ぼす効果を検討した。代償性過負荷実験は、マウスの下腿後面の腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋の内、腓腹筋とヒラメ筋を外科的に切除する（協働筋切除）。これにより、残った足底筋に代償的に負荷が集中し、足底筋が筋肥大を起こす実験系である。マウスを含めた実験動物では、筋肥大を起こすトレーニングを行わせることが困難なため、よく利用されている実験である。群分けとして、協働筋切除を行い通常餌で飼育した OV、協働筋手術を行い 0.5% の E80 混合餌で飼育した OV + E80、

協働筋切除を行い、手術前から1週間のE80事前投与を行い、手術後も投与を継続したOV + pE80 (pはpreの意味である)の3群を設けた。協働筋切除後、1週間でサンプリングした理由は、1週間あれば十分に足底筋が肥大することが武政研究室で確認されていた為である。また、E80の事前投与を設けた理由として、事前投与を行っても全く効果がない場合、E80の筋量に対する効果を示すのは難しいと考えていたからである。

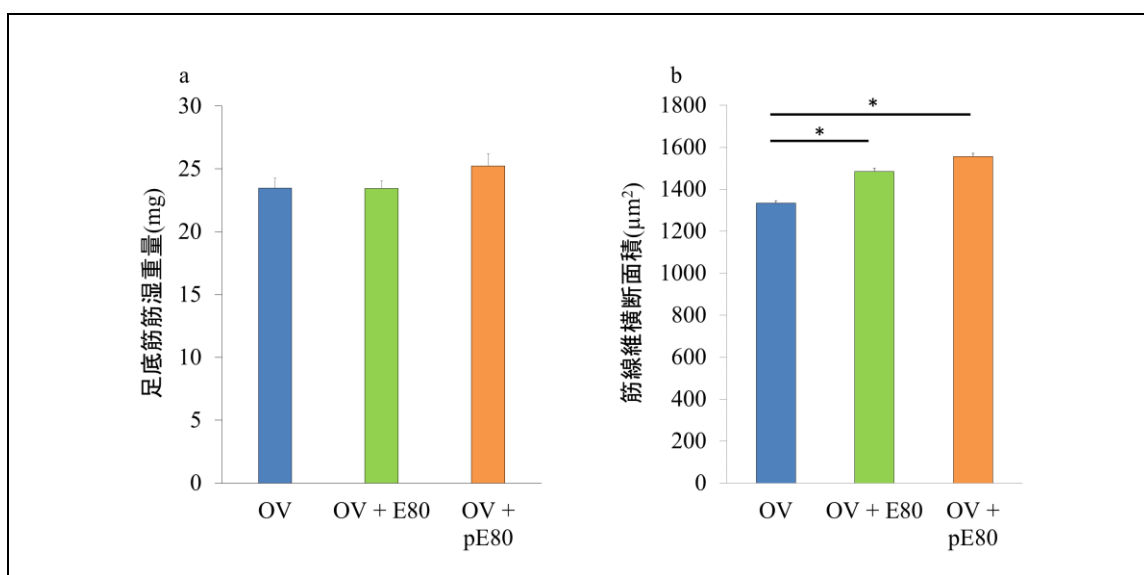


Figure 14 足底筋筋湿重量および筋線維横断面

E80 摂取による筋湿重量 (a) 及び筋線維横断面積 (b) の変化。共働筋手術を行った日を0日と起算し、7日後のデータを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。各群 n = 5-7。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

今回、予備検討ということで、コントロール群は設けなかった。しかし、通常足底筋の筋湿重量は 15 mg 程度あることから、代償性過負荷による筋肥大は起きていたと考えた。また、筋湿重量において、有意差はつかなかったものの、OV + pE80 の数値が OV および OV +

E80 に比べ上昇していた (Figure 14a) 。さらに、筋線維横断面積の解析を行ったところ、OV と比較し OV + E80 及び OV + pE80 が有意に高値を示した。OV + E80 と OV + pE80 で有意差はつかなかったが、OV + pE80 の方が数値が大きかった。ここで、E80 が筋肥大に対し促進効果がある可能性が示唆された。

次に、分子メカニズムの解析に移る段階で大きな問題が生じていた。今回の実験で初めて共同筋切除手術を行ったため、手技不足による手術失敗が多数あった。そのため、当初予定していたサンプル数の 2/3 である各群 10-11 本程度しか解析に使える筋がなかった。筋線維横断面積の解析にそのうちの 6 本を使用したため、残りは 5 本程度であった。統計解析の十分なサンプル数を確保するため、残りの筋は q-PCR による mRNA の発現量かウエスタンブロットによるタンパク質の解析どちらかしか解析できなかった。本実験のきっかけとなった IL6 は当時 q-PCR による mRNA 発現量解析しか、研究室において出来なかった。しかし、筋肥大の分子メカニズムにおいてもっとも研究され、影響が大きいとされていたのが mTOR であり、mTOR はウエスタンブロットによる解析が最も説得力があった。まとめると、当初の予定通り IL6 か、変化している確率が高い mTOR の解析を行うか、苦渋の選択に迫られることになった。そこで、もう一度元となった IL6 の論文<sup>52</sup>を見返した所、共同筋切除を行った群の足底筋は 23 mg 程で、IL6-ノックアウト群は 35 mg と大きく筋肥大していたにも関わらず、筋線維横断面積の頻度分布に大きな違いはなかった (Figure 15) 。

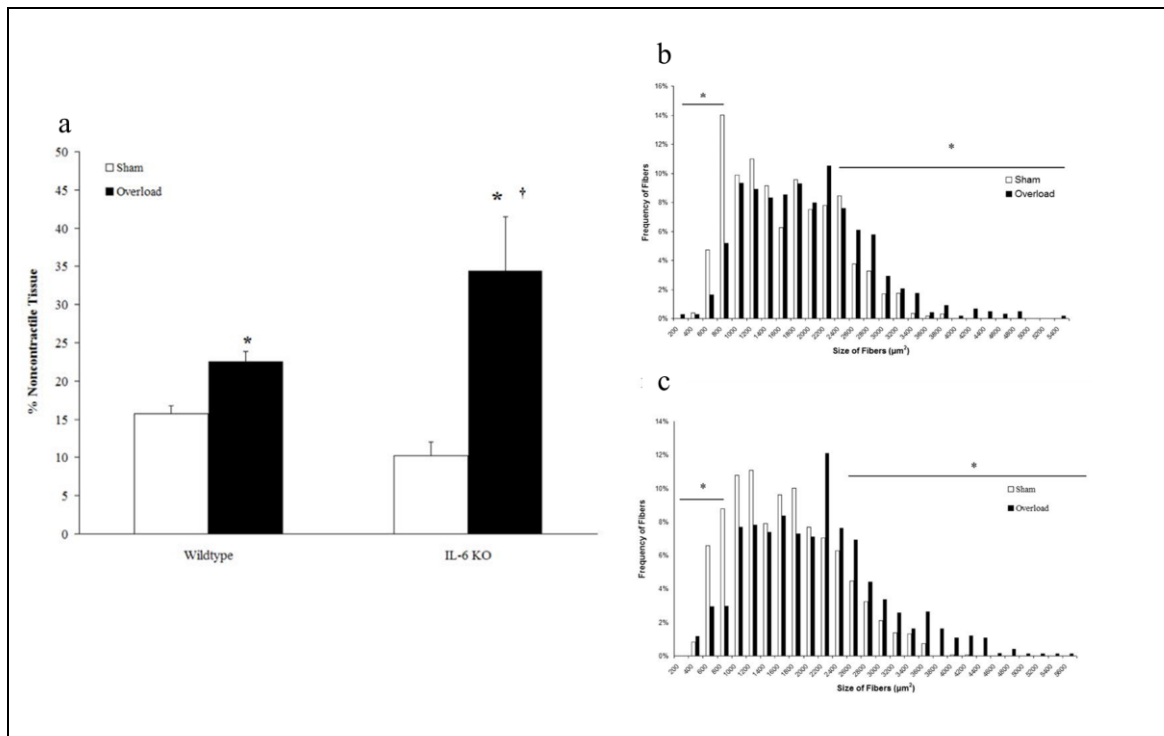


Figure 15 J. White et. al. 2009 の Figure を一部改編  
 Wild-type および IL6 ノックアウトマウスにおいて 3 週間の代償性過負荷による筋肥大の影響。筋湿重量 (a)、Wild-type 筋線維横断面積頻度分布 (b)、IL6 ノックアウトマウス筋線維横断面積頻度分布 (c)。n = 5。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

筋質重量の値が 1.5 倍以上の差があるにも関わらず、筋線維横断面積の頻度分布に大きな違い無いのは、大きな違和感を感じた。著者の解析は殆ど除神経による筋萎縮に対するもので、代償性過負荷による筋肥大実験と異なる。しかしながら、筋湿重量によって筋線維横断面積とその頻度分布が大きく変化することが経験上判明していたため、この先行研究において IL6 ノックアウトに筋肥大促進効果と今回の E80 の投与による筋肥大が促進効果が同質のものでは無いという決断をした。また IL6 と筋肥大に関連した論文が他に報告されていなかった。そのため、IL6 に関する報告は本研究のきっかけとなったが、まずは筋肥大に大きな影響を及ぼしている因子の解析を行うことにした。以



下に、ウエスタンブロットによるリン酸化レベルを測定したタンパク質の結果を示す。

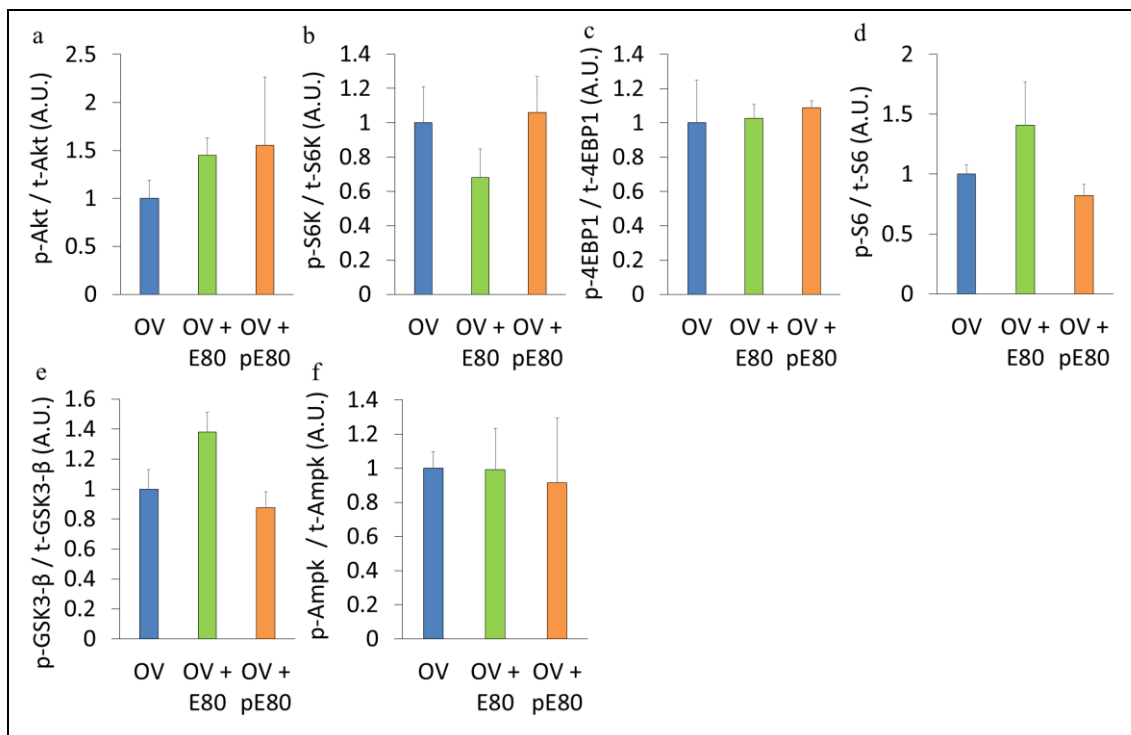


Figure 16 ウエスタンブロット法に足底筋タンパク質リン酸化レベル E80 摂取が代償性過負荷による筋肥大に伴う、分子シグナルに与える影響。足底筋タンパク質のリン酸化レベルを示す。共働筋手術を行った日を0日と起算し、7日後のデータを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。各群 n = 4-5。縦バーは平均値±標準誤差を示す。

まず、各群サンプル数が6に満たない為、統計学的有意差は無かった。しかしながら、mTOR シグナルの Akt、 S6 のタンパク質のリン酸化レベルが E80 の投与により上昇している傾向があった (Figure 16a、 d) 。その他の mTOR シグナルの内、S6K や 4EBP1 の変化は無かった (Figure 16b、 c) 。また、Akt からリン酸化の制御を受けている GSK3-β のリン酸化レベルが E80 の投与により上昇している傾向があった (Figure 16e) 。AMPK は TSC を介して mTOR シグナルに影響を与えているため、解析を行ったが各群で変化は無かった。

以上の予備検討のデータを踏まえ、E80 が筋肥大を促進する効果があるならば、筋萎縮からの回復にも効果があると考え、本研究の研究課題を設定した。

## 第四章 研究課題の設定

### 4.1 研究課題構成

先行研究及び予備検討において、紅茶由来ポリフェノールが骨格筋の量的変化に影響を及ぼすことが示唆された。本博士論文では紅茶由来ポリフェノールが骨格筋の量に与える効果を詳細に検証し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。そのため、以下のような研究課題を設定した。

### 4.2 研究課題 1

「紅茶由来ポリフェノールがマウスにおける代償性筋肥大に与える影響の検討」

骨格筋はレジスタンストレーニングにより、短期間で筋の肥大が起こる。マウスでは、レジスタンストレーニングを模した実験として共働筋切除による代償性過負荷による筋肥大実験がよく用いられる実験系である。

予備検討において、紅茶由来ポリフェノール (E80) の投与が、代償性過負荷による骨格筋の肥大を促進することが示唆された。詳細は「3.2 代償性過負荷による筋肥大に与える E80 の効果の予備検討」に記載した。そこで、本実験として、E80 代償性過負荷による骨格筋の肥大を促進するか検討を行う。

