

博士論文

論文題目 生活習慣病と筋萎縮に対するフラボノイドの
予防機能およびその作用機構に関する研究

氏名 青山 晋也

目次

序論	1
第一章 フラボノイドの摂取が生活習慣病モデルマウスに及ぼす影響の解析	16
緒言	17
第一節 フラボノイドの摂取が 高脂肪食誘導性肥満マウスに及ぼす影響の解析	
1-1-1 方法	18
1-1-2 結果	20
考察	23
図表	27
第二節 ケルセチンの摂取が 西洋型食誘導性肥満マウスに及ぼす影響の解析	
1-2-1 方法	35
1-2-2 結果	41
考察	44
図表	48
第二章 フラボノイドの摂取が廃用性筋萎縮モデル動物に及ぼす影響の解析	70
緒言	71
第一節 フラボノイドの摂取が 坐骨神経切除誘導性筋萎縮ラットに及ぼす影響の解析①	
2-1-1 方法	73
2-1-2 結果	74
第二節 フラボノイドの摂取が 坐骨神経切除誘導性筋萎縮ラットに及ぼす影響の解析②	
2-2-1 方法	75
2-2-2 結果	79
第三節 考察	81
図表	86

第三章　ゲニステイン摂取による廃用性筋萎縮予防効果の作用機構の解析	105
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 106
第一節　ゲニステインの廃用性筋萎縮予防作用における エストロゲン受容体の関与について	
3-1-1 方法	・ ・ ・ ・ ・ 108
3-1-2 結果	・ ・ ・ ・ ・ 110
第二節　廃用性筋萎縮予防作用に関わる エストロゲン受容体アイソフォームについて	
3-2-1 方法	・ ・ ・ ・ ・ 111
3-2-2 結果	・ ・ ・ ・ ・ 112
第三節　考察	・ ・ ・ ・ ・ 113
図表	・ ・ ・ ・ ・ 116
総合考察	・ ・ ・ ・ ・ 124
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 137
論文要旨	
謝辞	

序 論

序論

日本の高齢者人口（平成 23 年 9 月 15 日推計）は 2980 万人であり、総人口に占める割合は 23.3%となっている。これは人口、割合ともに過去最高の数値であり、世界に類を見ない水準に到達している。2007 年に日本は高齢者人口が 22%となり、超高齢化社会を迎えている。それに伴い、支援・介護を必要とする人が急増している。高齢化に伴う健康問題としては、種々の疾患リスクの増加や、それに伴う医療費の増加等が挙げられ、健康寿命の延伸や要介護状態を回避することは非常に重要である。これらを阻害する因子としてメタボリックシンドロームとロコモティブシンドロームがあり、これらは認知症と合わせて健康寿命、介護予防を阻害する 3 大因子とされている。

メタボリックシンドローム

近年の食生活の乱れや運動不足の増加に伴い、メタボリックシンドロームが急増している。メタボリックシンドロームとは過食と運動不足等による内臓脂肪の蓄積により、血糖、血圧、血中脂質が上昇し、心臓病や脳卒中などの動脈硬化性疾患のリスクファクターとなる病態である。ウエスト周囲径が男性 85 cm、女性 90 cm 以上、尚且つ高血糖、高血圧および脂質異常の 3 つのうち 2 つ当てはまるとメタボリックシンドロームと診断される。したがって、これら病態の悪化は糖尿病、高血圧や脂質異常症を発症し、その進行を促進する。また、これらは合併頻度が高く、心臓病や脳卒中などといった動脈硬化性疾患のリスクを高めることがわかっている（Fig. 0-1）。肥満、糖尿病、高血圧や脂質異常症は代表的な生活習慣病であり、生活習慣病とは生活習慣の乱れ（食生活の乱れや運動不足、喫煙等）により発症する疾患の総称である。以下に本研究で注目している肥満症、糖尿病、脂質異常症について述べる。

肥満症

肥満とは、体に脂肪（トリアシルグリセロール）が過剰に蓄積して、脂肪組織の占める割合が異常に増加した状態をいい、体脂肪率が男性で 25%以上、女性で 30%以上になると肥満と判定する。

肥満は体内のエネルギーの摂取と消費のバランスが崩れ、摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ったときに過剰なエネルギーが脂肪に変換されることによって生じる。これは過食、摂食パターン、運動不足、エネルギー代謝機能障害、遺伝的素因等の複数の因子により引き起こされる。また、体内に蓄積された余剰な脂肪組織はアディポサイトカイン（レプチン、アディポネクチン、

TNF- α 等)の分泌異常を引き起こし、インスリン抵抗性を引き起こすことがわかっている。肥満症は糖尿病や脂質異常症等との合併頻度が高く、これには肥満により生じたインスリン抵抗性が関わっていることが明らかとなっている。

糖尿病

糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的不足によって起こる代謝性疾患であり、その代表的な病態は高血糖と尿糖であり、空腹時や常時血糖値または耐糖能負荷試験により診断される。我が国の糖尿病患者数は厚生労働省の糖尿病実態調査(平成14年11月)によると、予備軍を含め1,620万人と推定され、成人の6.3人に1人の割合に達している。糖尿病は主に1型と2型に分けられ、前者はインスリンの分泌不全により引き起こされ、その数は糖尿病患者の5~10%とされている。一方、2型糖尿病はインスリンの作用不全(インスリン抵抗性)により引き起こされ、その数は全糖尿病患者の90%以上とされている。2型糖尿病は主に過食や偏食、運動不足に伴うインスリン抵抗性が原因であると考えられており、その治療法は食事療法、運動療法と薬物療法である。薬物療法は、食事療法と併用されており、予防・改善には食生活の改善が最も重要であると考えられている。

脂質異常症

脂質異常症は血中脂質(コレステロール、トリアシルグリセロール(TG)、リン脂質、遊離脂肪酸など)のうち、一つまたはそれ以上の成分が増加した状態をいい、一般に、高コレステロール血症と高TG血症が動脈硬化症との関連で重要と言われている。脂質は水溶性ではないため、体内ではアポタンパク質と結合したリポタンパク質の形で存在する。リポタンパク質は、その脂質組成比の割合によって、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質(VLDL)、中間密度リポタンパク質(IDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、高密度リポタンパク質(HDL)に分類される。これら、リポタンパク質の異常も脂質異常症と診断され、特に高LDLコレステロール血症と低HDLコレステロール血症は動脈硬化症のリスクを上げると考えられている。

厚生労働省の平成22年国民健康・栄養調査より血清総コレステロール値は男女とも平成12年に比べて増加しており、脂質異常症が疑われる人は男性22.3%、女性17.7%の割合に達している。

ロコモティブシンドローム

ロコモティブシンドロームとは運動器(骨、関節、筋肉等)の障害により要介護になるリスクの高い状態をいい、2007年に日本整形外科学会が提唱したものである(Fig. 0-2)。これは主に運動器自体の疾患と加齢による運動器機能不

全により引き起こされると考えられており、前者は加齢に伴う変形性関節症や骨粗鬆症に伴う運動器疾患を指し、後者は加齢に伴う身体機能の衰えやバランス機能の低下などが含まれる。ロコモティブシンドロームの患者数は明らかではないが、加齢や運動不足または生活習慣により引き起こされる運動器疾患の代表的なものである変形性関節炎および骨粗鬆症の患者は、4700 万人とされ、国民病ともいえる。

骨格筋は体を動かすために重要な組織であり、生体内で最大の組織である。骨格筋量は筋タンパク質の合成と分解により調節されており、筋タンパク質の分解が合成を上回り、筋肉量が減少（萎縮）した状態を筋萎縮という。筋萎縮は、加齢や神経疾患、癌、糖尿病、悪液質等の様々な要因により発症するが、超高齢化社会の日本においては、特に加齢によるサルコペニアや寝たきり等による廃用性筋萎縮の増加が懸念されている。その対策としては運動療法が挙げられるが、まだ有効的な治療法が確立されていない疾患であり、その予防法、治療法の開発が注目されている。

機能性食品

メタボリックシンドロームやロコモティブシンドロームの病態・疾患は多因子性かつ慢性的な特徴を持つ。高齢者の健康寿命の延伸や要介護状態の回避には予防または早期発見・早期治療が非常に重要であり、その予防として食生活の改善や運動習慣への注目が集まっている。

食品には、1 次機能として栄養効果、2 次機能としてのおいしさだけでなく、3 次機能としての体調調節機能が存在し、日々の食物に含まれる有効成分を意識して摂取することにより健康増進を目指す機能性食品の開発が行われている。機能性食品の素材となりうる食品成分の研究も進み、多くの機能性成分が注目されるようになってきた。その一つとしてフラボノイドが挙げられる。

フラボノイド

フラボノイドはフラバン(2つのベンゼン環が3つの炭素で繋がった $C_6-C_3-C_6$ 構造)を基本骨格とする有機化合物の総称である (Fig. 0-3A)。フラボノイドはポリフェノール的一种であり、ポリフェノールとは、同一分子内に二個以上のフェノール性水酸基を持つ化合物の総称である。フラボノイドはフラバン骨格への水酸基 ($-OH$) の付き方等により以下のようにさらに 9 種に分類され (Fig. 0-3B、Table 0-1)、現在までにフラボノイドに分類される化合物は 7,000 種以上が報告されている (Markham, 2005)。数多くのフラボノイドの中で、イソフラボンに属すゲニステインやダイゼイン、またフラボノールに属すケルセチンは各種疾病予防作用が多く報告されている。以下にその特徴および代表的な生理作用を挙げる。