### 4.3 研究課題 2

「紅茶由来ポリフェノールがマウスでの後肢懸垂による筋萎縮あるいは再接地による筋量回復に与える影響の検討」

骨格筋は通常時は筋内でタンパク質の合成と分解のバランスが均衡し、その量が保たれている。しかし、徐負荷等で骨格筋に対する負荷が減少すると、筋萎縮がおこる。後肢懸垂実験はマウスの後肢を持ち上げ、地面に接しないようにすることで、マウスの下腿後面で劇的な筋萎縮が観察される。さらに、後肢懸垂後に後肢を再接地させることで、筋萎縮からの筋量回復を観察することができる。先行研究で行った除神経では、主に腓腹筋などの速筋で筋萎縮が起こる。しかし、後肢懸垂では抗重力筋であるヒラメ筋などの遅筋で優位に萎縮が起こる<sup>53</sup>。本研究課題では、遅筋であるヒラメ筋に着目し、紅茶由来ポリフェノール (E80) が後肢懸垂による筋萎縮あるいは再接地による筋量回復に与える影響を検討する。

### 4.4 研究の限界

本研究では、マウスを実験動物として用いる。マウスは原生生物等に比べると、ヒトと遺伝的に近縁である。細胞内で働く遺伝子や分子シグナルは両者で同じ働きをする。しかしながら、ヒトとマウスでは習性や摂取する食物等が異なり、栄養の吸収効率等も異なると考えられる。そのため、本研究で得られる結果はあくまでマウスを対象とした

実験で、ヒトへの応用は不可能ではないものの、直ちにその知見が応用できるものであるとは考えられない。

加えて、本研究で採用した代償性過負荷、後肢懸垂、後肢懸垂後の再接地は、ヒトが行うような運動の代替えとはならない。しかし、物理的負荷や中枢神経由来の刺激に励起された、カルシウムイオンの流入及び ATP 消費を伴う筋収縮という事象はあらゆる運動と同質である。また、その筋収縮が発端となって起こる細胞内のあらゆる分子や遺伝子の変化は上記の三つの実験系特有のもではなく、運動や機械的刺激の違いを超えて普遍的に起こる生命現象と考えられる。つまり、本研究で採用された代償性過負荷、後肢懸垂、後肢懸垂後の再接地という手法は、ヒトが行うレジスタンストレーニングやリハビリなどの運動とはその過程や負荷のかかり方は異なり、同次元で比較はできないが、それらが励起して起こる表現型や分子、遺伝子の変化は同じものであり、従来からの組織学、分子生物学的解析で妥当な評価が可能と考えられる。

また、本研究で用いたマウスは全て雄マウスである。雌マウスに比べ、雄マウスは月経周期がないため、性ホルモンバランスが安定している。性ホルモンは骨格筋の機能や量に大きな影響を与えることは周知の事実であるが、本研究では雄マウスを研究対象としているため、性差による影響の違いを排除することはできない。本研究における結論は、飽くまで雄マウスを対象の範囲内とし、導き出されたものである。

## 第五章 紅茶由来ポリフェノールがマウスの代償性筋肥大に与える影響の検討 (研究課題 1)

### 5.1 緒言

お茶由来のポリフェノール、特に緑茶カテキンは抗酸化作用や糖尿病予防など様々な効果が報告されている。紅茶由来のポリフェノールに関して、報告が多くないのが現状である。特に紅茶高分子ポリフェノールに関しては、生命環境系・沼田治研究室以外の報告は皆無であった。沼田研究室の先行研究や著者の予備検討において、高分子ポリフェノール分画である E80 がマウスの筋肥大を促進する可能性が示唆された。マウスの運動性筋肥大を評価する手法的な制約として、人間が行うウェイトトレーニングのようなレジスタンストレーニングを行わせることは困難さが挙げられる。そこで、レジスタンストレーニングを模した実験系として代償性過負荷実験がげっ歯類でよく用いられている<sup>54,55</sup>。代償性過負荷実験は、マウス下腿後面の腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋の内、腓腹筋とヒラメ筋を切除する協働筋切除手術を行い、残った足底筋に代償的な負荷をかけ筋肥大を誘導する実験系である。協働筋とはある特定の動作を行う際に、同じような働きをする骨格筋を指す。マウスの足関節の底屈において、腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋は同様の作用を有す。腓腹筋とヒラメ筋の協働筋を切除することで、立位や歩行の際にそれらの2つの筋肉に分散していた物理的負荷が足底筋に集中する。そうすることで、足底筋には通常時よりはるか

に大きい負荷が常時かかり、強制的な筋肥大を誘導できる。自重と比較し大きな負荷がかかる点において、この実験系はレジスタンストレーニングと同じである。しかし、外科的な介入がはいり、また、常時負荷がかかる為に、ヒトが行うようなレジスタンストレーニングとは別物である。ただ、骨格筋が負荷に対してカルシウムイオン流入を伴う筋収縮が起こることは、レジスタンストレーニングと同様である。負荷の結果として筋線維横断面積の増大や mTORs シグナルの活性化が起こるなど、筋細胞内で起こる事象は変わらない。そこで、本研究課題では、代償性過負荷による筋肥大において、E80 がもたらす影響を分子メカニズムも含めて検討する。

## 5.2 方法

### 実験動物

実験対象動物は C57/BL6 の 8 週齢雄マウスを用い、室温  $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度約 60%、12 h/12 h の light/dark 環境下で飼育した。すべてのマウスは、実験開始前に 1 週間の予備飼育を行った。水及び飼料は自由摂取とした。

マウスは 1 週間の予備飼育後、群間で均一な平均体重となるように振り分けた。群分けとして、通常餌で飼育する Control 群、通常餌に 0.5% の E80 を混合した E80 群、通常餌で飼育し共働筋を切除した OV 群、通常餌に 0.5% E80 を混合し共働筋を切除した OV+E80 群とした。サンプリングは実験開始後、4 日、7 日、14 日に行い、それ

ぞれ day 4、 day 7、 day 14 とした。標本数は Control 及び E80 がそれぞれ Day 4 (n=6) 、 Day 7 (n=6) 、 Day 14 (n=6) とした。また、OV 及び OV + E80 はそれぞれ Day 4 (n=9) 、 Day 7 (n=9) 、 Day 14 (n=5) とした。

## **紅茶由来ポリフェノール**

本研究で使用する紅茶由来ポリフェノールは、筑波大学大学院生命環境系の小澤哲夫博士より提供頂いた。

## **飼料**

本課題では粉末飼料 (NMF、オリエンタル酵母) を用いた。E80 を投与した群では、粉末飼料に 0.5%重量の E80 を混合し、すり鉢で固形物がなくなるまで少なくとも 30 分以上混合した。

## **共働筋切除手術**

イソフルランによる吸入麻酔 (2~3%) でマウスを麻酔下に置き、左右肢の膝窩からアキレス腱の皮膚を医療用メスで切開した。腓腹筋及びヒラメ筋は、遠位側はアキレス腱の踵骨付着部位、近位側は腓腹筋の大腿骨付着部位で切除した。コントロール群に関しては、皮膚のみ切開を行った。

## **サンプリング**

実験終了後、マウスは頸椎脱臼で処理され、速やかに対象筋である足底筋の摘出を行った。摘出筋は液体窒素で速やかに冷却した。組織学解析用の筋に関しては、OCT コンパウンドで包埋し、速やかに液体窒素で冷却した。



## ウェスタンブロット解析

凍結筋サンプルに溶解バッファー（1% Nonidet-P40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.2% SDS、150 mM NaCl、50 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸、哺乳類組織用の1%プロテアーゼ阻害剤カクテル、10 mM エチレンジアミン四酢酸、10 mM NaF、10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、および 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>）を添加し、ビーズクラッシャーにて粉碎した。次に、高速冷却遠心機にて、4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を抽出液とし回収した。

タンパク質濃度は、プロテインアッセイビシンコニネートキット（No. 06385-00、ナカライテスク）を使用したビシンコニン酸法によって同定した。

タンパク質抽出溶液を 7.5~12.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、続いてポリフッ化ビニリデン膜（PVDF; No. 162-0177; Bio-Rad）に転写した。Tween 20 (50 mM Tris、138 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.05% Tween 20) を含む Tris 緩衝生理食塩水中の 5% スkimミルクで、室温（20~25℃）で 45 分間、膜をブロッキングし、一次抗体を入れ 4℃で一晩インキュベートした。次に、二次抗体で 90 分間室温でインキュベートし、解析を行った。バンド強度の検出には LI-COR システム（No. CDG002134）を使用し、Image Studio Digits 4.0 ソフトウェア（ナカライテスク）で定量化した。

## 筋線維横断面積解析

足底筋は OCT コンパウンド（Sakura Finetek）で包埋し、液体窒

素で冷却したイソペンタンで急速に凍結した。切片作成まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。凍結した筋を厚さ  $7\ \mu\text{m}$  で切断、風乾し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。画像は、Olympus BX-51 顕微鏡で撮影した。筋切片をヘマトキシリン溶液（和光）で 5 分間インキュベートして核を染色し、その後 1 分間水で洗浄した。さらに、エオシン溶液（和光）で 1 分間染色し、その後水で 1 分間洗浄した。染色切片を BX-51 顕微鏡で観察し、Image J ソフトウェアを使用して筋横断面積を分析した。

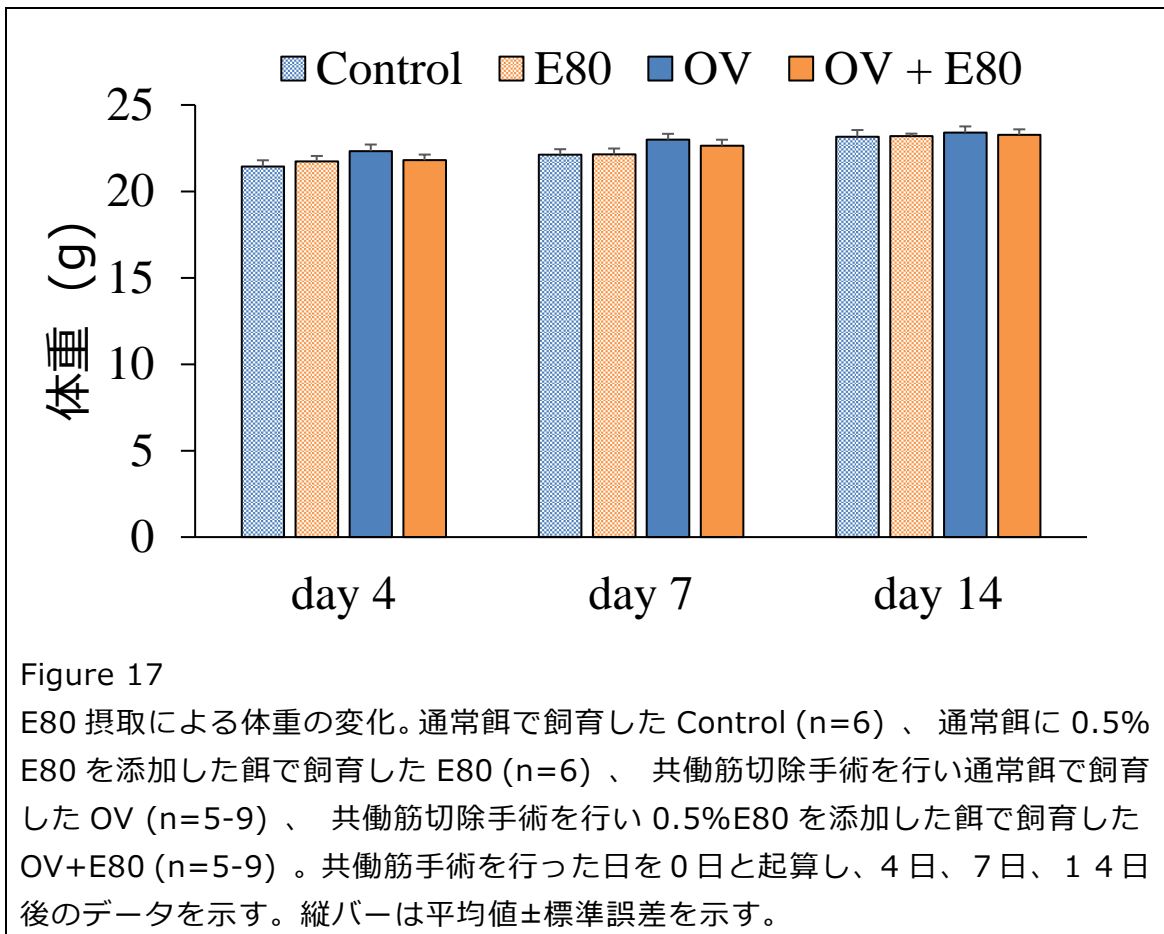
### **統計処理**

SPSS ソフトウェア (Version 22、IBM) を使用して、一元配置分散分析 (ANOVA) を実行し、2 つの独立した要因の間に有意な相互作用が存在するかどうかを判断した。事後検定は Dunnett の T3 を採用した。有意水準は 0.05 とし、すべてのグラフは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

## **5.3 結果**

### **E80 が体重および摂餌量に与える影響**

サンプリング時の体重変化を、Figure 17 に示す。day 4、day 7、day 14 と経過するにつれ、体重は増加傾向にあった。また、day 4、day 7、day 14 の各サンプリングポイントで、群間の差は認められなかった。これらのデータから、E80 摂取による体重への影響はないと考えられる。



サンプリングまでの、各群の1日あたりの平均摂餌量を Figure 18 に示す。各群で、1日あたりの平均摂餌量は変化しなかった。体重のデータと同様に、E80の摂取は摂餌量に影響を与えなかった。

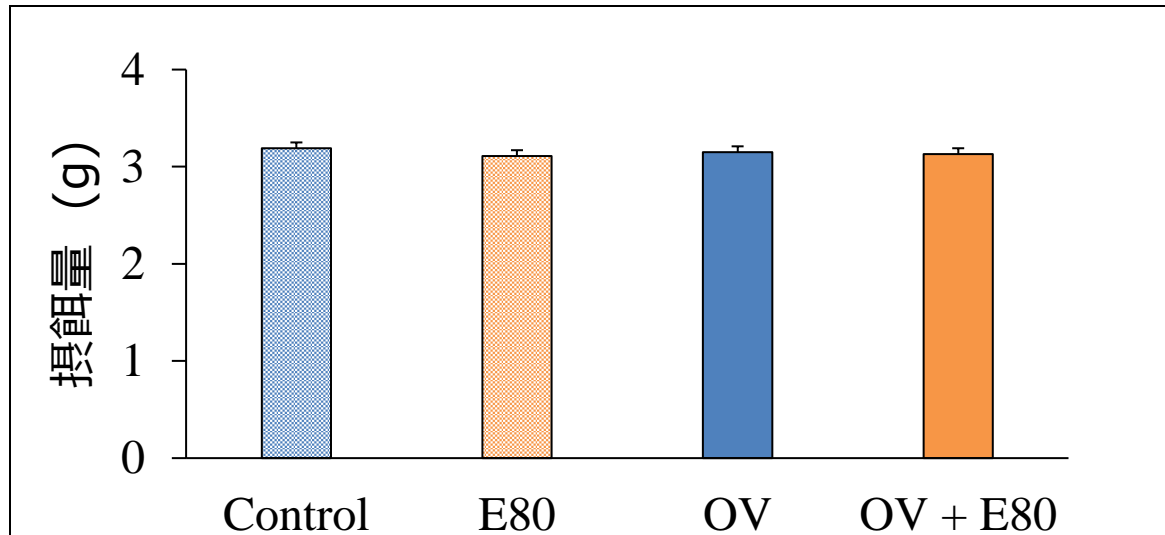
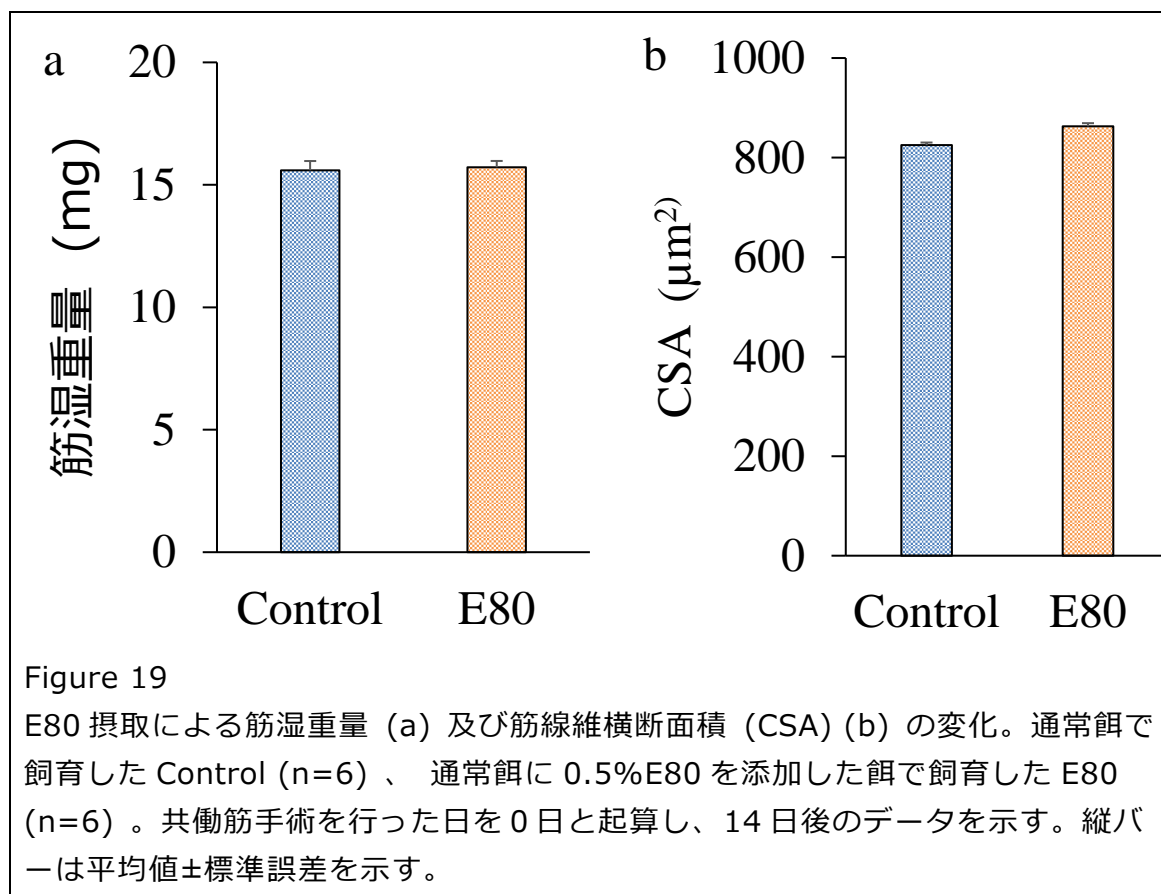


Figure 18

E80 摂取による摂餌量の変化。通常餌で飼育した Control (n=18)、通常餌に 0.5%E80 を添加した餌で飼育した E80 (n=18)、共働筋切除手術を行い通常餌で飼育した OV (n=23)、共働筋切除手術を行い 0.5%E80 を添加した餌で飼育した OV+E80 (n=23)。共働筋手術を行った日を 0 日と起算し、実験終了の 14 日後までの全個体の平均値データを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。

## 筋湿重量及び筋線維横断面積

E80 の摂取自体が、筋湿重量及び筋線維横断面積に与える影響を検証した。E80 の摂取は足底筋筋湿重量および筋線維横断面積の増減には影響を与えなかった (Figure 19a、 b)。



次に、E80 の摂取が、代償性過負荷による筋肥大に与える影響を検討した。E80 を摂取した群では、共働筋切除手術 4 日後、7 日後で有意に筋湿重量、筋湿重量/体重が高値を示した (Figure 20a、 b)。

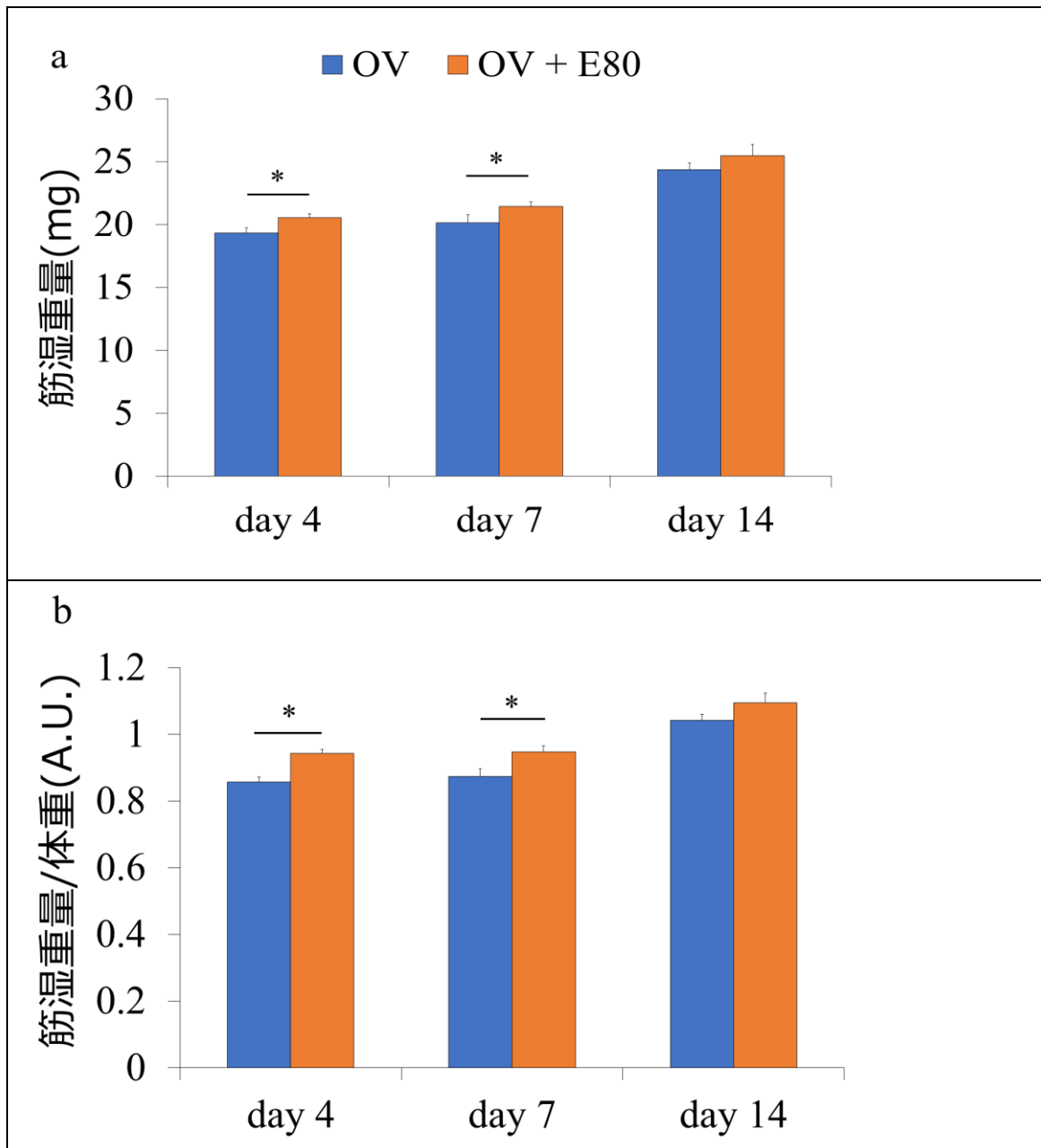


Figure 20

E80 摂取が代償性過負荷による筋肥大に与える影響。筋湿重量 (a) と筋湿重量/体重 (b) を示す。通常餌で飼育した共働筋切除手術を行い通常餌で飼育した OV (n=5-9)、共働筋切除手術を行い 0.5%E80 を添加した餌で飼育した OV+E80 (n=5-9)。共働筋手術を行った日を 0 日と起算し、4 日、7 日、14 日後のデータを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

筋湿重量と同様に筋線維横断面積のデータを測定した。day 4、day 7、day 14 の群で、E80 を摂取した OV+E80 の値が有意に高値を示した (Figure 21a) 。同様に、筋線維横断面積の分布を観察すると、OV+E80 の分布が右寄りにシフトしている (Figure 21b、c、d) 。右寄りにシフトが起こっていることが意味するところは、より太い線維の割合が多いことである。