イソフラボンについて

イソフラボンは、マメ科植物に多く見られ、大豆からの摂取が主な補給源であると考えられている。その他に葛根、ムラサキツユクサ（レッドクローバー）に含まれることがわかっている。イソフラボンには幾つかの生理活性がある事が報告されており、疫学的研究において、心臓疾患脂肪率(Anthony *et al.*, 1998)、骨粗鬆症発症率(Knight and Eden, 1996)、乳がん死亡率(Adlercreutz *et al.*, 1991)、前立腺がん死亡率(Severson *et al.*, 1989)が欧米人と比較して日本人では低いという事実には大豆摂取量との関係があり、またそれは大豆中に含有するイソフラボンに起因する可能性が示唆されている。また、大豆イソフラボンの *in vitro* あるいは *in vivo* での評価においても、エストロゲン様作用(Kuiper *et al.*, 1998)、抗酸化作用(Pratt and Birac, 1979)、骨吸収抑制作用(Kuiper *et al.*, 1998)、乳がん細胞増殖抑制作用(Peterson and Barnes, 1991)、前立腺がん細胞増殖抑制作用(Naik *et al.*, 1994)を有することが報告されている。これらの作用にはイソフラボンがアグリコンの型で作用していると考えられているものも少なくないが、イソフラボンは吸収の過程で代謝を受けることが明らかとなっている。

ゲニステインとダイゼインの構造と機能性

ゲニステインおよびダイゼインはイソフラボンの一種であり、上述の通りマメ科の植物に多く含まれる。ゲニステインの IUPAC 名は 5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-one で、分子量は 270 である。一方、ダイゼインの IUPAC 名は 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-one で、分子量は 254.24 である。構造は Fig. 0-4A, B に示した。構造がエストロゲンと類似していることから、エストロゲン受容体へ結合し、エストロゲン様作用を示すことが知られている(Kanno *et al.*, 2003; Kuiper *et al.*, 1998)。Table 0-2 にエストロゲン、各種イソフラボンおよびその代謝産物と、ヒトのエストロゲンレセプター α または β との親和性と転写活性についてまとめた。ゲニステインがエストロゲン様作用を呈する例として、Ishimi *et al.*は卵巣摘出マウスを用いた実験で、ゲニステインが骨に対しエストロゲン様作用を呈することで骨代謝を改善することを報告している(Ishimi *et al.*, 2000)。また、Rufer と Kulling によりゲニステインやダイゼイン、その代謝産物が抗酸化作用を持つことが報告されている(Rufer and Kulling, 2006)。このような抗酸化作用は脂質の過酸化を防ぎ動脈硬化の予防などに役立つと思われ、また癌化に働くラジカル作用を抗酸化能によって中和する可能性にも期待が集められている。さらに糖尿病や脂質異常症など肥満を成因とした生活習慣病に対する予防効果や代謝改善作用も報告されている(Ae Park *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006)。

ゲニステイン・ダイゼインの代謝・吸収

大豆イソフラボンの配糖体は、口腔では唾液(Walle *et al.*, 2005)の酵素、腸管では小腸粘膜(Wilkinson *et al.*, 2003)の酵素や腸内細菌の β -グルコシダーゼにより分解され、ダイゼイン、ゲニステイン等のアグリコンが生成される(Rowland *et al.*, 2003)。腸管から吸収されたアグリコンやその代謝物は門脈を経て肝臓にて抱合（グルクロン酸抱合や硫酸抱合）を受ける。グルクロン酸抱合体は胆汁とともに腸管へ分泌され、腸内細菌等に再度脱抱合を受け、吸収される。一部はアグリコンのまま体内を循環し、腎臓を経由して尿中に排泄される。ダイゼインはエクオールにゲニステインはジヒドロゲニステインに代謝される（Fig. 0-5）。

ケルセチンの構造と機能性

ケルセチンは多くの野菜に含まれるフラボノールの一種である。特にタマネギに多く含まれており、西洋諸国におけるケルセチンの1日の摂取量は10-20 mgと言われている(Hertog *et al.*, 1993)。ケルセチンのIUPAC名は2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-oneで、分子量は302.236である（Fig. 0-4C）。また、動物実験や培養細胞を用いた研究によると、抗粥状動脈硬化作用、抗発癌作用等の様々な生理作用を有することが報告されている(Aviram and Fuhrman, 2002; Galati and O'Brien, 2004; Hollman and Katan, 1998; Murakami *et al.*, 2008; Ramos, 2007; Terao *et al.*, 2008; Youdim *et al.*, 2004; Youdim *et al.*, 2002)。これらケルセチンの様々な生理作用のうち抗酸化作用は良く知られている。これにはケルセチンがポリフェノール化合物であるということと、カテコール構造を持つことが重要であると考えられている。ポリフェノール化合物は活性酸素種（ROS）消去能を有しているだけでなく、ROS合成酵素（xanthine oxidase, lipoxygenase）の阻害活性を有することが分かっている(Rice-Evans *et al.*, 1996; Terao, 2009)。一方、カテコール構造は酸化過程において産生されたROSによって酸化促進剤に変化することが分かっている(Metodiewa *et al.*, 1999)。この酸化促進作用が、レドックス制御経路等を活性化し、抗酸化酵素（HO-1; heme oxygenase-1, GPx; glutathione peroxidase）の発現を増加すると考えられている(Williams *et al.*, 2004)。また、ケルセチンには生活習慣病のリスク低減機能が *in vitro* あるいは *in vivo* での評価において報告されており、抗糖尿病効果(Jeong *et al.*, 2012)、脂肪肝抑制効果(Kobori *et al.*, 2011)、抗炎症作用(Chirumbolo, 2010)、抗肥満(Jung *et al.*, 2013)、抗高血圧効果(Duarte *et al.*, 2001)等の様々な効果が報告されている。ケルセチンもまた、ゲニステインと同様に摂取から吸収、排泄といった過程において代謝されることが明らかとなっている。

ケルセチンの代謝・吸収

植物中に含まれるケルセチンのほとんどはグルコースが結合したケルセチン配糖体であり、口腔内では唾液の酵素によりアグリコンに代謝されることがわかっている(Walle *et al.*, 2005)。また、腸管ではケルセチン配糖体は小腸上皮のナトリウム依存性グルコーストランスポーター (SGLT-1) を介して吸収されることや、ラクトースフロリジンヒドロラーゼ (LPH) によりアグリコンに代謝され、吸収されることが知られている(Day *et al.*, 2000)。配糖体で吸収された場合、小腸上皮細胞内で細胞内 β -グルコシダーゼによりアグリコンへと変換されるか、多剤耐性関連タンパク 2 (MRP-2) を介して管腔側へ放出される。アグリコンは脂溶性が高いため、受動輸送で細胞内へ移動すると考えられている。ケルセチンは腸管吸収とともに代謝を受けることがわかっており、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体へと変換され、門脈を通過し肝臓へと到達する (Fig. 0-6)。一部のケルセチンは腸管での吸収後、リンパを通して体内へ移行することも明らかとなっている(Murota and Terao, 2005)。肝臓では抱合体は脱抱合後、再抱合 (硫酸抱合やグルクロン酸抱合) や代謝 (メチル化) され、全身を循環する (Murota and Terao, 2003)。

生活習慣病とフラボノイド (ゲニステイン・ダイゼイン・ケルセチン)

ここまで述べてきたように、これらフラボノイドには様々な生活習慣病の予防・改善効果を有することが数多く報告されており、当研究室においてもゲニステインの抗糖尿病作用に関する研究が行われてきた(Ha *et al.*, 2012; 末安, 2011)。しかしながら、イソフラボンおよびケルセチンの疾病予防効果に関しては現象論にとどまっている研究が多く、その詳細な作用機構については不明な点が多い。安全でより効果的な機能性食品の開発には、詳細な作用機構の解明は重要であると考えられる。しかしながら、生体内におけるフラボノイドの作用は非常にマイルドであり、数多くの疾病予防効果を示すことから単一作用による効果ではなく、マルチな作用を示す可能性が考えられ(Mandel *et al.*, 2012)、その作用機構を解明することは容易ではない。

筋萎縮とフラボノイド (ゲニステイン・ケルセチン)

ロコモティブシンドロームの一つである加齢や寝たきり等による筋萎縮症への対策として機能性食品への注目が集まっている。その理由として、筋萎縮症 (サルコペニアや廃用性筋萎縮) の効果的な治療法は運動療法のみでとされてきたが、高齢者や寝たきり患者等は十分な運動ができない。ここ数年で、いくつかの機能性成分による筋萎縮抑制作用が明らかになりつつあるが(Hemdan *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2011; Kunkel *et al.*, 2011; Mukai *et al.*, 2012)、未だその報告は少なく、その詳細な作用についてはほとんどわか

っていない。当研究室において、糖尿病モデルである *db/db* マウスへゲニステインを摂取させた際の骨格筋で DNA マイクロアレイを行ったところ、筋萎縮関連因子の一つである *Atrogin1* の遺伝子発現を減少させていることが明らかとなった。これはゲニステインに抗筋萎縮作用があることを示唆しており、とても興味深い。また、ケルセチンにおいても培養細胞等を用いた研究では *Atrogin1* の発現を低下させることが報告されているものの (Hemdan *et al.*, 2009)、実際に筋萎縮に及ぼす影響については報告されていないが現状である。

ニュートリオミクス

ニュートリオミクスは DNA マイクロアレイ等のオミクス技術を用いて、食品や個々の食品成分、栄養素などが遺伝子発現やタンパク質量、代謝物量に及ぼす影響を網羅的に理解し、健康に与える影響を明らかにする学問である (Masotti *et al.*, 2010)。特に DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトミクス解析はその網羅性、信頼性および効率性の点で優れており、多用されている。フラボノイドの生体に及ぼす作用がマイルドかつマルチであることから、オミクス解析を用いてフラボノイド摂取による詳細な生理応答を明らかにすることは重要で、それらの情報を基に作用機構を明らかにしていく上で、重要なツールであると考えられる。

本研究の意義・目的・構成

ここまで述べてきたように、フラボノイドが生体内に及ぼす生理作用は多数報告されており、高齢者の健康維持への期待は大きい。しかしながら、これらフラボノイドの生理作用に関しては現象論にとどまっている研究が多く、詳細な作用機構については不明な点が多い。また、運動器疾患のひとつである筋萎縮へのフラボノイドを含む機能性食品による予防効果については明らかとなっていない。そこで、本研究では高齢者の健康に着目し、生活習慣病および筋萎縮に対するフラボノイドの影響およびその作用機構を解明するためオミクス技術を用いてその詳細な生理応答を明らかにすることを試みた。これは生体内での作用がマイルドかつマルチであるフラボノイドの機能を解明する上で非常に重要で、生体内でのフラボノイドの詳細な生理応答を明らかにできるものと考えられる。また、超高齢化社会を迎えた日本において、高齢者の **Total Health** の観点で、フラボノイドの新たな機能性として運動器の疾患（筋萎縮）の予防・改善作用について検討することは非常に意義のある研究と思われる。以下に本論文の構成を示す。

第一章 生活習慣病に対するフラボノイドの影響

肥満やインスリン抵抗性、脂質異常症に及ぼすフラボノイド（ゲニステイン、ダイゼイン、ケルセチン）の影響を確認するため、高脂肪食および西洋型食摂取による代謝異常に対するフラボノイドの影響についてマウスを用いて検討した。効果の得られたものについては DNA マイクロアレイおよびメタボローム解析を行い、フラボノイド摂取時の詳細な生理応答について明らかにした。

第二章 筋萎縮に対するフラボノイドの影響

筋萎縮に対するフラボノイド（ゲニステイン、ケルセチン）の影響を確認するため、坐骨神経切除による筋萎縮誘導ラットを用いて評価した。さらに DNA マイクロアレイを行い、得られた効果に関するフラボノイドの生理作用について明らかにした。

第三章 ゲニステインによる筋萎縮抑制効果の作用機構解析

ゲニステインによる筋萎縮抑制効果に対するエストロゲン受容体の関与についてエストロゲン受容体アンタゴニストおよびアゴニストを用いて検討を行った。

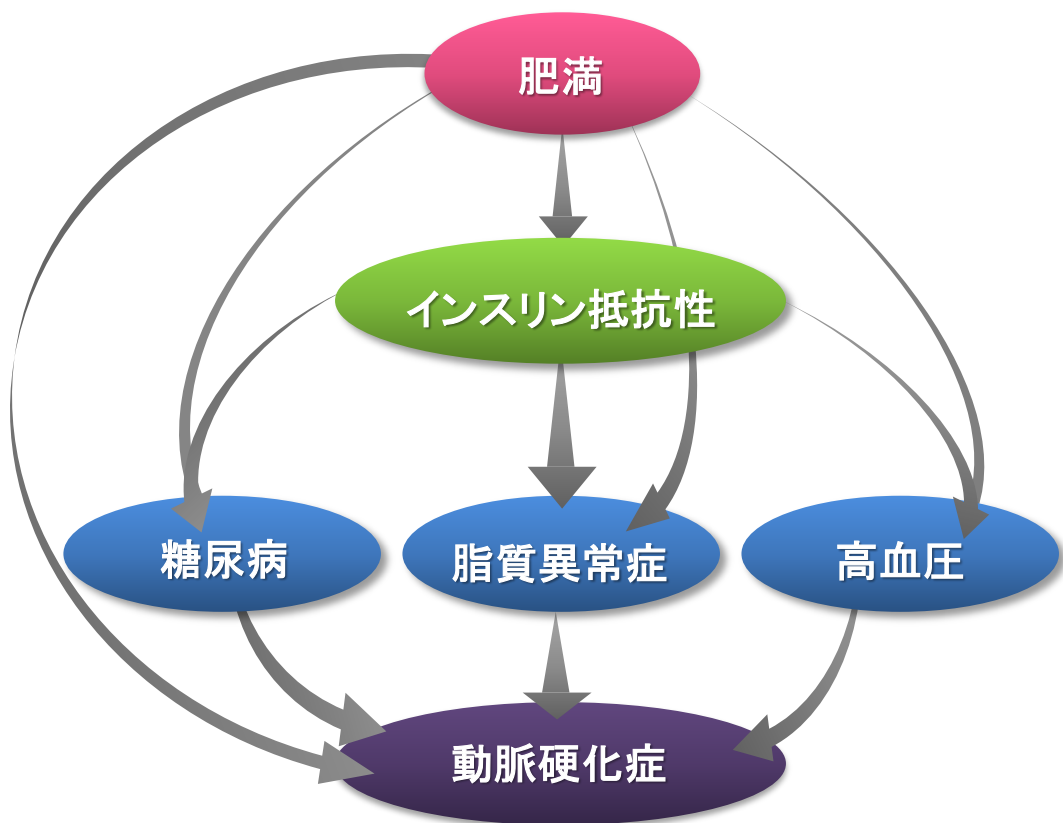
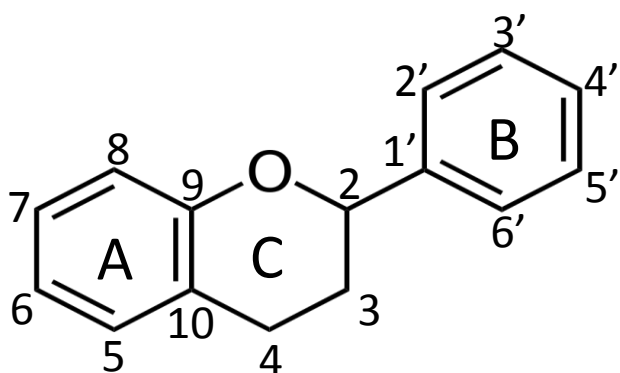


Fig. 0-1 メタボリックシンドロームの病態



Fig. 0-2 ロコモティブシンドローム

A



B

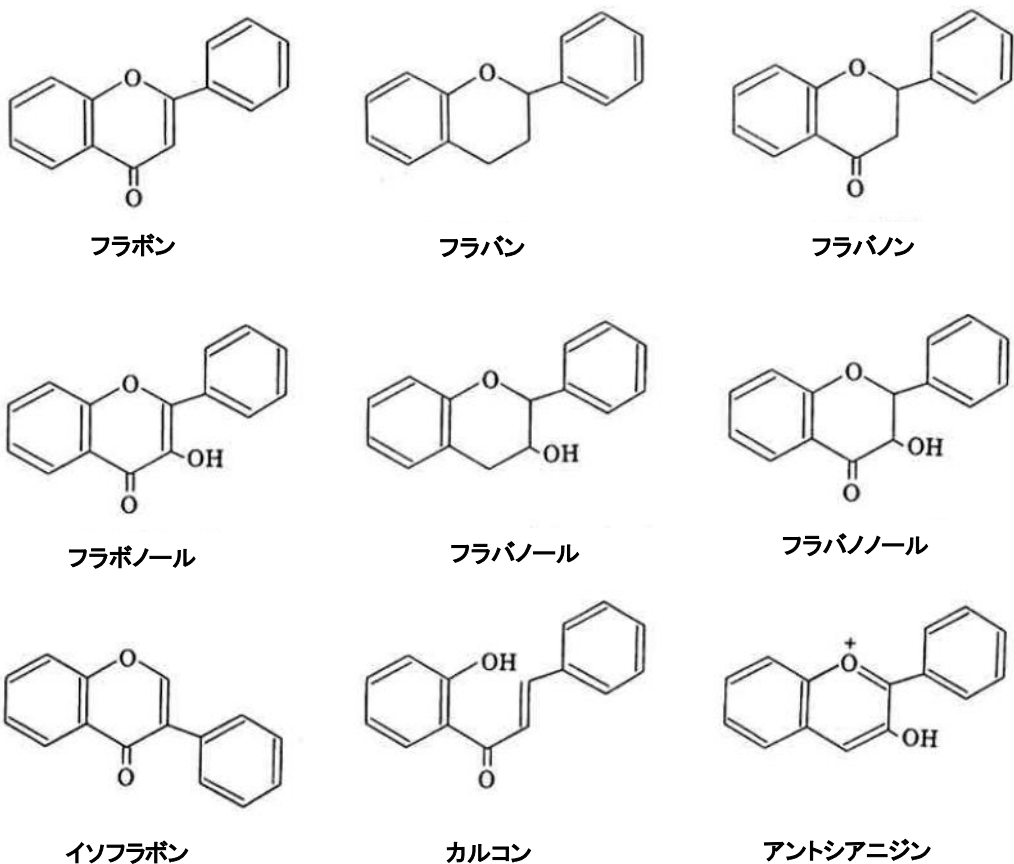


Fig. 0-3 各フラボノイドの構造式

A: フラボノイドの基本骨格であるフラバンの構造式

B: 各フラボノイドの構造式

Table 0-1 各フラボノイドの分類における基本構造および代表的な成分

分類	基本構造	成分名
フラバン	C環のC ₂ -C ₃ が飽和結合で、C4位にカルボニル基が置換していないもの	
フラボン	C環のC ₂ -C ₃ 位が2重結合で、C環4位にカルボニル基を有するもの。	ルテオリン等
フラボノール	フラボンのC環3位に水酸基が結合したもの。	ケルセチン、ケンフェロール等
イソフラボン	フラボンで、B環の結合位置がC環2位から3位に置き換わったもの	ダイゼイン、ゲニステイン
フラバノール	フラバンのC環3位に水酸基が結合したもの	カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピカロカテキンガレート、テアフラビン等
フラバノール	フラバンのC環3位に水酸基が結合したもの	ジヒドロケルセチン、ジヒドロケンフェロール等
フラバノン	C環4位にカルボニル基を有するもの	ナリンゲニン、ヘスペレチン等
カルコン	フラボンのC環1位の酸素が還元され、2位で開環したもの	
アントシアニン	C環のC ₁ -C ₂ 位とC ₃ -C ₄ 位が2重結合で、C環1位の酸素が+に荷電したもの	デルフィニジン、シアニン等