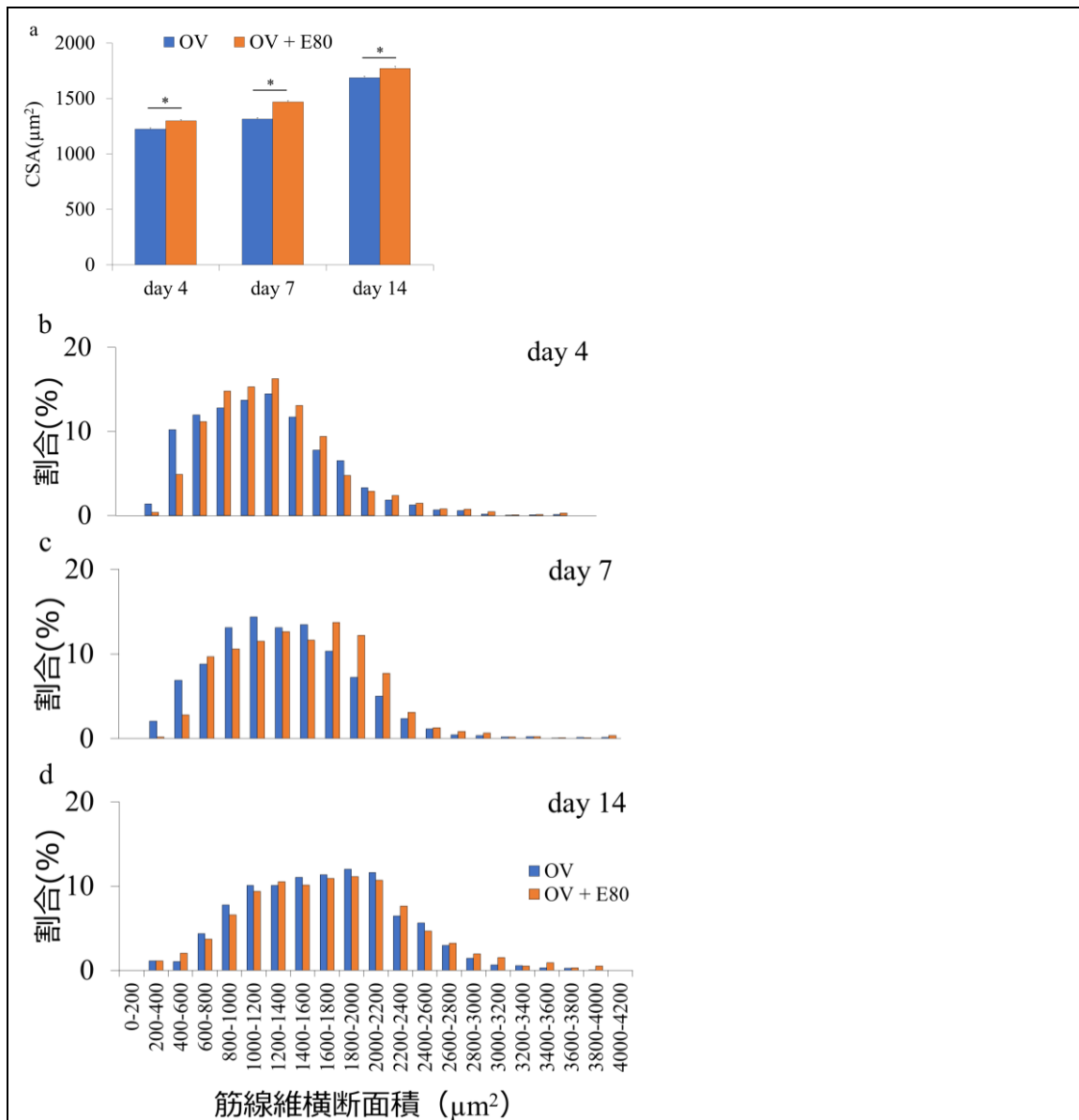


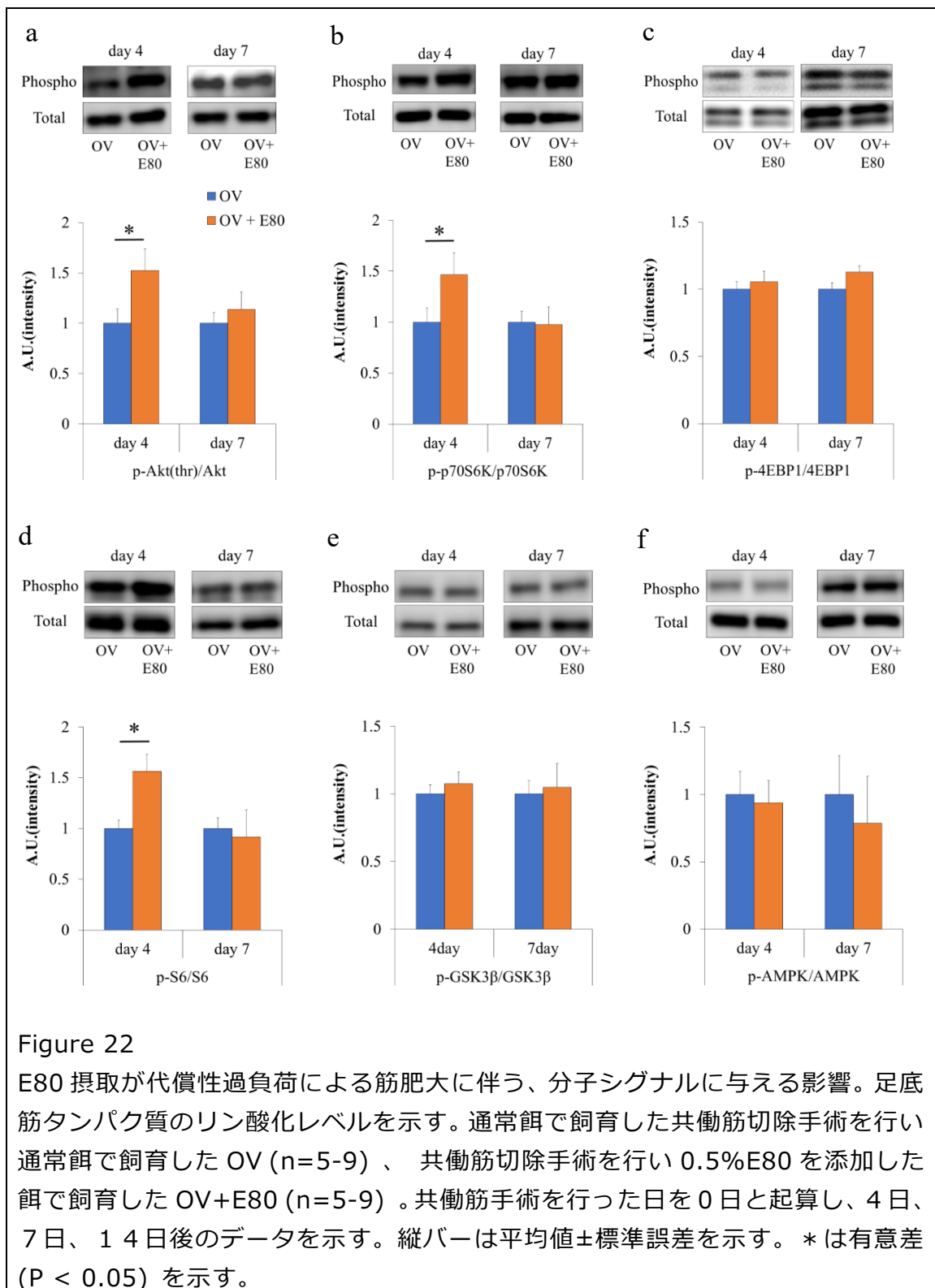
Figure 21

E80 摂取が代償性過負荷による筋肥大に与える影響。筋線維横断面積（上）と筋線維横断面積の分布（下3つ）を示す。通常餌で飼育した共働筋切除手術を行い通常餌で飼育した OV (n=5-9)、共働筋切除手術を行い 0.5%E80 を添加した餌で飼育した OV+E80 (n=5-9)。共働筋手術を行った日を 0 日と起算し、4 日、7 日、14 日後のデータを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\* は有意差 (P < 0.05) を示す。



## ウエスタンブロット

最後に、サンプリングした足底筋より抽出したタンパク質のウエスタンブロット解析のデータを示す。本研究では、筋肥大に大きな影響を与えている Akt-mTOR シグナル及び Akt-mTOR シグナルに干渉し筋肥大を与えている AMPK を解析した。mTOR は複合体を形成し活性化するが、ウエスタンブロットでは複合体の検出はできない。そのため、mTOR の活性化の指標として S6K を検出した。E80 の投与により、Akt、 S6K、 S6 が共働筋手術後 4 日目で有意に活性化していた (Figure 22a、 b、 d) 。 day 4 群では、その他のタンパク質は OV 群と変わらなかった (Figure 22c、 e 、 f) 。また、day 7 群ではすべてのタンパク質のリン酸化レベルに変化はなかった (Figure 22a - f)



## 5.4 考察

本研究では、マウスにおいて紅茶由来高分子ポリフェノール分画が代償性過負荷による筋肥大を促進することを初めて示した。また、そのメカニズムとして肥大過程の一部期間で Akt-mTOR シグナルの内 Akt、S6K、および S6 のリン酸化を促進していたことを同定した。

Akt は、骨格筋肥大の重要な調節因子として機能する。Akt は2つの独立する骨格筋の肥大に重要な分子である、GSK3 $\beta$ と mTOR の活性化を促進する<sup>13,56</sup>。GSK3 $\beta$ がリン酸化されると、eIF2B のリン酸化が減少し、翻訳開始とタンパク質合成プロセスが促進され、S6K のリン酸化レベルは、レジスタンス運動後の骨格筋肥大の大きさと相関することが報告されている<sup>13 56</sup>。さらに、ヒトの骨格筋における S6K および S6 のリン酸化の程度は、トレーニング量に依存することが示唆されている<sup>57</sup>。これらの報告は、S6K (mTOR 活性の指標) のリン酸化が骨格筋肥大に不可欠であることを示唆している。この実験では、E80 の摂取により Akt、S6K、および S6 のリン酸化が促進され、E80 が Akt および mTOR の下流の標的を活性化することが示唆された。E80 は、Akt および S6 シグナル伝達経路を介してタンパク質合成を調節し、それによって過負荷によって誘発される骨格筋肥大を促進すると考えられる。

本実験では E80 の投与により、筋肥大の促進効果が観察されたが、代償性過負荷の期間が長くなるに連れ、その促進効果が減弱する傾向

があった。筋湿重量のデータにおいて、Day 4、Day 7 で OV と OV + E80 では OV + E80 の値が有意に高かったが、Day 14 では有意差は付かなかった (Figure 20a) 。筋湿重量の値としては OV + E80 の方が高くはあり、筋線維横断面積では OV + E80 が有意に高かったが、Day 7 と Day 14 でその差は小さくなっていた (Figure 20a、Figure 21a) 。これらのデータから、代償性過負荷の期間を長くすれば、OV と OV + E80 の差がなくなる事を示唆していると考えられる。しかし、この事実は E80 自体に体重増加や筋肥大効果がなかったことを考慮すれば当然と考えられる (Figure 19) 。代償性過負荷の筋肥大のメカニズムは、共働筋を切除することで足底筋に対する絶対的な負荷が増加することが主要因であり、その負荷の源はマウスの体重である。トレーニングによる筋肥大には過負荷の原則というものがあり、これは、同じ負荷でトレーニングを行っていても、期間が経つうちに身体がその負荷に適応してしまい、トレーニング効果が薄れということの意味する。代償性過負荷の筋肥大がマウスの体重による負荷によるトレーニングと考えると、体重は劇的に増加しなければ、いずれは筋肥大そのものがプラトーに達する。プラトーに達した後、さらに筋肥大を促進させるには、マウスの体重を増加させるか、成長ホルモン等のドーピングを行わなければならない。しかし、E80 に体重増加作用も成長ホルモン等のような筋肥大効果もなかった。そのため、負荷が一定である条件では、いずれ対照群との差は減退すると考えられる。しかしながら、それは E80 の価値が無いことを意味することではない

と考えられる。E80 は同負荷に対する筋肥大を早期に促進しており、筋肥大が早く進めばそれだけ次の段階（負荷やトレーニング頻度をややす）に進めることが可能になるからである。アスリートをはじめとしたヒトに E80 が応用で可能であるならば、E80 はトレーニング効果を高めるサプリメントとして非常に価値が高いと考えられる。

また、E80 の筋肥大促進効果と同様の傾向で、mTOR シグナルで E80 の投与で変化のあった、Akt、S6K、S6 は Day 4 では活性化していたが、Day 7 では OV との違いは消失していた。代償性過負荷では、初期負荷による mTOR シグナルは活性化する。しかし、過負荷期間中の負荷は先述の通りあまり変化がないため、肥大が進むにつれ、肥大した筋に対して相対的な負荷は減少することになる。そのため、mTOR シグナルのような、負荷に呼応して活性化するタンパク質も徐々に減退する。これは文献でも確認できる<sup>58</sup>。E80 の効果として、代償性過負荷に筋肥大において、初期に肥大を促進していたことから、初期の筋肥大に対して、mTOR シグナルを通して促進効果を有するが、絶対に活性化を維持する効果はないと考えられる。もし、絶対に活性化を維持するような効果を有していたら、投与単体で筋肥大を促進すると考えられるが、本実験ではそのような効果は観察されなかった (Figure 17)。

また、本実験のきっかけとなった報告は、IL6 のノックアウトマウスで代償性過負荷による筋肥大で促進されるというものであった<sup>52</sup>。本実験において、当時はサンプル数に限りがあり IL6 の検証を行わな

かった。また qPCR 法用にサンプルを保存していたが、解析を行うことが出来なかった。しかし、一部残ったサンプルで Day7 の IL6mRNA 発現量を検証した。しかしながら、E80 を投与した群で、IL6 の発現量が上昇していた。除神経を行ったマウスに E80 の投与を行った際は IL6 の発現量を抑制していたが、代償性過負荷実験では発現を促進している形となった。原因は様々考えられるが、そもそも除神経と代償性過負荷実験は骨格筋の肥大と萎縮で方向性が異なり、個々の遺伝子の動態は一致しない。今回の E80 の肥大効果としては、mTOR シグナルの関与が大きく、IL6 との関連は今後の課題と考えられる。

## 第六章 紅茶由来ポリフェノールがマウスでの後肢懸垂による筋萎縮あるいは再接地による筋量回復に与える影響の検討 (研究課題 2)

### 6.1 緒言

骨格筋は可塑性の高いの組織であり、環境および生理学的刺激に対する反応がよい<sup>12</sup>。過負荷または除負荷は、骨格筋量を劇的变化させるが、これはタンパク質の合成速度と分解速度のバランスによって決定される。骨格肉内でのタンパク質合成速度に対して分解速度が大きいと、筋量が減少する。一方、分解と比較してタンパク質合成の割合が高いと、筋量が増加する<sup>13</sup>。不活動や宇宙飛行などの除負荷は、人間において劇的な筋萎縮を引き起こす<sup>59,60</sup>。これらは廃用性筋萎縮と呼ばれる。

筋萎縮は、筋湿重量及び筋線維断面積 (CSA) の減少によって特徴付けられる<sup>61,62</sup>。また、萎縮後の再接地は筋の再成長を誘発する。骨格筋の萎縮抑制や回復を促進することは、臨床的に重要である。不活動や宇宙飛行などによって誘発される廃用性筋萎縮による筋力の低下が、日常生活に悪影響を及ぼし QOL を損なう可能性があるためである<sup>63</sup>。さらに、筋量回復の阻害や遅延は、骨格筋の機能に深刻な影響を与える可能性があるため、萎縮後の筋肉量の回復を防ぐことも非常に重要である<sup>64,65</sup>。

お茶由来のポリフェノール、特に緑茶カテキンは抗酸化作用や糖尿

病予防など様々な効果が報告されている。紅茶由来のポリフェノールに関して、報告が多くないのが現状である。特に紅茶高分子ポリフェノールに関しては、生命環境系・沼田治研究室以外の報告は皆無であった。沼田研究室の先行研究や著者の予備検討において、高分子ポリフェノール分画である E80 がマウスの筋肥大を促進する可能性が示唆された。研究課題 1 で検証した代償性過負荷では、外科的な手法で足底筋の筋量増加に対する、E80 の効果を検討した。また、予備検討では、E80 が除神経による筋萎縮を抑制するかどうかの検討を行った。代償性過負荷で対象となる足底筋は主に速筋線維で構成され、また、除神経では速筋線維が優先的に萎縮し、対象となる骨格筋も腓腹筋や足底筋など速筋が主となる。

研究課題 2 では、遅筋線維に対する E80 の効果を検討するため、ヒラメ筋の萎縮及び萎縮からの回復に与える筋量回復に与える E80 の効果を検証する。ヒラメ筋は抗重力筋ともいわれ、構成線維のほとんどが遅筋線維で、ヒトでは 8 割、マウスでは 5 割といわれる。ヒラメ筋はヒトでは宇宙空間での滞在で劇的に萎縮する。これは物理的負荷が減少するためで、げっ歯類では分子の動態を含む物理的負荷の減少による廃用性筋萎縮を観察するために、後肢懸垂 (Hindlimb Unloading: HU) が広く使用されている<sup>66</sup>。さらに、HU モデルは後肢を再接地 (Reloading: RE) させることにより、廃用性筋萎縮からの回復過程を観察できる<sup>66</sup>。本研究課題では、E80 が抗重力筋および遅筋であるヒラメ筋に対して、廃用性筋萎縮および筋萎縮からの再負荷



による筋量回復に対して、E80 がどのような影響を与えるのか検証を行う。

## 6.2 方法

### 実験動物

実験対象動物は C57/BL6 の雄マウスを用い、室温 23℃±2℃、湿度約 60%、12h/12h の light/dark 環境下で飼育した。すべてのマウスは、実験開始前に 1 週間の予備飼育を行った。水及び飼料は自由摂取とした。

マウスは 1 週間の予備飼育後、群間で均一な平均体重となるように振り分けた。通常餌で飼育し、介入を行わない群を Control 群 (n=6) とした。加えて、介入を行うマウスを次のように 6 つの群に分けた。通常餌で飼育し、2 週間後肢懸垂を行った群 (Normal\_HU) 、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間後肢懸垂マウスを行った群 (E80\_HU) 、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた群 (Normal\_RE5) 、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた群 (E80\_RE5 グループ) 、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた群 (Normal\_RE10) 、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた群 (E80\_RE10) 。標本数は Control がそれぞれ 10 weeks (n=6) 、 12 weeks (n=6) とした。また、HU 及び RE5 はそれぞれ Normal (n=7) 、 E80 (n=9) とし、RE10 はそれぞれ Normal

(n=6) 、 E80 (n=6) とした。

## **紅茶由来ポリフェノール**

本研究で使用する紅茶由来ポリフェノールは、筑波大学大学院生命環境系の小澤哲夫博士より提供頂いた。

## **飼料**

本課題では粉末飼料 (NMF、オリエンタル酵母) を用いた。E80 を投与した群では、粉末飼料に 0.5%重量の E80 を混合し、すり鉢で固形物がなくなるまで少なくとも 30 分以上混合した。

## **後肢懸垂及び再接地**

後肢懸垂に割り当てられたマウスはイソフルラン麻酔 (2~3%) の下で、ペーパークリップとスイベルフックを包帯テープで尾の周りに固定し、金属線をスイベルフックに通し、円筒形ケージ (直径 18cm) の上部に固定してマウスの後肢を吊り上げた。マウスの足指がケージの床に触れないように、マウスのつま先は下部から約 3 cm 持ち上げられた。吊り上げられたマウスは、前肢を使用してケージの床全体に自由に移動できるようにした。再接地群では、2 週間の後肢懸垂後マウスは後肢懸垂を終了し、通常飼育した。

## **サンプリング**

実験終了後、マウスは頸椎脱臼で処理され、速やかに対象筋であるヒラメ筋の摘出を行った。摘出筋は液体窒素で速やかに冷却した。組織学解析用の筋に関しては、OCT コンパウンドで包埋し、速やかに液体窒素で冷却した。

## ウェスタンブロット解析

凍結筋サンプルに溶解バッファー（1% Nonidet-P40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.2% SDS、150 mM NaCl、50 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸、哺乳類組織用の1%プロテアーゼ阻害剤カクテル、10 mM エチレンジアミン四酢酸、10 mM NaF、10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、および 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>）を添加し、ビーズクラッシャーにて粉碎した。次に、高速冷却遠心機にて、4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を抽出液とし回収した。

タンパク質濃度は、プロテインアッセイビシンコニネートキット（No. 06385-00、ナカライテスク）を使用したビシンコニン酸法によって同定した。

タンパク質抽出溶液を 7.5~12.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、続いてポリフッ化ビニリデン膜（PVDF; No. 162-0177; Bio-Rad）に転写した。Tween 20 (50 mM Tris、138 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.05% Tween 20) を含む Tris 緩衝生理食塩水中の 5% スkimミルクで、室温（20~25℃）で 45 分間、膜をブロッキングし、一次抗体を入れ 4℃で一晩インキュベートした。次に、二次抗体で 90 分間室温でインキュベートし、解析を行った。バンド強度の検出には LI-COR システム（No. CDG002134）を使用し、Image Studio Digits 4.0 ソフトウェア（ナカライテスク）で定量化した。

## 筋線維横断面積解析

ヒラメ筋は OCT コンパウンド（Sakura Finetek）で包埋し、液体

窒素で冷却したイソペンタンで急速に凍結した。切片作成まで-20℃で保存した。凍結した筋を厚さ 12μm で切断、風乾し、-20℃で保存した。画像は、BZ-X710 顕微鏡 (Keyence) で撮影した。筋切片をラミニンα2 抗体で一晩インキュベートして、次に Alexa 抗体で反応させ筋膜を染色した。染色切片を BZ-X710 顕微鏡で観察し、BZ-X Analyzer ソフトウェアを使用して筋横断面積を分析した。

### **統計処理**

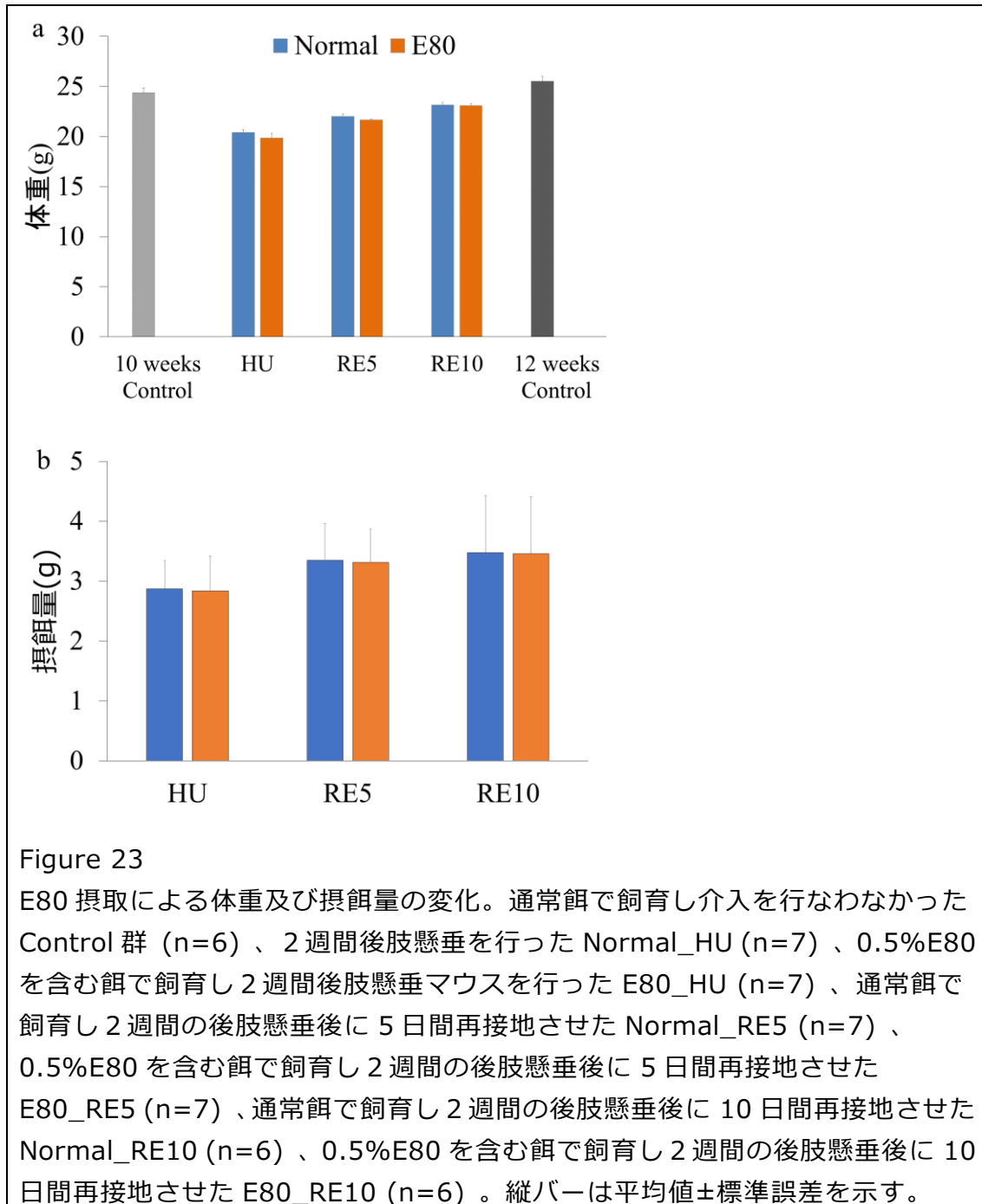
SPSS ソフトウェア (Version 22、 IBM) を使用して、一元配置分散分析 (ANOVA) を実行し、2 つの独立した要因の間に有意な相互作用が存在するかどうかを判断した。事後検定は Dunnett の T3 を採用した。有意水準は 0.05 とし、すべてのグラフは平均値±標準誤差で示した。

## **6.3 結果**

### **E80 が体重および摂餌量に与える影響**

サンプリング時の体重および摂餌量を、Figure 23a、 b に示す。2 週間の後肢懸垂によりマウスの体重は同週齢のマウス (10 weeks control) に比べ大きく減少した。また、HU、 RE5、 RE10 と経過するにつれ、体重は回復した。さらに、10 日間の再接地により体重は回復したものの、同週齢のマウス (12 weeks control) までは回復しなかった。これらのデータから、後肢懸垂により体重は減少、再接地により回復するが、E80 摂取による体重への影響はないと考えられる

(Figure 23a) 。また、後肢懸垂及び再接地期間中で、Normal および E80 の摂餌量に変化はなかった (Figure 23b) 。このことから、研究課題 1 同様、E80 は体重の増加及び摂餌量に影響を与えないと考えられる。



## 筋湿重量及び筋線維横断面積

2週間の後肢懸垂により、ヒラメ筋湿重量は50%近く大きく減少したが、NormalとE80で変化はなかった (Figure 24a)。また、5日間、10日間の再接地で大きく筋湿重量が回復し、E80を投与した群が有意に高値を示した (Figure 24a)。筋湿重量/体重のデータも同様で、筋湿重量/体重は30%近く減少し、NormalとE80で変化はなかった (Figure 24b)。筋湿重量と同様に、筋湿重量/体重も5日間、10日間の再接地で大きく回復し、E80を投与した群が有意に高値を示した (Figure 24b)。しかしながら、筋湿重量及び筋湿重量/体重は10日間の再接地では、同週齢のマウスと同等まで回復しなかった (Figure 24a、 b)。

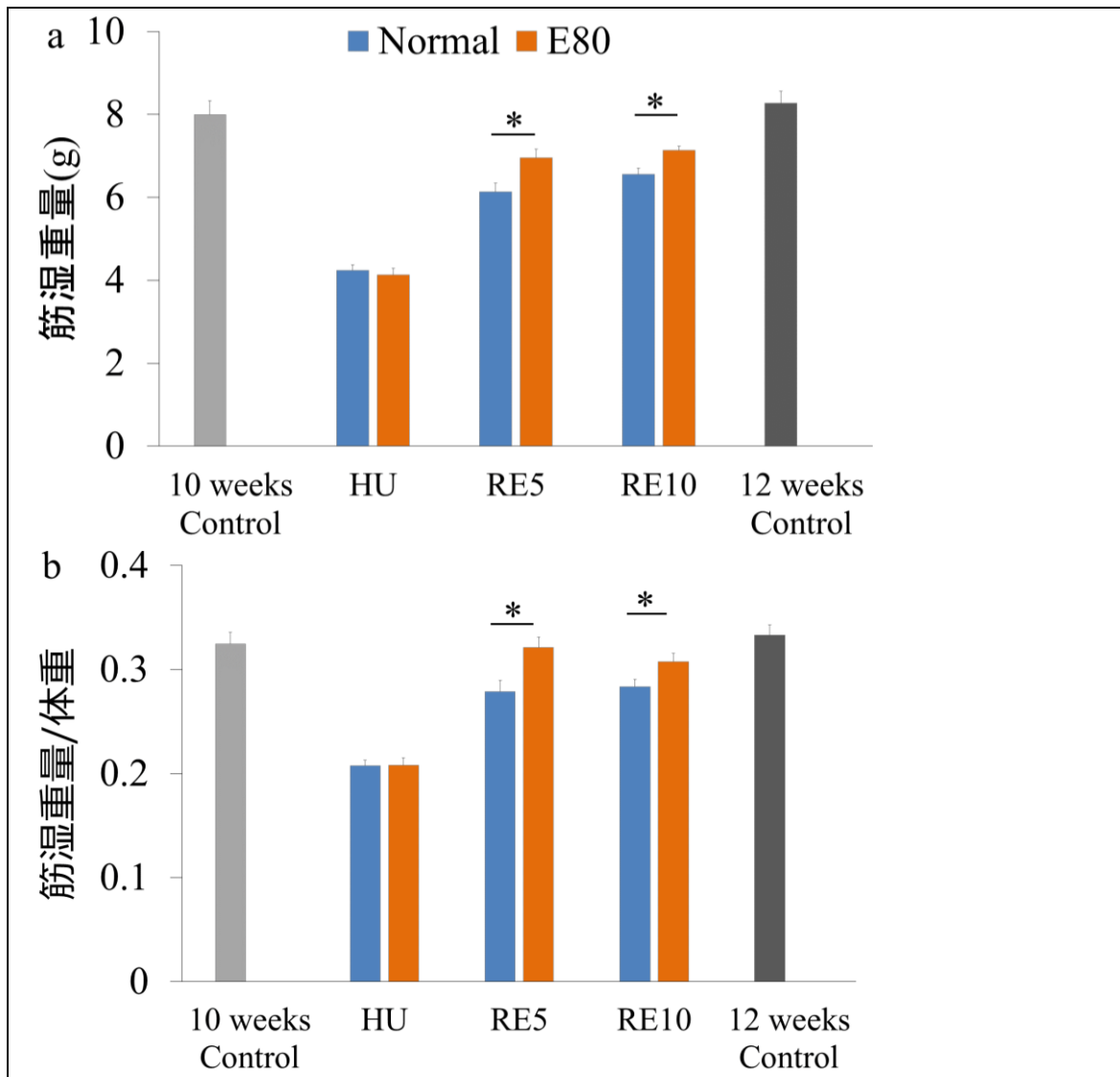


Figure 24

E80 摂取が後肢懸垂による筋萎縮、再接地による筋量回復に与える影響。通常餌で飼育し介入を行なわなかった Control 群 (n=6)、2 週間後肢懸垂を行った Normal\_HU (n=7)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間後肢懸垂マウスを行った E80\_HU (n=7)、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた Normal\_RE (n=7)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた E80\_RE5 (n=7)、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた Normal\_RE10 (n=6)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた E80\_RE10 (n=6)。縦バーは平均値±標準誤差を示す。