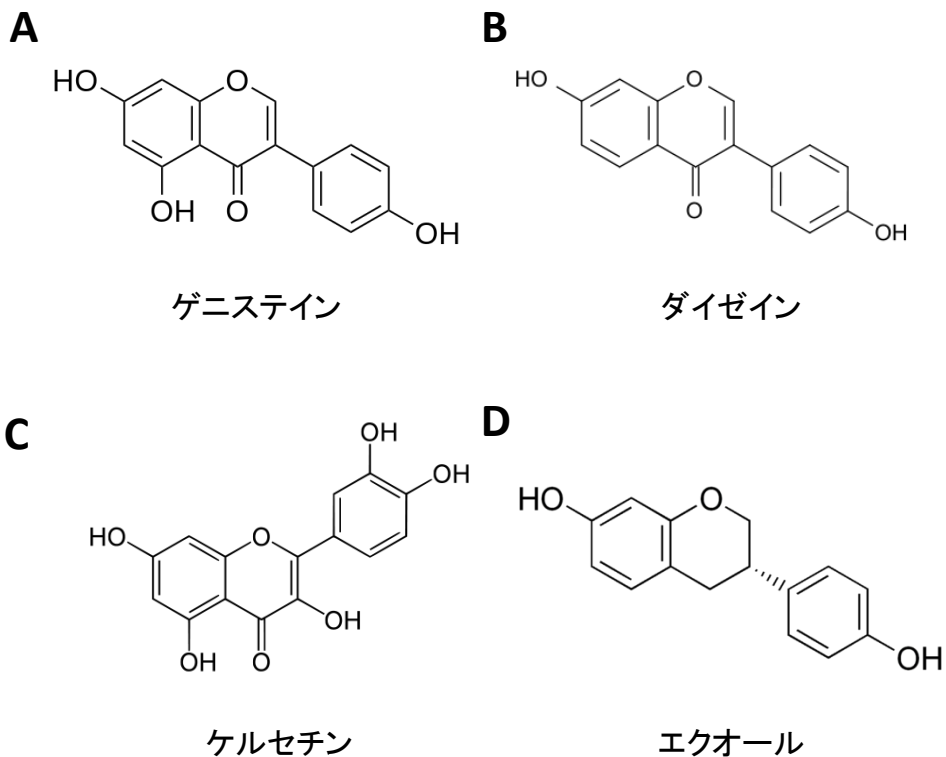


Fig. 0-4 ゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチンの構造式

- A: ゲニステインの構造式
 B: ダイゼインの構造式
 C: ケルセチンの構造式
 D: エクオールの構造式

Table 0-2 ヒトエストロゲン受容体への親和性と転写活性

リガンド	相対親和性		β/α	転写活性 EC_{50} (nM)		β/α
	hER α	hER β		hER α	hER β	
エストラジオール	100	100	1	0.021	0.11	0.19
ダイゼイン	0.0010	0.0040	4	250	100	2.5
ゲニステイン	0.0017	7.4	440	80	6.6	12
(±)エクオール	0.20	1.60	8	200	74	2.7
R(+)-エクオール	0.40	0.30	0.7	66	330	0.2
S(-)-エクオール	0.10	3.20	32	85	65	1.3

hER α : human Estrogen Receptor α
 hER β : human Estrogen Receptor β
 (末安 俊明, 2001引用)

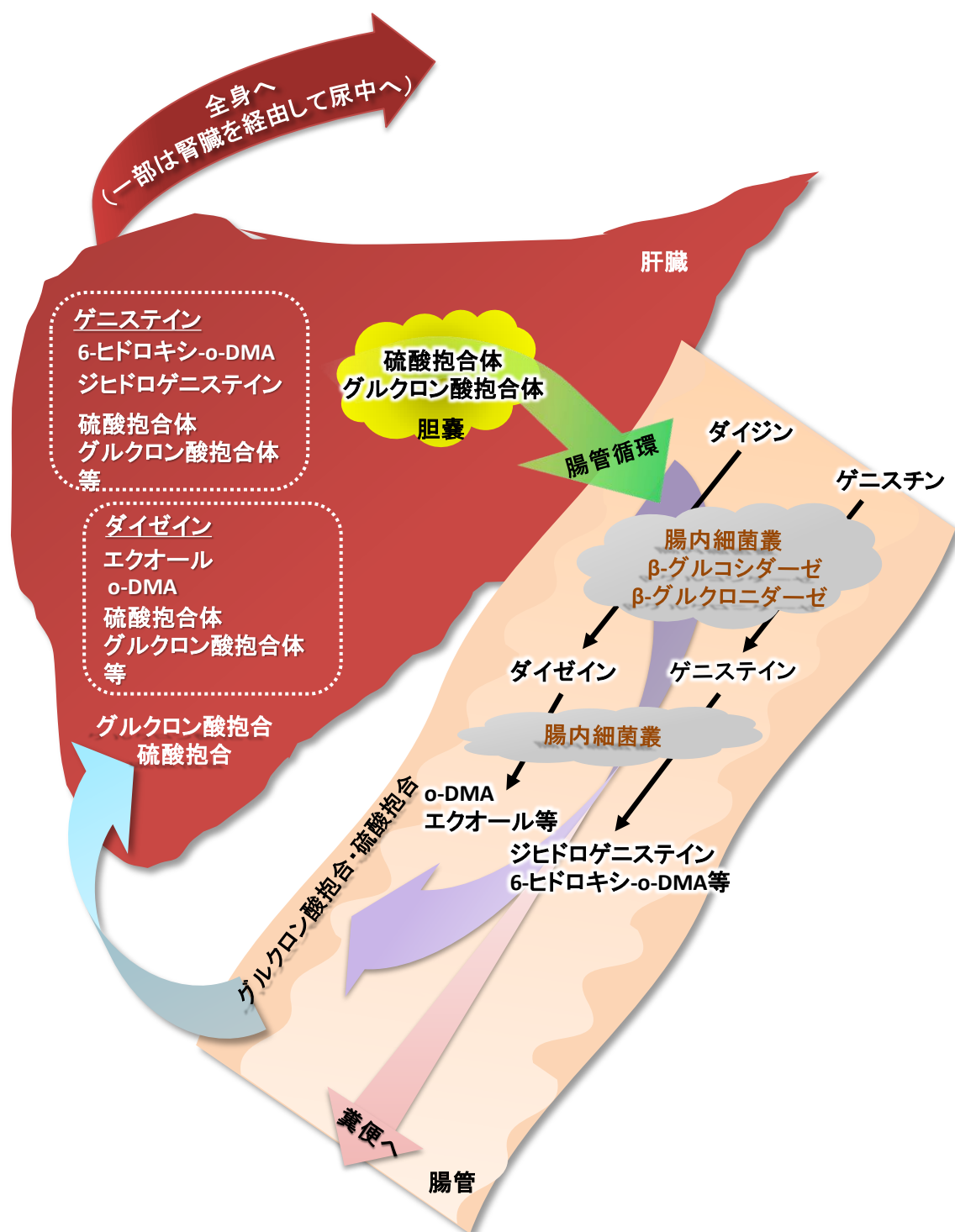


Fig. 0-5 ゲニステインおよびダイゼインの吸収・代謝図
(食品安全委員会, 大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の
安全性評価の基本的な考え方, 2006, 別紙1より一部改編)

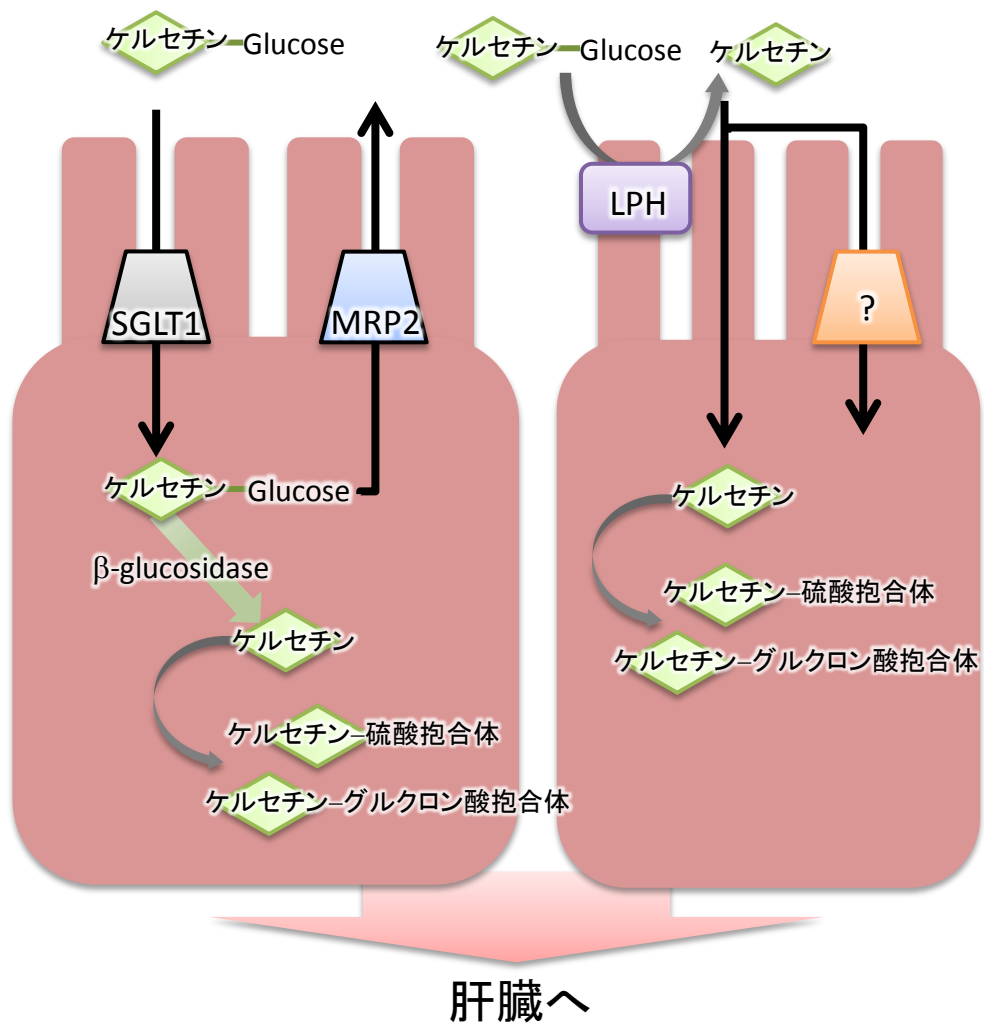


Fig. 0-6 ケルセチンの小腸上皮での吸収・代謝図

SGLT1: sodium-dependent glucose transporter
 MRP2: multidrug-resistance-associated protein 2
 LPH: lactase-phlorizin hydrolase

第一章

フラボノイドの摂取が

生活習慣病モデルマウスに及ぼす影響の解析

緒言

1936 年に初めてフラボノイドの機能性が報告されてから(Bentsath *et al.*, 1936)、今日に至るまで様々な疾病に対する予防・改善効果が報告されている(Galleano *et al.*, 2012)。本研究で用いているゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチンもまた、非常に多くの機能性が報告されている。生活習慣病とは生活習慣の乱れを成因とする疾病の総称であるが、近年の食生活の乱れや運動不足の増加に伴って、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧等の疾病が急増している。これら生活習慣病の病態は高脂肪や高コレステロール、高フルクトース（高スクロース）といった食餌により誘導されることが動物実験により明らかとなっており、これらの疾病に対するゲニステイン、ダイゼインやケルセチンの予防効果も報告されている(Galleano *et al.*, 2012; Rodrigo *et al.*, 2012)。ゲニステインとダイゼインはエストロゲン受容体への結合が報告されていることから、エストロゲン様活性を介して代謝改善作用を示すと考えられている(Potter *et al.*, 1998)。一方で、Mezei *et al.*はこれらの糖代謝改善作用にエストロゲン受容体以外の作用を報告しており(Mezei *et al.*, 2003; Mezei *et al.*, 2006)、その作用は広範である事が予想されている。また、ケルセチンは、抗肥満(Ahn *et al.*, 2008)、抗糖尿病(Vessal *et al.*, 2003)、抗脂肪肝(Kobori *et al.*, 2011)や抗高血圧(Jalili *et al.*, 2006)等、非常に様々な疾患に対して予防・改善作用を報告しており、その作用の一部に抗酸化作用が関与していることが明らかとなっている。また、これ以外にもケルセチンはエストロゲン受容体(Miodini *et al.*, 1999)や Calcineurin(Wang *et al.*, 2010)、GLUT1(Perez *et al.*, 2011)等に直接作用を示すことが報告されており、非常に幅広い作用を示している。

このように、フラボノイドに関する非常にたくさんの報告がある中、その作用機構を示した報告は極めて少ない。それを困難にしている原因はフラボノイドの作用が広範かつ穏やかであることが考えられる。そこで本章では、まず、高脂肪食または西洋型食（高脂肪、高コレステロール、高スクロース）による代謝異常に対するフラボノイド（ゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチン）の効果を確認し、作用の確認されたものに関して網羅的解析（DNA マイクロアレイ、メタボローム解析）を行い、フラボノイド摂取時の詳細な生理応答を捉えることを目的とした。

第一節

フラボノイドの摂取が高脂肪食誘導性肥満マウスに及ぼす影響の解析

1-1-1 方法

飼育条件

7 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー）にペレット（D12011601, Research Diet）を 1 週間給餌し、予備飼育を行った。飼育期間中の食餌と水は自由摂取とし、飼育室は明期（8:00～20:00）、暗期（20:00～8:00）の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育後、マウスを以下の 5 群に分けて実験を開始した。マウスは個別飼育とし、体重及び摂食量については、週に 1 回測定を行った。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

- 1) ND 群 脂肪由来熱量 10%の通常食群
- 2) HF 群 脂肪由来熱量 45%の高脂肪食群
- 3) GEN 群 ゲニステインを 0.05%添加した高脂肪食群
- 4) DAI 群 ダイゼインを 0.05%添加した高脂肪食群
- 5) QUE 群 ケルセチンを 0.1%添加した高脂肪食群

飼料組成は Table 1-1-1 に示した。本実験に用いたゲニステインとダイゼインは LC laboratories 社製の純度 99%以上のものを用い、ケルセチンについては Sigma 社製の純度 98%以上のものを用いた。

実験 11、15、19 週目にグルコース負荷試験、12、16、20 週目にインスリン負荷試験を行い、20 週目に解剖を行った。解剖時には 4 時間絶食（明期 8:00～12:00）させたマウスにイソフルラン（MERCK Animal Health）で麻酔後、頸動脈より採血を行い、肝臓および脂肪組織（後腹膜脂肪、精巣上体周囲脂肪、腸間膜脂肪）、骨格筋（ヒラメ筋、腓腹筋）を摘出した。摘出後、直ちに液体窒素中で凍結し、分析に供するまで - 80℃で保存した。血液は室温で凝固後、遠心分離（9,000 rpm, 10 min, 4℃）し、血清を得た。得られた血清は後の解析まで - 80℃で保存した。

グルコース負荷試験

グルコース負荷試験は 16 時間の絶食後に行った。マウス腹腔内に体重 1 kg あたり 1 g のグルコース溶液を注入した。その後、経時的に尾静脈から採血を行い、血糖値を測定した。血糖値の測定にはアセンシアブリーズ 2 センサー（Bayer）を使用した。

インスリン負荷試験

インスリン負荷試験は 4 時間の絶食後に行った。マウスの腹腔に体重 1kg あたり 0.75U のヒトインスリン溶液 (HumulinR, Eli Lilly) を注入し、その後、経時的に尾静脈から採血し、血糖値を測定した。血糖値の測定にはグルコース負荷試験と同様、アセンシアブリーズ 2 センサーを用いた。

血液生化学検査

血漿中のグルコース、トリグリセライド、遊離脂肪酸、総コレステロール、HDL コレステロール、リン脂質、GPT、GOT の濃度測定は、グルコース CII-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、NEFA C-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、HDL-コレステロール E-テストワコー、リン脂質 C-テストワコー、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (すべて和光純薬工業) をそれぞれ用いた。血清中のインスリンの濃度測定にはマウスインスリン測定キット (森永) を用いた。血清中の過酸化脂質 (チオバルビツール酸反応物質; TBARS) の測定には TBARS Assay Kit (Cayman Chemical) を用いた。なお、いずれの場合も測定は添付のプロトコルに従って行った。

肝臓中脂質濃度

肝臓中の脂質抽出は Folch *et al.* の方法 (Folch *et al.*, 1957) をもとに行った。肝臓に対して 20 倍容のホルチ液 [クロロホルム (関東化学) : メタノール (関東化学) = 2:1] 中でポリトロン型ホモゲナイザーを用いて可溶化し、4 °C で一晚静置した。翌日、ホモゲナイズに用いたホルチ液の 1/4 倍容のメタノールを加え、ボルテックスを用いて激しく混和し、氷上で 1 時間静置した。その後、油層を注意深く分取し、減圧乾固した後、イソプロパノールに溶解させ、測定に供した。

試料中のトリグリセライドおよび総コレステロール濃度は、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー (ともに和光純薬工業) を用い、添付のプロトコルに従いそれぞれ測定した。

肝臓中 TBARS 濃度

肝臓中 TBARS 濃度の測定には血清と同様に、TBARS Assay Kit (Cayman Chemical) を用いた。肝臓からのサンプル抽出及び測定は、添付のプロトコルに従い行った。肝臓重量 (mg) に対して 10 倍容の RIPA バッファー (ul) を加え、ポリトロン型ホモジナイザーを用いて可溶化した。その後、homogenate を遠心分離 (1,600 × g, 10 min, 4°C) し、上清をサンプルとして用いた。得られたマロンジアルデヒド量は総タンパク量で補正した。また、総タンパク量の測

定には BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いた。

・ RIPA Buffer 組成

50 mM Tris, pH 7.6

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% TritonX-100

1% Sodium Deoxycholate

0.1% SDS

統計解析

測定値は平均値±標準誤差 (S.E.) で示した。多群間の検定には一元配置分散分析後、HF 群を比較対照とした Dunnett の方法を用いた。

1-1-2 結果

体重および摂食量

飼育期間中の体重は、高脂肪食摂取群 (HF 群、GEN 群、DAI 群、QUE 群) では ND 群と比べ著しく増加した (Fig. 1-1-2-1A)。また、DAI 群と QUE 群の体重は HF 群に比べ、低く推移する傾向にあった。

実験期間中の総摂食量は、ND 群に比べ高脂肪食摂取群である HF 群、GEN 群、DAI 群、QUE 群で低かったが (Fig. 1-1-2-1B)、総カロリー摂取量で換算すると、ND 群に比べ、高脂肪食摂取群の HF 群、GEN 群、DAI 群、QUE 群で高値を示した (Fig. 1-1-2-1C)。高脂肪食摂取群間 (HF 群、GEN 群、DAI 群、QUE 群) では総摂食量および総摂取カロリー量において差は認められなかった。

臓器重量

解剖時の臓器重量を Fig. 1-1-2-2 に示した。肝臓重量は HF 群に比べ、ND 群で低値を示す傾向にあり、GEN 群において増加する傾向が認められた (Fig. 1-1-2-2A)。後腹膜脂肪重量、腸間膜脂肪重量、精巣上体周囲脂肪重量は HF 群では ND 群より有意に高値を示した (Fig. 1-1-2-2B, C, D)。DAI 群と QUE 群の各脂肪組織重量は HF 群に比べ低値を示す傾向にあった。腓腹筋重量とヒラメ筋重量は全ての群間で差は認められなかった (Fig. 1-1-2-2E, F)。

耐糖能

飼育開始後 11、15、19 週目に行ったグルコース負荷試験における血糖値の推移を Fig. 1-1-2-3 に示した。11 週目では、グルコース負荷後 30 分にピークが認