筋湿重量と同様に筋線維横断面積のデータを測定した。2週間の後肢懸垂により、ヒラメ筋線維横断面積は40%近くと大きく減少したが、NormalとE80で変化はなかった (Figure 25a)。また、5日間、10日間の再接地で大きく筋線維横断面積が回復し、E80を投与した群が有意に高値を示した (Figure 25a)。しかしながら、筋湿重量及び筋湿重量/体重と同様に筋線維横断面積は10日間の再接地では、同週齢のマウスと同等まで回復しなかった (Figure 25a)。

筋線維横断面積の分布を観察すると、HUではNormalとE80ではほぼ分布が同じである (Figure 25b)。これは筋湿重量や筋線維横断面積が変わらなかったデータと一致している。また、RE5、RE10の分布ではE80を投与した群で右寄りにシフトが起こっている (Figure 25c、d)。これが意味するところは、より太い線維の割合が多いことであるが、筋湿重量や筋線維横断面積がE80で有意に高値だったデータと同じ傾向である。RE10と12 weeks controlの分布を比べると、E80を投与した群は同様の分布に見えるが、右寄りの太い線維が少なく、完全には線維分布が回復していないと考えられる (Figure 25d、e)。また、10 weeks controlと12 weeks controlで筋線維横断面積およびその分布に変化は見られなかった。 (Figure 25a、e)



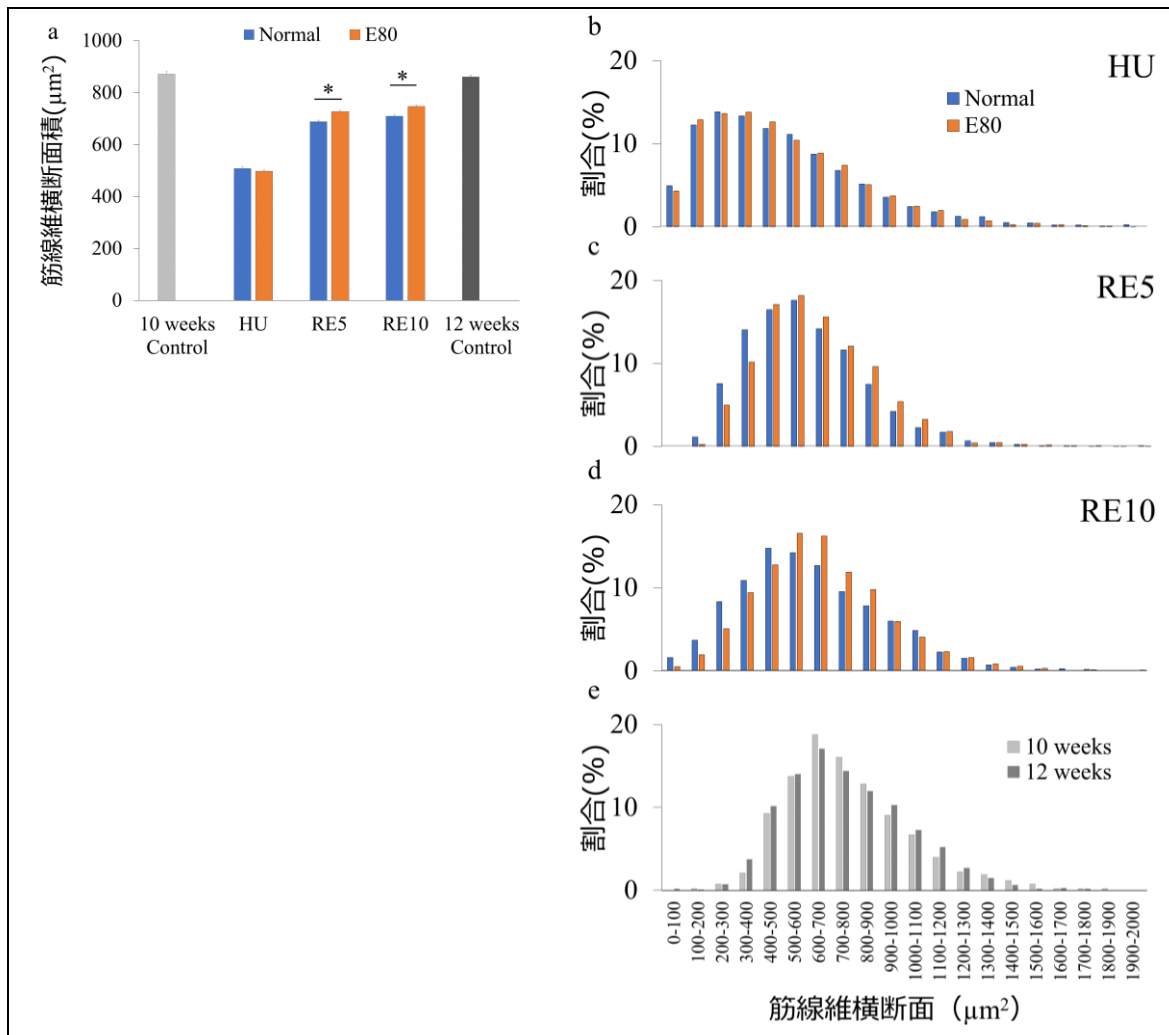


Figure 25

E80 摂取が代償性過負荷による筋肥大に与える影響。筋線維横断面積 (上) と筋線維横断面積の分布 (下 4 つ) を示す。E80 摂取が後肢懸垂による筋萎縮、再接地による筋量回復に与える影響。通常餌で飼育し介入を行なわなかった Control 群 (n=6)、2 週間後肢懸垂を行った Normal\_HU (n=7)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間後肢懸垂マウスを行った E80\_HU (n=7)、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた Normal\_RE5 (n=7)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 5 日間再接地させた E80\_RE5 (n=7)、通常餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた Normal\_RE10 (n=6)、0.5%E80 を含む餌で飼育し 2 週間の後肢懸垂後に 10 日間再接地させた E80\_RE10 (n=6)。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

## ウェスタンブロット

最後に、サンプリングしたヒラメ筋より抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析のデータを示す。今回は、E80の投与で後肢懸垂による筋萎縮が抑制されなかったため、筋量回復で効果が見られたRE5およびRE10のサンプルを解析する。

本研究では、筋肥大に大きな影響を与えているAkt-mTORシグナル及びAkt-mTORシグナルに干渉し筋肥大を与えているAMPKを解析した。E80の投与により、Akt、S6Kが再接地5日後で有意に活性化していた (Figure 26a、 b)。また、S6に関しては、有意差はつかなかったものの、活性化する傾向 ( $p=0.06$ ) はあったと考えている (Figure 26d)。RE5\_E80群では、その他のタンパク質はRE5群と変わらなかった (Figure 26c、 e、 f)。また、RE10群ではすべてのタンパク質のリン酸化レベルに変化はなかった (Figure 26a - f)

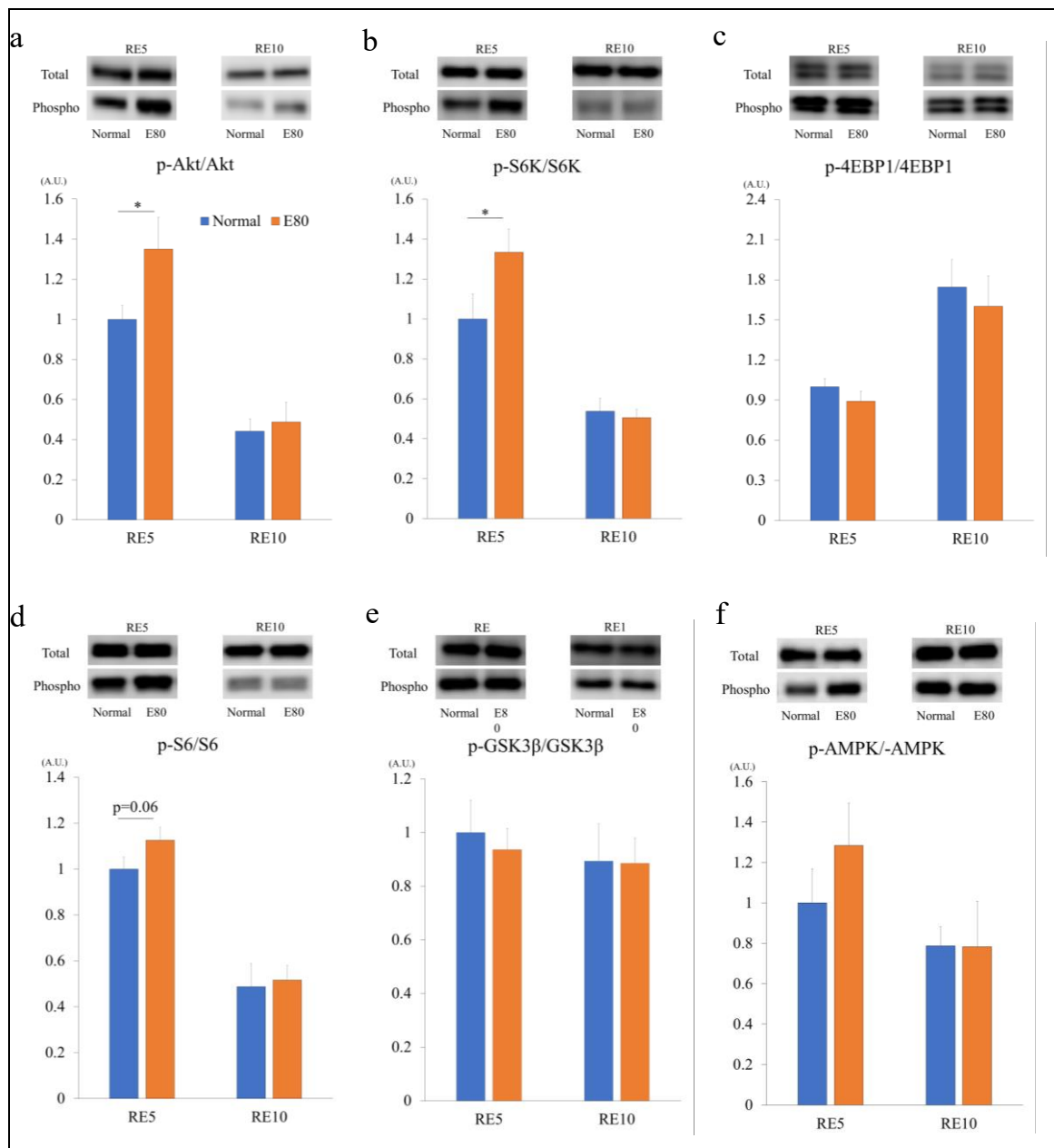


Figure 26

E80 摂取が後肢懸垂による筋萎縮からの筋量回復に伴う、分子シグナルに与える影響。ヒラメ筋のタンパク質のリン酸化レベルを示す。通常餌で飼育し2週間の後肢懸垂後に5日間再接地させた Normal\_RL (n=7) 5、0.5%E80 を含む餌で飼育し2週間の後肢懸垂後に5日間再接地させた E80\_RE5 (n=7)、通常餌で飼育し2週間の後肢懸垂後に10日間再接地させた Normal\_RE10 (n=6)、0.5%E80 を含む餌で飼育し2週間の後肢懸垂後に10日間再接地させた E80\_RE10 (n=6) のデータを示す。縦バーは平均値±標準誤差を示す。\*は有意差 (P < 0.05) を示す。

## 6.4 考察

本実験において、E80 の投与は HU によって誘発される筋萎縮を防ぐことは出来なかったが、再負荷による筋量の回復とそれに伴う Akt と S6K のリン酸化を促進したことが確認された。

再接地による再負荷期間において、E80 の投与はヒラメ筋湿重量、ヒラメ筋湿重量/体重比、CSA の回復を促進した。ただし、これらの指標は、12 weeks control (RE10 と同等の年齢) と同レベルまでは回復しなかった。先行研究で報告されていたように、ヒラメ筋湿重量、ヒラメ筋湿重量/体重比は、7 日間の再負荷ではコントロール群まで回復しなかったが、14 日間の再負荷で回復した<sup>65,67</sup>。さらに、CSA は 14 日間の再負荷後にコントロール群まで回復しなかったが、28 日間の再負荷で回復したことが報告されている<sup>65,67</sup>。これらの指標がコントロールレベルに戻らなかった理由は、マウスの体重がコントロールレベルまで回復しなかったと考えられる。これは、研究課題 1 でも記述したように、再負荷時におけるヒラメ筋に対する刺激は、マウスの体重による機械的負荷である。そのため、本実験では、10 日間の再負荷期間中に、マウスの体重と同様にヒラメ筋湿重量もコントロールと同程度まで回復しなかった。

Akt は、骨格筋肥大において重要な因子であることは先述の通りである。Akt は mTOR の活性化を誘導し、S6K のリン酸化を促す。さ

らに、リン酸化 S6K レベルは、レジスタンストレーニング後の骨格筋肥大の大きさと相関することが報告されている<sup>56</sup>。RE5 の Normal と比較して、RE5 の E80 では Akt と S6K が大きく活性化されていた。さらに、有意差は無かったかが、S6 も活性化していた傾向があった。これらの結果から、E80 は再負荷中にタンパク質合成を促進し、Normal に比べて後肢懸垂による筋萎縮からの筋量を、迅速に回復させたと考えられる。

Akt、S6K、および S6 のリン酸化レベルは、RE10 グループの E80 と Normal の間で差はなかった。いくつかの報告で、これらのタンパク質のリン酸化レベルが約 3 日間の再負荷後に最高に達し、コントロールと同レベルまで徐々に低下することが示唆されている。これらのタンパク質は、RE10 の E80 においても、再負荷の 2~3 日の時点では活性化されていた可能性がある。しかしながら、先述の通り再負荷期間中でも、マウスの体重による物理的負荷は劇的に増加したわけではないので、Akt、S6K、および S6 の活性化もヒラメ筋湿重量が増加するにつれ、徐々に落ち着いたと考えられる。