められ、その後血糖値は時間と共に減少していったが、HF 群においては ND 群と比べ有意に高値を示した (Fig. 1-1-2-3A)。GEN 群および DAI 群は HF 群と同様の推移を示したが、QUE 群においては HF 群より低い推移を示した。15 週目における糖負荷試験の血糖値推移は、ND 群と比べ HF 群でいずれの時間においても高値を示した (Fig. 1-1-2-3C)。11 週目の試験と同様、GEN 群および DAI 群においては HF 群と同様の推移を、QUE 群は HF 群よりも低い推移を示す傾向にあった。19 週目の試験では、ND 群に比べ HF 群の血糖値推移は高値を示し、各種フラボノイド摂取群 (GEN 群、DAI 群、QUE 群) の血糖値推移は、HF 群に比べ低値を示す傾向にあった (Fig.1-1-2-3E)。

また、曲線下面積 (AUC) は、全ての試験において HF 群に比べ ND 群で有意に低値を示した (Fig. 1-1-2-3B, D, F)。AUC は GEN 群と DAI 群において 19 週目の試験で HF 群より低い傾向であった。また、QUE 群では 11、15、19 週目すべての試験において HF 群より低い傾向にあった。

インスリン感受性

12、16、20 週目に行ったインスリン負荷試験からインスリン感受性を評価した。Fig. 1-1-2-4A, C, E に血糖値推移をインスリン投与前 (0 分時) の血糖値に対する割合で示した。

12 週目の試験では、インスリン負荷後全ての群で血糖値の低下が認められたが、ND 群では HF 群に比べ有意に減少した。GEN 群及び DAI 群では HF 群と同様の推移を示し、QUE 群はインスリン負荷後 60 分以降において、HF 群と ND 群の間を推移した (Fig.1-1-2-4A)。

16 週目の試験では、ND 群と比べ HF 群で高く推移する傾向が認められたが、全ての群においてインスリン負荷後の血糖値の低下に差は認められなかった (Fig. 1-1-2-4C)。

20 週目の試験では、ND 群においてインスリン負荷後 30 分では、血糖値は投与前の 60%にまで低下し、インスリン負荷後 120 分では 70%程度まで徐々に上昇する推移を示した (Fig. 1-1-2-4E)。一方で HF 群は、インスリン負荷後 60 分において血糖値は最小値を示したものの、その値は投与前の 90%にとどまり、以後は投与前と同程度の値を推移した。GEN 群における血糖値は、HF 群と同様に推移した。一方 DAI 群および QUE 群の血糖値は負荷後 15 分までは HF 群と同様に推移したが、その後の血糖値の推移は HF 群と比べ低値を示す傾向にあった。

また、AUC への換算では、全ての試験週において ND 群は HF 群より有意な低値を示した (Fig. 1-1-2-4B, D, F)。GEN 群においては HF 群と同程度であり、DAI 群では HF 群に比べ 16 週目および 20 週目の試験で低下する傾向が認められた。QUE 群の AUC は全ての試験期間において、HF 群と比べ低値を示す傾

向であった。

各種血液パラメーター

1. 血糖値および血清インスリン濃度

血糖値は全ての群間に差は認められなかった (Fig. 1-1-2-5A)。血清インスリン値は、ND 群と比べ HF 群において高値を示す傾向にあった (1-1-2-5B)。また、GEN 群では HF 群に比べ有意に増加した。DAI 群および QUE 群においては HF 群と同程度であった。

2. 血中 GPT および GOT 濃度

血清 GPT 値は HF 群に比べ ND 群で低い傾向にあり、GEN 群で高い傾向を示した (Fig. 1-1-2-5C)。DAI 群と QUE 群の GPT 値は HF 群と同程度であった。血清 GOT 値は HF 群に比べ ND 群で有意に低く、各種フラボノイド摂取群 (GEN 群、DAI 群、QUE 群) のその値は HF 群と同程度であった (Fig. 1-1-2-5D)。

3. 血中総コレステロール、HDL コレステロール、

トリグリセライド、遊離脂肪酸、リン脂質濃度

総コレステロールおよびリン脂質濃度においては、HF 群に比べ ND 群で有意に減少し、各種フラボノイド摂取群 (GEN 群、DAI 群、QUE 群) は HF 群と同程度の値であった (Fig. 1-1-2-5E, F)。HDL コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度においては各群間で差は認められなかった (Fig. 1-1-2-5G, I)。HF 群における血清トリグリセライド濃度は、ND 群に比べ増加する傾向にあった (Fig. 1-1-2-5H)。GEN 群および DAI 群のトリグリセライド濃度は HF 群と同程度であり、QUE 群においては HF 群に比べ減少する傾向にあった。

4. 血清中 TBARS 濃度

Fig. 1-1-2-5J に酸化ストレスの指標である TBARS 濃度を示した。血清中 TBARS 濃度は ND 群と比べ HF 群において有意に増加し、各種フラボノイド摂取群 (GEN 群、DAI 群、QUE 群) では HF 群と比べ有意に減少しており、ND 群と同程度であった。

肝臓中脂質量および TBARS 量

肝臓中トリグリセライド量は HF 群において ND 群よりも有意に増加した (Fig. 1-1-2-6A)。DAI 群と QUE 群においては HF 群よりも減少する傾向にあった。一方、GEN 群は HF 群と同程度の値を示した。

HF 群における肝臓中総コレステロール量は ND 群に比べ有意に増加し、GEN 群は HF 群と同程度であった (Fig. 1-1-2-6B)。DAI 群と QUE 群においては HF 群よりも減少する傾向にあった。

肝臓タンパク質量当たりの TBARS 濃度を Fig. 1-1-2-6C に示した。HF 群における肝臓中 TBARS 濃度は ND 群に比べ増加する傾向にあった。GEN 群およ

び GAI 群は HF 群に比べ減少する傾向にあり、QUE 群においては有意に減少した。

1-1-3 考察

第一節では、高脂肪食により誘導される代謝異常に対するゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチンの作用について検討を行った。C57BL/6J マウスへの 20 週間の高脂肪食の投与は肥満、耐糖能異常（糖負荷試験）、インスリン抵抗性（インスリン負荷試験）、脂肪肝（肝臓 TG、コレステロール）、高コレステロール血症、血清中過酸化脂質（TBARS）の増加が観察された。このような病態に対して各フラボノイドの摂取は TBARS の増加を有意に抑制した。ケルセチンに至っては肝臓中 TBARS も高脂肪食摂取群に比べ有意に低下させた。一方、ゲニステインの摂取は高脂肪食による血清インスリン値の増加をさらに上昇させた。また、肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性、脂肪肝といった病態に対するフラボノイドの作用は穏やかであった。

フラボノイドによる抗酸化作用について

疾病に関与する酸化的障害として、DNA の損傷や酵素タンパク質の不活化などとともに生体膜を構成する脂質の過酸化反応がある。高脂肪食摂取による血清過酸化脂質 (TBARS) は有意に増加し、肝臓中 TBARS は増加傾向を示した。脂質の過酸化反応は連鎖反応で進行し、一重項酸素と脂質の反応やリポキシゲナーゼ反応により発生する脂質ペルオキシド (LOOH) を蓄積する。この反応の開始には LOOH 依存型と非依存型があるとされ、前者は金属イオンとの反応で生成するアルコキシラジカル ($LO\cdot$) や $LOO\cdot$ により誘導され、後者は $O_2^{\cdot-}$ から生成するペルヒドロキシラジカルが関与するものと考えられている。ゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチンの摂取は血清 TBARS を有意に低下させ、フラボノイド摂取による抗酸化作用が認められた。フラボノイドはラジカルの捕捉作用だけでなく、一重項酸素の捕捉、金属キレート作用およびリポキシゲナーゼ阻害作用を示すことが明らかとなっており、このような作用により血清 TBARS を低下させたと考えられる。また、ケルセチンは肝臓中 TBARS も有意に低下させ、ゲニステインやダイゼインよりも強い抗酸化作用を示した。ゲニステインやダイゼインには認められず、ケルセチンが肝臓中 TBARS を低下させた原因は幾つか考えられる。1 つ目は化学構造の違いである。フラボノイドの抗酸化活性には幾つかの構造が重要であるとされている。その一例としてカテコール構造 (B 環の σ -ジヒドロキシ構造)、4-オキシ基と共役した 2, 3-二重結合および 3 位と 5 位の水酸基等が挙げられる (Fig. 1-1-3-1A) (Bors *et al.*, 1990)。ケルセチンはこれら全ての構造を持ち、一方ゲニステインおよびダイゼインはカテコール構造と 3 位と 5 位の水酸基を持たない (Fig. 1-1-3-1B)。実際

にこれらすべてを持つケルセチンの抗酸化活性はカテコール構造を持たないケルフェロールや共役二重結合を持たないカテキン類よりも強いことが報告されており(Rice-Evans *et al.*, 1995)。ケルセチンの強い抗酸化活性はその化学構造によるものであると考えられた。2つ目は、投与量の問題である。本試験ではケルセチンは飼料に 0.1% 添加し、ゲニステイン及びダイゼインは半分の 0.05% をそれぞれの飼料に添加した。したがって、ケルセチンが肝臓での TBARS 低下作用を示したのも単に、添加量の違いによるものかもしれない。3つ目は肝臓中抗酸化酵素の活性増強を介した作用が考えられる。Kobori *et al.* は 0.05% のケルセチン添加食の摂取は西洋型食による肝臓での抗酸化酵素遺伝子 (*Glutathione peroxidase1* や *Catalase*) の発現低下を抑制することを報告しており (Kobori *et al.*, 2011)、ケルセチン摂取が肝臓での抗酸化酵素の遺伝子発現量を制御することが明らかとなっている。しかしながら、本研究ではこれら遺伝子の発現量については検討していない点や投与量についても検討していない。今後ゲニステインおよびダイゼインとのケルセチンの差を明らかにするためには肝臓での遺伝子発現や投与量についても検討する必要があると思われる。

フラボノイドの糖・脂質代謝に対する作用について

高脂肪食摂取は末梢組織でのインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能異常を引き起こすことが知られている。本研究においても高脂肪食の摂取は飼育 11 および 12 週目よりインスリン抵抗性および耐糖能異常が観察され、それは 19 および 20 週目まで持続した。このような糖質代謝に対してゲニステインおよびダイゼインの摂取は、飼育 19 週目にて耐糖能異常を改善する傾向が認められたが、インスリン感受性には影響が認められなかった。このことからこれらイソフラボンにより認められた耐糖能異常改善傾向にはインスリン感受性の亢進は関与しないことが考えられ、インスリン分泌の増加やインスリン非依存的な血糖低下作用が関与していることが考えられた。Lu *et al.* は、イソフラボンによるインスリン分泌促進作用を報告している (Lu *et al.*, 2008)。また、当研究室においても、ゲニステインによる筋細胞におけるインスリン非依存的な糖取り込み量増加作用を観察しており (Ha *et al.*, 2012; 末安, 2011)、これらの関与が示唆された。一方ケルセチンは、飼育開始 11 および 12 週目より耐糖能異常およびインスリン抵抗性を改善する傾向がみられ、その作用は 20 週目まで続いた。このことから、ケルセチンによる耐糖能異常改善傾向には末梢でのインスリン感受性の亢進が関与していると考えられた。高脂肪食による末梢組織でのインスリン抵抗性には活性酸素が関与していると考えられており (Bloch-Damti and Bashan, 2005)、ケルセチン摂取が肝臓中 TBARS を低下させたことから、末梢組織での抗酸化作用の関与が示唆された。また、インスリン抵抗性は耐糖能異常だけでなく、

脂質代謝にも影響することはよく知られている(Samuel and Shulman, 2012)。ケルセチン摂取は脂肪組織重量や肝臓中脂質量も低下させる傾向が認められ、これらの作用にも抗酸化作用を介したインスリン感受性亢進作用が考えられた。

ゲニステインによる血中インスリンの増加について

ゲニステインの摂取は、高脂肪食による血清インスリンの増加を促進した。しかしながら、血糖値は高脂肪食群と同程度であり、このインスリン増加作用は血糖値に影響しなかった。血糖値は通常食群と高脂肪食群との間に差がないことから、常時血糖に高脂肪食摂取は影響しないと考えられた。血糖値低下作用を示すホルモンはインスリンのみであるが、血糖値上昇作用を示すホルモンは多数あり、生体は様々な機構により低血糖を厳格に防いでいると考えられている。これらのことから、ゲニステインによるインスリン増加に対して、血糖上昇ホルモンの増加等を介した代償作用が起こっている可能性が考えられる。グルカゴンは cAMP を介してグリコーゲン分解酵素活性を増加させ、血糖値を増加させるが、Keppens は、グルカゴンによる cAMP 増加をゲニステインが増強し、グリコーゲン分解酵素活性を増加させることを報告している(Keppens, 1995)。したがって、ゲニステインによりインスリンが増加したにも関わらず、血糖値が変化しないことについては、グルカゴンの作用をゲニステインが増強させた可能性が考えられ、血糖制御に関する互いの作用を相殺したと思われる。

抗酸化作用を介した代謝改善作用について

癌、糖尿病、循環器疾患などの生活習慣病において、その疾患に係る組織細胞が活性酸素等により酸化的損傷を受け、病態を発症・進展させることはよく知られている。したがって、活性酸素による組織障害を抑制することは生活習慣病の予防につながると考えられており、抗酸化作用を示すフラボノイドによる生活習慣病予防効果が報告されている(Miura *et al.*, 1995; Negre-Salvayre and Salvayre, 1992)。本実験ではフラボノイドの摂取は TBARS を低下させ、抗酸化作用を示したが、糖・脂質代謝に関するフラボノイドの作用は穏やかであった。糖・脂質代謝は肝臓や脂肪組織、骨格筋等の末梢組織で活発に行われており、これら組織での活性酸素の増加は代謝異常を引き起こす(Bloch-Damti and Bashan, 2005)。本実験においても高脂肪食による肝臓の TBARS の増加傾向がみられたが、その程度は 1.2 倍とわずかであった。Kobori *et al.*は西洋型食摂取(高脂肪、高コレステロール、高スクロース食)により肝臓中 TBARS が 2 倍に増加したと報告しており(Kobori *et al.*, 2011)、高脂肪以外に、高コレステロールや高スクロースといった因子により、末梢組織での酸化障害をより誘導していると考えられた。実際に、高コレステロール食や高スクロース食は末梢組織での酸化ストレスを高めることが報告されている

(Balkan et al., 2002; Skottova et al., 2004)。したがって第二節では、末梢組織での酸化障害がより誘導されると考えられる西洋型食を用いて検討を行った。

まとめ

本節では、高脂肪食摂取による肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性、脂肪肝、高コレステロール血症といった病態に対するフラボノイド摂取の影響を検討した。このような病態に対して、抗酸化作用は示したもののフラボノイドの代謝改善作用は弱く、統計的に有意な差は認められなかった。このようなサンプルを用いて、フラボノイドの詳細な生理応答を解明していくことは困難と考えられる。したがって、第二節では本実験で認められたフラボノイドの抗酸化作用に着目し、より強く酸化障害を誘導することがわかっている西洋型食を用いて検討を行った。また、肝臓において抗酸化活性の認められたケルセチンを用いた。

Table 1-1-1 飼料組成

Product	ND		HF		GEN		DAI		QUE	
%	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
Protein	19	20	24	20	24	20	24	20	24	20
Carbohydrate	67	70	41	35	41	35	41	35	41	35
Fat	4	10	24	45	24	45	24	45	24	45
Total		100		100		100		100		100
kcal/gm	3.8		4.7		4.7		4.7		4.7	
Ingredient	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
Casein	200	800	200	800	200	800	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12	3	12	3	12	3	12
Corn Starch	427.2	1709	72.8	291	72.4	290	72.4	290	71.9	288
Maltodextrin 10	100	400	100	400	100	400	100	400	100	400
Sucrose	172.8	691	172.8	691	172.8	691	172.8	691	172.8	691
Cellulose	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0
Corn Oil	25	225	25	225	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	177.5	1598	177.5	1598	177.5	1598	177.5	1598
Mineral Mix	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
Dicalcium Phosphate	13	0	13	0	13	0	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0	5.5	0	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate	16.5	0	16.5	0	16.5	0	16.5	0	16.5	0
Vitamine Mix	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Genistein	0	0	0	0	0.43	0	0	0	0	0
Daidzein	0	0	0	0	0	0	0.43	0	0	0
Quercetin	0	0	0	0	0	0	0	0	0.86	0
Yellow Dye	0	0	0.025	0	0.025	0	0	0	0	0
Red Dye	0.05	0	0	0	0.025	0	0.025	0	0	0
Blue Dye	0	0	0.025	0	0	0	0.025	0	0	0
Total	1055.05	4057	858.15	4057	858.15	4056	858.15	4056	858.15	4054

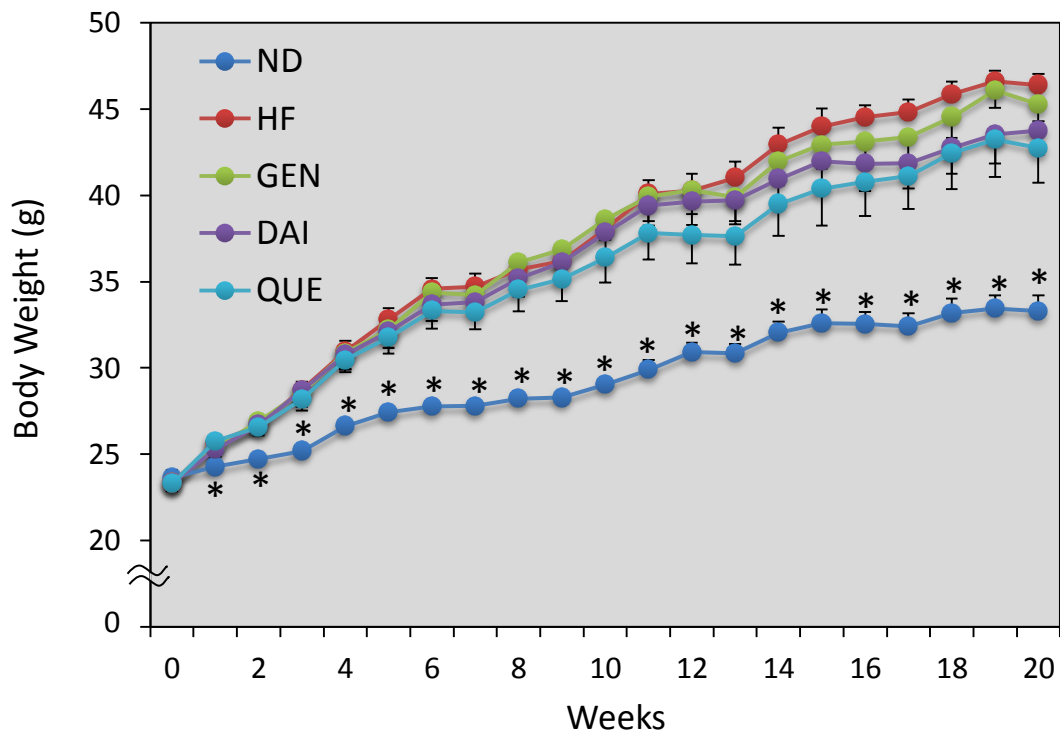
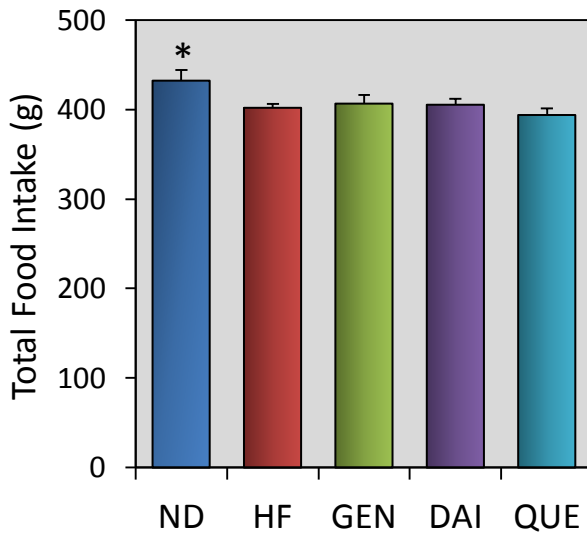
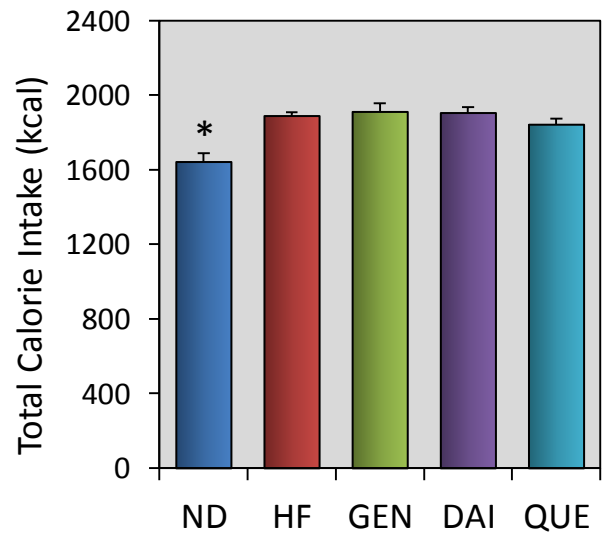
A**B****C**