E80 の投与は、後肢懸垂によって誘発される筋萎縮を防ぐことはできなかった。E80 が除神経による筋萎縮を防ぐどうかを以前に評価したが、この実験と同様に、E80 は筋量の減少を防げなかった (3.1 除神経を行った骨格筋に対する E80 の効果)。これらの実験から、E80 は速筋および遅筋において、廃用性筋萎縮を防ぐ能力は有していないと考えられる。

S6Kのリン酸化に関して、若い男性と比較して高齢男性はレジスタンストレーニングをによる骨格筋のS6Kを活性化が起きにくい<sup>68</sup>。これらの事実は、高齢男性においてはトレーニング誘発性の細胞内タンパク質合成を促進させることは困難であることを示唆している。サルコペニアの主な原因は、筋肉量と機能の段階的な喪失と考えられている<sup>69,70</sup>。もし、E80が高齢者のS6Kリン酸化とタンパク質合成を促進するなら、サルコペニアによる筋量または機能の維持、回復に最適なサプリメントになる可能性があると考えられる。しかしながら、高齢男性とアスリートの両方のサプリメントとしてE80を実用化するには、ヒトに対するE80の効果を評価するさらなる研究が重要である。

## 第七章 総合討議

### ・ E80 がマウス骨格筋に及ぼす影響

本研究では、紅茶由来の高分子ポリフェノール分画である E80 の摂取が過負荷・除負荷を受けた骨格筋量に及ぼす影響を分子運動生理学的に検討した。緑茶や発酵茶由来のポリフェノールで、筋量の増減に影響を与えるものは殆ど報告がなく、特に高分子ポリフェノール分画に着目した研究は皆無であった。E80 は純粋な高分子ポリフェノールではないが、高分子ポリフェノールが持つ筋量コントロールへの有用性について、示唆できたと考える。

研究課題 1 では、E80 が代償性過負荷実験による筋肥大過程において、早期に筋肥大を促進することを明らかにした。また、それに付随して、筋肥大において大きな影響を与えている mTOR シグナルの関与も明らかにした。研究課題 2 では、後肢懸垂による廃用性筋萎縮を抑制することは出来なかったが、再接地による筋量回復を早期に促進することを発見した。また、研究課題 1 と同様に、mTOR シグナルの活性も確認した。研究課題 1、2 とも、E80 が筋肥大や筋量回復を促進したという点において、これら二つの事象はタンパク質合成が促進された結果であるという共通点がある。現に、研究課題 1、2 双方で、E80 を投与した群でタンパク質合成の制御をしている mTOR シグナルの活性化が観察された。タンパク質合成を促進する効果を有する緑茶や発酵茶由来のポリフェノールは、本論文執筆時点で報告はなく、

興味深い発見であったと考える。特に注目すべきは、E80の投与単体では体重増加や筋肥大効果が観察されなかったが、代償性過負荷実験や再負荷による筋量回復実験では、筋量の増加促進効果が確認されたことである。また、筋量増加効果に付随したmTORシグナルの活性化も、実験期間中の早期においてのみ確認されたことである。この点に関して、代償性過負荷実験や後肢懸垂と再接地実験では不可能であったが、マウスの骨格筋に漸増的に負荷を増大させることができれば、E80の長期的な効果も確認できると考えられる。例えば、研究課題1において、mTORシグナルの変化が消失したDay7で、更に負荷を増大させたとき、E80を投与した群でmTORの活性が再度観察され筋肥大が促進されれば、ヒトが行うレジスタンストレーニングに対するサプリメントとして、E80が有用であることが示せる。このような事象を証明するためには、マウスにおいて新たな負荷を調節できる筋肥大系の実験系の確立が必要となる。現在、ハシゴを使用したラダークライミングなどが候補として挙げられているが<sup>71</sup>、今後この実験系の導入を検討したい。

E80の効果のメカニズムとして、本研究ではそのメカニズムの根底の解明には至らなかったが、タンパク質合成が活性化する段階で、それらを制御するmTORのシグナルの促進剤のような効果を有していることは確かであると考えられる。mTORシグナル以外にもタンパク質合成を促進するシグナル経路は知られており、ErkやRSKが知られているが研究課題1でこれらのタンパク質にE80の投与による変化は



確認されなかった<sup>72</sup>。今後、E80 の効果を検証する上で、薬剤等を用いて mTOR シグナルを人為的に活性、あるいは抑制することで、E80 との相互効果を検証すれば、より詳細な分子メカニズムに迫れるのではないかと考える。また、mTOR シグナルの活性と筋肥大促進効果が表れる時期が異なる点において、mTOR はタンパク質合成を促進するスイッチであるが、実際にタンパク質が合成される場所はリボソームであり、合成促進のスイッチと実際の合成速度や量は一致しない。実際に、R. Ogasawara らの実験で、電気刺激により骨格筋に刺激を加えると S6K や S6 は 1 時間~6 時間の間に最も活性化しているが、24 時間後にタンパク質合成は最も促進されている<sup>73</sup>。本研究において、E80 の投与により mTOR が活性化し、次いで筋肥大が促進されたことについて矛盾はないと考えるが、さらなる可能性として E80 が mTOR を活性化し、タンパク質合成そのものを活性化していることも考えられる。先述の通り、mTOR はタンパク質合成のスイッチであり実際にタンパク質が合成されるのはリボソームである。mTOR が活性化してもタンパク質合成が促進されるわけではないのは、タンパク質合成には莫大なエネルギー、つまり ATP が必要であると考えられている<sup>74</sup>。加えて、ATP 産出の要はミトコンドリアである。もし、E80 が mTOR の活性化を促し、それに伴いミトコンドリアにおいて ATP 産出を促し、タンパク質合成を促進していれば、本研究の発端である MAF とのリンクが示唆され、非常に興味深い結果となる。今後は、細胞内のミトコンドリアの動態に焦点を当てた検証も必要であると考え

られる。

本研究においては、紅茶由来の高分子ポリフェノール分画として E80 を用いた。本研究のように、筋肥大や筋量回復促進効果の根底に、高分子ポリフェノールが関与しているかどうかは本論文では明らかにできなかった。しかしながら、緑茶カテキンを茶葉から抽出したポリフェノールオキシダーゼで人工的に酸化させた E80 に似た分画においても、E80 と同様の代償性過負荷による筋肥大促進効果を有すことを確認している（未発表データ）。また、この論文執筆時点で、Eguchi らが行ったような、持久能力向上促進効果についても検証を行っており、先述の MAF と同様に持久能力向上に有益な効果をもたらすことが示唆されている（未発表データ）。このような効果は、複数のロットについて確認されており、この事実から推察されるのは、ある程度酸化・重合し分子量が大きくなったお茶ポリフェノールが、タンパク質合成を促す効果を有するのではないかと推察される。

#### ・紅茶由来ポリフェノール分画がヒトの健康増進に及ぼす影響

ポリフェノールオキシダーゼで人工的に酸化させた分画については、すでにアメリカ合衆国で FDA にサプリメントとして認可されており、NUTRILITE 社より Cholespert という商品名で販売されている。これにより、ヒトに対する安全性についてはある程度担保されているものと考えられる。数年スパンの長期的な影響は不明であるが、元々はお茶に含まれる物質であり、人類は長年緑茶や発酵茶を愛飲しているが常飲レベルでの悪影響は深刻ではないと考えられる。現に、厚生労働

省や FDA、WHO などの公的機関で、お茶ポリフェノールの過剰摂取に対する警告等は殆ど発令されていない。便宜上、本論文では以下 Artificially oxidized polyphenol : AOP と呼称する。組成の特徴としては、E80 のように高分子ポリフェノールを多く含む分画で、カテキンに天然のポリフェノールオキシダーゼを投入し、酸化を促進して作成された分画である。AOP の利点としては、紅茶葉から直接ポリフェノールを抽出する必要がないため、大量に高分子ポリフェノール分画が製造できる。そのため、大量生産によるコスト低減と、茶葉の産地や製造時期によらず、安定して高分子ポリフェノール分画が製造可能である。最近、ヒトに対する AOP の効果の検証を行った。

Eguchi らの報告や本研究において、持久力や筋量の増進効果という違いはあるものの、これらの効果は運動を行う、あるいは負荷を掛けた状態でないと効果が表れないことは共通している。そこで、普段定期的に運動を行っているヒトであれば、その効果が見込めるのではないかと考え、株式会社カーブスジャパンの協力のもとヒト介入試験を行った。研究対象者は中高年女性 (55~69 歳) 70 名とし、AOP がトレーニング効果に及ぼす作用を二重盲検、プラセボコントロール、ランダム化比較試験により検証した。研究期間は 80 日間で、研究対象者は ①カーブスジャパンの施設で週に 2 回以上の規定ワークアウト ②AOP もしくはプラセボを約 1g 毎日飲む ③介入期間の前後に体組成、体力の測定を行うという実験プロセスで、実験を行った。この検証前後で、実験対象者において骨密度、除脂肪量などの体組成指標や

個別の体力指標について測定を行ったが、それぞれ大きな変化は無かった。しかし、身体機能の基礎となる日常生活動作に必要な体力を評価するための指標である「生活体力年齢」という指標において、AOPを摂取した群で有益な傾向が観察された (Figure 27)。「生活体力年齢」は体力測定の項目である、握力 (筋力)、起立時間 (敏捷性)、閉眼片足立ち (平衡性)、長座位体前屈 (柔軟性)、連続上腕屈伸 (筋力)、8の字歩行 (歩行能力)、ファンクショナルリーチ (平衡性)、30秒椅子立ち上がり動作 (筋力) の全ての指標を総合的に評価したものである。

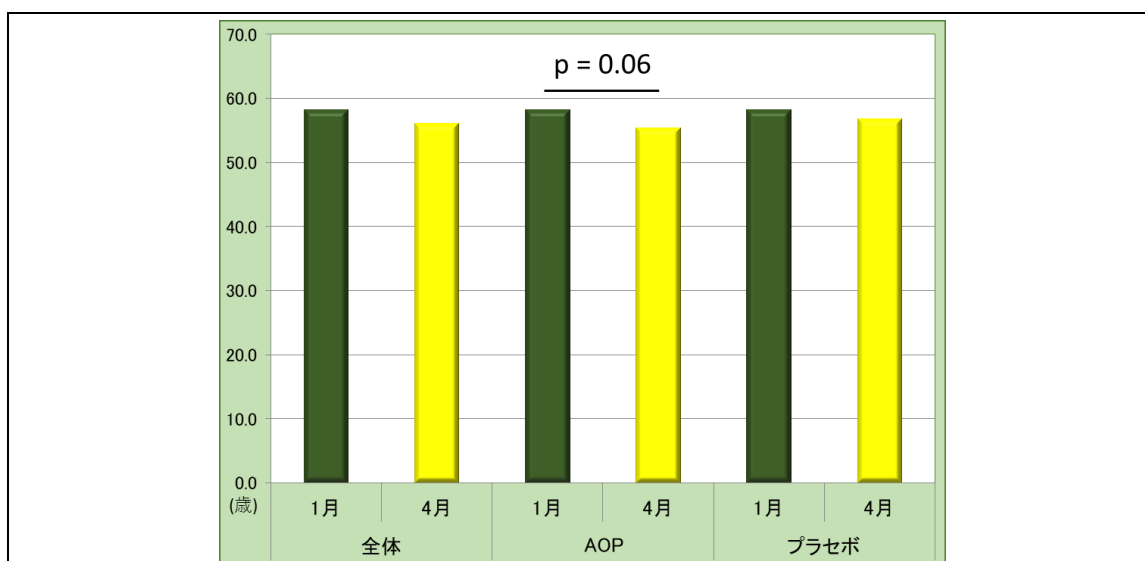


Figure 27 生活体力年齢の結果  
武政ら、2019、体力医学会を一部改編

「生活体力年齢」の算出には、健康づくり・介護予防のための体力測定評価法に記載されている評価式を用いた<sup>75</sup>。この指標は加齢と共に低下しやすい前述の8項目を体力測定の中から選び出し、実年齢との比較から対象者が自身の状態をイメージしやすい形で計算したものの

である<sup>75</sup>。結果は研究対象者全体として、生活体力年齢は減少しており、定期的な運動の効果は観察されている。さらに、AOPを運動と併用していた群の方がプラセボ群に比べて若返り効果は顕著であった。今回のヒト介入試験に参加した研究対象者が長年同じ規定運動をおこなっていたことを考慮すれば、AOPは何かしら中高年の女性に対して、総合的な体力指標の向上効果を有していると考えられる。この研究は、発酵茶ポリフェノールがヒトに対して与える効果について、初めて検証を行った先駆的研究となった。このヒト介入試験の結果は「運動による生活体力の維持ないし増進効果の増強剤」という名称で特許出願も行った（特願 2019\_150774）。さらに今後、現役アスリートに対してAOPが持久力増強ないし筋肥大促進効果があるのか、ヒト介入試験を計画している。

本研究やその他の実験で、何故負荷を掛けないとその効果が表れないか、ということに関しては現状では理由を示すことはできない。高分子ポリフェノールに関する研究はまだ浅く、有益な効果をもたらすことは確かであるが、そのメカニズムについての蓄積は殆どないため、それらは今後の課題となっている。しかし、予備検討や本論文、ヒトを含めたその他の実験結果から、高分子ポリフェノールを含む分画は生体に対し、有益な効果をもたらすことは間違いないと考えられる。今後、高分子ポリフェノールの有効活用のため、ヒトにおける効果の検証を進め、アスリートのパフォーマンス増強サプリメントもしくは運動愛好家の健康増進サプリメントとしての有用性を示そうと考

えている。

## 第八章 結論

紅茶由来高分子ポリフェノール分画である E80 は、マウスにおける代償性過負荷による筋肥大を促進しさらに、廃用性筋萎縮からの再負荷による筋量回復も早期に促進した。一方、除神経や後肢懸垂による廃用性筋萎縮の抑制は出来なかった。代償性過負荷による筋肥大および、廃用性筋萎縮からの筋量回復促進過程で、タンパク質合成を制御している主因子である mTOR シグナルの活性化が観察された。

## 謝辞

本稿を終えるに当たり、終始懇篤な御指導・御校閲を賜りました武政徹教授に深く感謝申し上げます。また、御多忙の中、審査をお引き受け頂いた麻見直美准教授、藤井直人助教には、貴重な御意見御指導を頂きました。急なお願いにもかかわらず、専攻外副査をお引き受け頂いた前田清司先生には感謝に堪えません。また、沼田治特命教授には、学群生時代からお世話になり、博士の学位まで面倒を見て頂くことになり、大変感謝しております。E80の提供をして下さった小澤哲夫先生には、大変お世話になりました。諸先生方に深く御礼申し上げます。

最後に、研究の糧になった全ての実験動物に対し、深く感謝と哀悼の意を表します。



## 参考文献

- 1 Tipton, K. D., Ferrando, A. A., Phillips, S. M., Doyle, D., Jr. & Wolfe, R. R. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *The American journal of physiology* **276**, E628-634, doi:10.1152/ajpendo.1999.276.4.E628 (1999).
- 2 Volpi, E., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Mittendorfer, B. & Wolfe, R. R. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *The American journal of clinical nutrition* **78**, 250-258, doi:10.1093/ajcn/78.2.250 (2003).
- 3 Ivy, J. L., Res, P. T., Sprague, R. C. & Widzer, M. O. Effect of a carbohydrate-protein supplement on endurance performance during exercise of varying intensity. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **13**, 382-395 (2003).
- 4 Kang, S. W. *et al.* Oligomerized lychee fruit extract (OLFE) and a mixture of vitamin C and vitamin E for endurance capacity in a double blind randomized controlled trial. *J Clin Biochem Nutr* **50**, 106-113, doi:10.3164/jcbtn.11-46 (2012).
- 5 Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P. & Horoszkiewicz-Hassan, M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting

- from an incremental rowing ergometer exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **15**, 48-58 (2005).
- 6 Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C. & Ravussin, E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest* **86**, 1423-1427, doi:10.1172/JCI114857 (1990).
- 7 DeFronzo, R. A. *et al.* The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* **30**, 1000-1007, doi:10.2337/diab.30.12.1000 (1981).
- 8 Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* **17**, 162-184, doi:10.1016/j.cmet.2012.12.012 (2013).
- 9 Costill, D. L. *et al.* Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J Appl Physiol* **40**, 149-154, doi:10.1152/jappl.1976.40.2.149 (1976).
- 10 Widrick, J. J., Stelzer, J. E., Shoepe, T. C. & Garner, D. P. Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R408-416, doi:10.1152/ajpregu.00120.2002 (2002).
- 11 Zhang, L. *et al.* Skeletal Muscle-Specific Overexpression of PGC-1 $\alpha$  Induces Fiber-Type Conversion through Enhanced Mitochondrial Respiration and Fatty Acid Oxidation in Mice and Pigs.

- Int J Biol Sci* **13**, 1152-1162, doi:10.7150/ijbs.20132 (2017).
- 12 Stewart, C. E. & Rittweger, J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **6**, 73-86 (2006).
- 13 Fernandes, T., Ursula, S. P. R., Stephano, M. F. S., Cleber, A. R. & Edilamaar, O. M. Signaling Pathways that Mediate Skeletal Muscle Hypertrophy: Effects of Exercise Training. *INTECH Open Access Publisher*, doi:10.5772/51087 (2012).
- 14 Dummler, B. *et al.* Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* **26**, 8042-8051, doi:10.1128/MCB.00722-06 (2006).
- 15 Guertin, D. A. *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* **11**, 859-871, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007 (2006).
- 16 Bentzinger, C. F. *et al.* Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* **8**, 411-424, doi:10.1016/j.cmet.2008.10.002 (2008).
- 17 Wall, B. T., Dirks, M. L. & van Loon, L. J. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia.

- Ageing Res Rev* **12**, 898-906, doi:10.1016/j.arr.2013.07.003 (2013).
- 18 Goodman, C. A. & Hornberger, T. A. New roles for Smad signaling and phosphatidic acid in the regulation of skeletal muscle mass. *F1000Prime Rep* **6**, 20, doi:10.12703/P6-20 (2014).
- 19 Lessard, S. J. *et al.* JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition. *Nat Commun* **9**, 3030, doi:10.1038/s41467-018-05439-3 (2018).
- 20 Zimmers, T. A. *et al.* Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488, doi:10.1126/science.1069525 (2002).
- 21 Haidet, A. M. *et al.* Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4318-4322, doi:10.1073/pnas.0709144105 (2008).
- 22 Tando, T. *et al.* Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. *The Journal of biological chemistry* **291**, 12184-12194, doi:10.1074/jbc.M115.680579 (2016).
- 23 Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massague, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211-223,

doi:10.1016/s0092-8674(04)00298-3 (2004).

- 24 Sandri, M. *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412, doi:10.1016/s0092-8674(04)00400-3 (2004).
- 25 Sanchez, A. M., Candau, R. B. & Bernardi, H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci* **71**, 1657-1671, doi:10.1007/s00018-013-1513-z (2014).
- 26 Labeit, S. *et al.* Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 693741, doi:10.1155/2010/693741 (2010).
- 27 Gomes, A. V. *et al.* Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 2986-2999, doi:10.1096/fj.12-204495 (2012).
- 28 Greer, E. L. *et al.* The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* **282**, 30107-30119, doi:10.1074/jbc.M705325200 (2007).
- 29 Egawa, T. *et al.* AMPK-Mediated Regulation of Protein Degradation

- Systems in Unloaded Mouse Skeletal Muscle. *Juntendo Medical Journal* **62**, 172-178, doi:10.14789/jmj.62.s172 (2016).
- 30 Weisburger, J. H. Tea and health: a historical perspective. *Cancer letters* **114**, 315-317 (1997).
- 31 Yang, C. S., Zhang, J., Zhang, L., Huang, J. & Wang, Y. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol Nutr Food Res* **60**, 160-174, doi:10.1002/mnfr.201500428 (2016).
- 32 Sang, S., Lambert, J. D., Ho, C. T. & Yang, C. S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol Res* **64**, 87-99, doi:10.1016/j.phrs.2011.02.007 (2011).
- 33 Mulder, T. P., van Platerink, C. J., Wijnand Schuyl, P. J. & van Amelsvoort, J. M. Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **760**, 271-279, doi:10.1016/s0378-4347(01)00285-7 (2001).
- 34 Kudo, N. *et al.* A Single Oral Administration of Theaflavins Increases Energy Expenditure and the Expression of Metabolic Genes. *PloS one* **10**, e0137809, doi:10.1371/journal.pone.0137809 (2015).
- 35 Eguchi, T. *et al.* Black tea high-molecular-weight polyphenol stimulates exercise training-induced improvement of endurance capacity in mouse via the link between AMPK and GLUT4. *PloS one* **8**, e69480, doi:10.1371/journal.pone.0069480 (2013).

- 36 Komatsu, T. *et al.* Oolong tea increases energy metabolism in Japanese females. *J Med Invest* **50**, 170-175 (2003).
- 37 Patel, H. & Bhardwaj, A. in *StatPearls* (2019).
- 38 Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C. & Farese, R. V., Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* **18**, 153-161, doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017 (2013).
- 39 Kastaniotis, A. J. *et al.* Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1862**, 39-48, doi:10.1016/j.bbalip.2016.08.011 (2017).
- 40 Fujihara, T., Nakagawa-Izumi, A., Ozawa, T. & Numata, O. High-molecular-weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **71**, 711-719, doi:10.1271/bbb.60562 (2007).
- 41 Zorova, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry* **552**, 50-59, doi:10.1016/j.ab.2017.07.009 (2018).
- 42 Chaouali, N. *et al.* Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (*Prunus amygdalus*), Apricot Kernels (*Prunus armeniaca*), and Almond Syrup. *ISRN Toxicology* **2013**, 1-6, doi:10.1155/2013/610648 (2013).
- 43 Booth, F. W., Ruegsegger, G. N., Toedebusch, R. G. & Yan, Z. Endurance Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle

- Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* **135**, 129-151,  
doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.016 (2015).
- 44 Lundby, C. & Jacobs, R. A. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol* **101**, 17-22,  
doi:10.1113/EP085319 (2016).
- 45 Holecek, M. Muscle wasting in animal models of severe illness. *Int J Exp Pathol* **93**, 157-171, doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00812.x  
(2012).
- 46 Miyazawa, T., Nakagawa, K. & Asai, A. Biodynamics of Natural Antioxidants in Humans. *Kagaku To Seibutsu* **38**, 104-114,  
doi:10.1271/kagakutoseibutsu1962.38.104 (2000).
- 47 Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708,  
doi:10.1126/science.1065874 (2001).
- 48 Carnac, G., Vernus, B. & Bonnieu, A. Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle. *Curr Genomics* **8**, 415-422,  
doi:10.2174/138920207783591672 (2007).
- 49 MacDonald, E. M. *et al.* Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *Dis Model Mech* **7**, 471-481, doi:10.1242/dmm.014126 (2014).
- 50 De Castro, F. M. P., Aquino, R., Berti, J. A., Gonçalves, L. G. C. & Puggina, E. F. Strength Training with Vascular Occlusion: A Review of



Possible Adaptive Mechanisms. *Human Movement* **18**,

doi:10.1515/humo-2017-0010 (2017).

- 51 Bertaglia, E., Coletto, L. & Sandri, M. Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C587-596, doi:10.1152/ajpcell.00142.2011 (2012).
- 52 White, J. P. *et al.* Overload-induced skeletal muscle extracellular matrix remodelling and myofibre growth in mice lacking IL-6. *Acta Physiol (Oxf)* **197**, 321-332, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02029.x (2009).
- 53 Bodine, S. C. Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2200-2208, doi:10.1016/j.biocel.2013.06.011 (2013).
- 54 Baldwin, K. M., Cheadle, W. G., Martinez, O. M. & Cooke, D. A. Effect of functional overload on enzyme levels in different types of skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **42**, 312-317, doi:10.1152/jappl.1977.42.2.312 (1977).
- 55 Desaulniers, P., Lavoie, P. A. & Gardiner, P. F. Effect of rat soleus muscle overload on neuromuscular transmission efficacy during continuous and intermittent activation. *Exp Physiol* **90**, 333-340, doi:10.1113/expphysiol.2004.029132 (2005).
- 56 Baar, K. & Esser, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *The American journal of physiology* **276**, C120-127 (1999).

- 57 Terzis, G. *et al.* The degree of p70 S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. *European journal of applied physiology* **110**, 835-843, doi:10.1007/s00421-010-1527-2 (2010).
- 58 Chaillou, T. *et al.* Hypoxia transiently affects skeletal muscle hypertrophy in a functional overload model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**, R643-654, doi:10.1152/ajpregu.00262.2011 (2012).
- 59 Dirks, M. L. *et al.* One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes* **65**, 2862-2875, doi:10.2337/db15-1661 (2016).
- 60 Vandeburgh, H., Chromiak, J., Shansky, J., Del Totto, M. & Lemaire, J. Space travel directly induces skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1031-1038 (1999).
- 61 Fitts, R. H., Riley, D. R. & Widrick, J. J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *The Journal of experimental biology* **204**, 3201-3208 (2001).
- 62 Adams, G. R., Caiozzo, V. J. & Baldwin, K. M. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *Journal of applied physiology* **95**, 2185-2201,

doi:10.1152/jappphysiol.00346.2003 (2003).

- 63 Powers, S. K., Lynch, G. S., Murphy, K. T., Reid, M. B. & Zijdwind, I. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc* **48**, 2307-2319, doi:10.1249/MSS.0000000000000975 (2016).
- 64 Kortebein, P. *et al.* Functional impact of 10 days of bed rest in healthy older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 1076-1081, doi:10.1093/gerona/63.10.1076 (2008).
- 65 Xia, L., Cheung, K. K., Yeung, S. S. & Yeung, E. W. The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy. *The Journal of physiology* **594**, 3111-3126, doi:10.1113/JP271705 (2016).
- 66 Globus, R. K. & Morey-Holton, E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *Journal of applied physiology* **120**, 1196-1206, doi:10.1152/jappphysiol.00997.2015 (2016).
- 67 Zhang, B. T., Yeung, S. S., Cheung, K. K., Chai, Z. Y. & Yeung, E. W. Adaptive responses of TRPC1 and TRPC3 during skeletal muscle atrophy and regrowth. *Muscle Nerve* **49**, 691-699, doi:10.1002/mus.23952 (2014).
- 68 McGee, S. L., Mustard, K. J., Hardie, D. G. & Baar, K. Normal hypertrophy accompanied by phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1

- knockout mice. *The Journal of physiology* **586**, 1731-1741,  
doi:10.1113/jphysiol.2007.143685 (2008).
- 69 Fielding, R. A. *et al.* Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association* **12**, 249-256,  
doi:10.1016/j.jamda.2011.01.003 (2011).
- 70 Spangenburg, E. E. & Booth, F. W. Leukemia inhibitory factor restores the hypertrophic response to increased loading in the LIF(-/-) mouse. *Cytokine* **34**, 125-130,  
doi:10.1016/j.cyto.2006.05.001 (2006).
- 71 Kraemer, W. J. *et al.* Resistance exercise induces region-specific adaptations in anterior pituitary gland structure and function in rats. *Journal of applied physiology* **115**, 1641-1647,  
doi:10.1152/jappphysiol.00687.2013 (2013).
- 72 Carriere, A., Ray, H., Blenis, J. & Roux, P. P. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* **13**, 4258-4275, doi:10.2741/3003 (2008).
- 73 Ogasawara, R. *et al.* The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. *Sci Rep* **6**, 31142, doi:10.1038/srep31142 (2016).
- 74 Stouthamer, A. H. A theoretical study on the amount of ATP required

for synthesis of microbial cell material. *Antonie Van Leeuwenhoek* **39**,  
545-565, doi:10.1007/bf02578899 (1973).

75 田中喜代次, 木塚朝博 & 大蔵倫博. 128-133 (金芳堂, 2013).