Fig. 1-1-2-1 飼育期間中の体重、総摂食量および総摂取カロリー

A: 飼育期間中の体重の推移

B: 飼育期間中の総摂食量

C: 飼育期間中の総カロリー摂取量

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=7(ND), n=8(ND以外)

*: $p < 0.05$ (vs. HF)

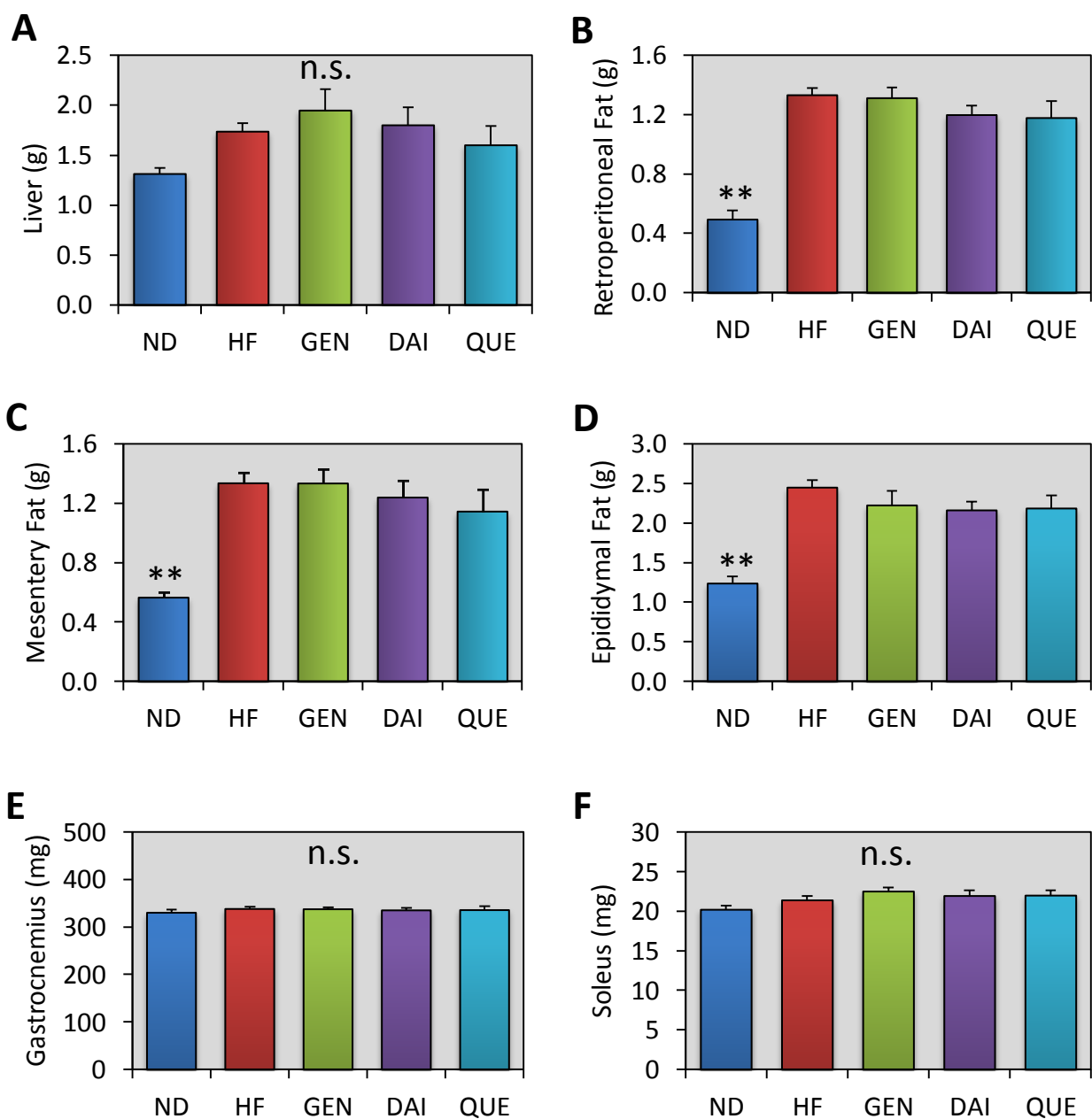


Fig.1-1-2-2 解剖時の臓器重量

A: 肝臓重量

C: 腸間膜脂肪重量

E: 腓腹筋重量

B: 後腹膜脂肪重量

D: 精巣上体周囲脂肪重量

F: ヒラメ筋重量

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=7(ND), n=8(ND以外)

**: $p<0.01$ (vs. HF)

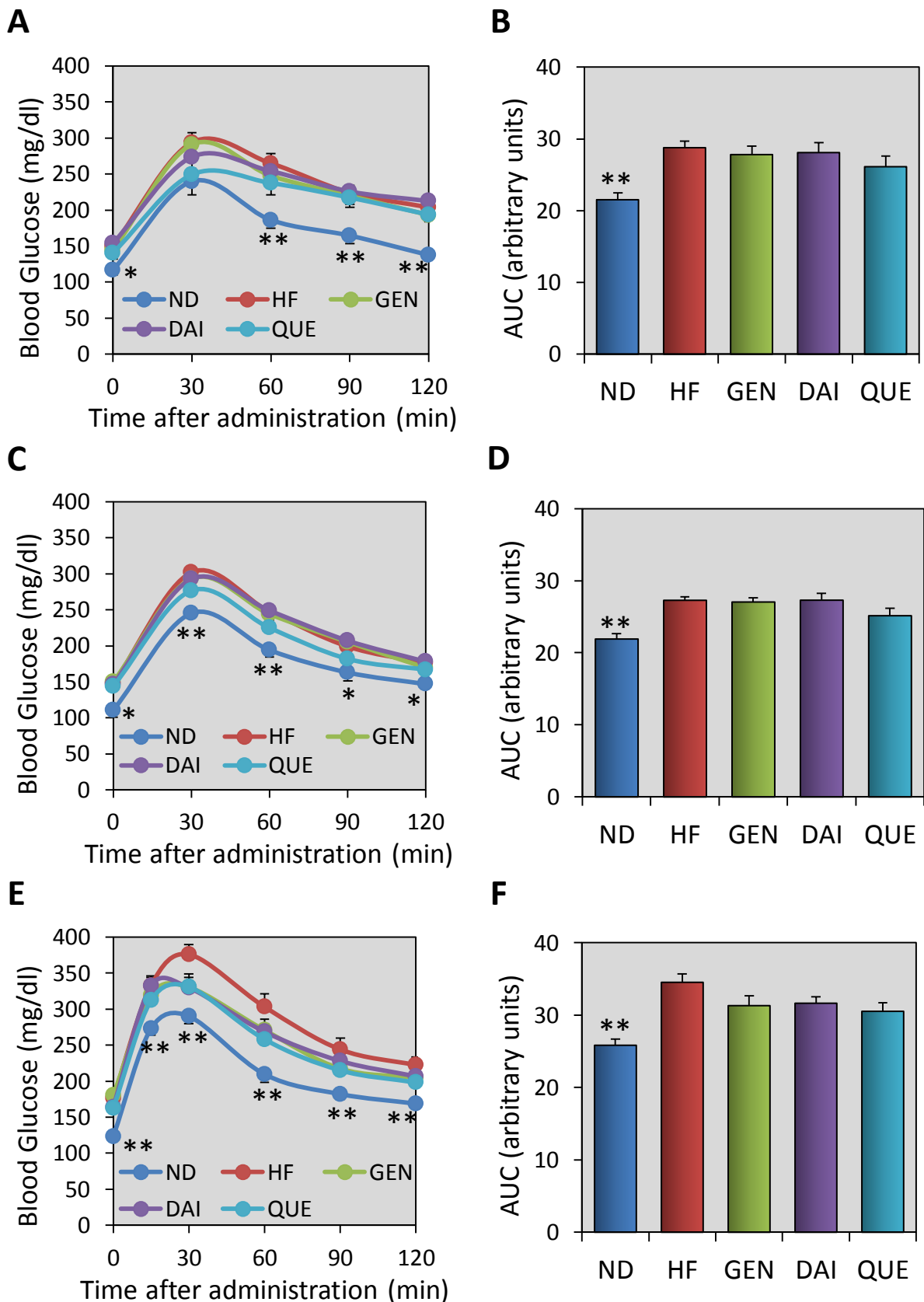


Fig. 1-1-2-3 グルコース負荷試験における耐糖能の評価

A: 飼育11週目における血糖値の推移

C: 飼育15週目における血糖値の推移

E: 飼育19週目における血糖値の推移

B: 11週目の血糖値曲線下面積

D: 15週目の血糖値曲線下面積

F: 19週目の血糖値曲線下面積

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=7 (ND), n=8 (ND以外)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs. HF)

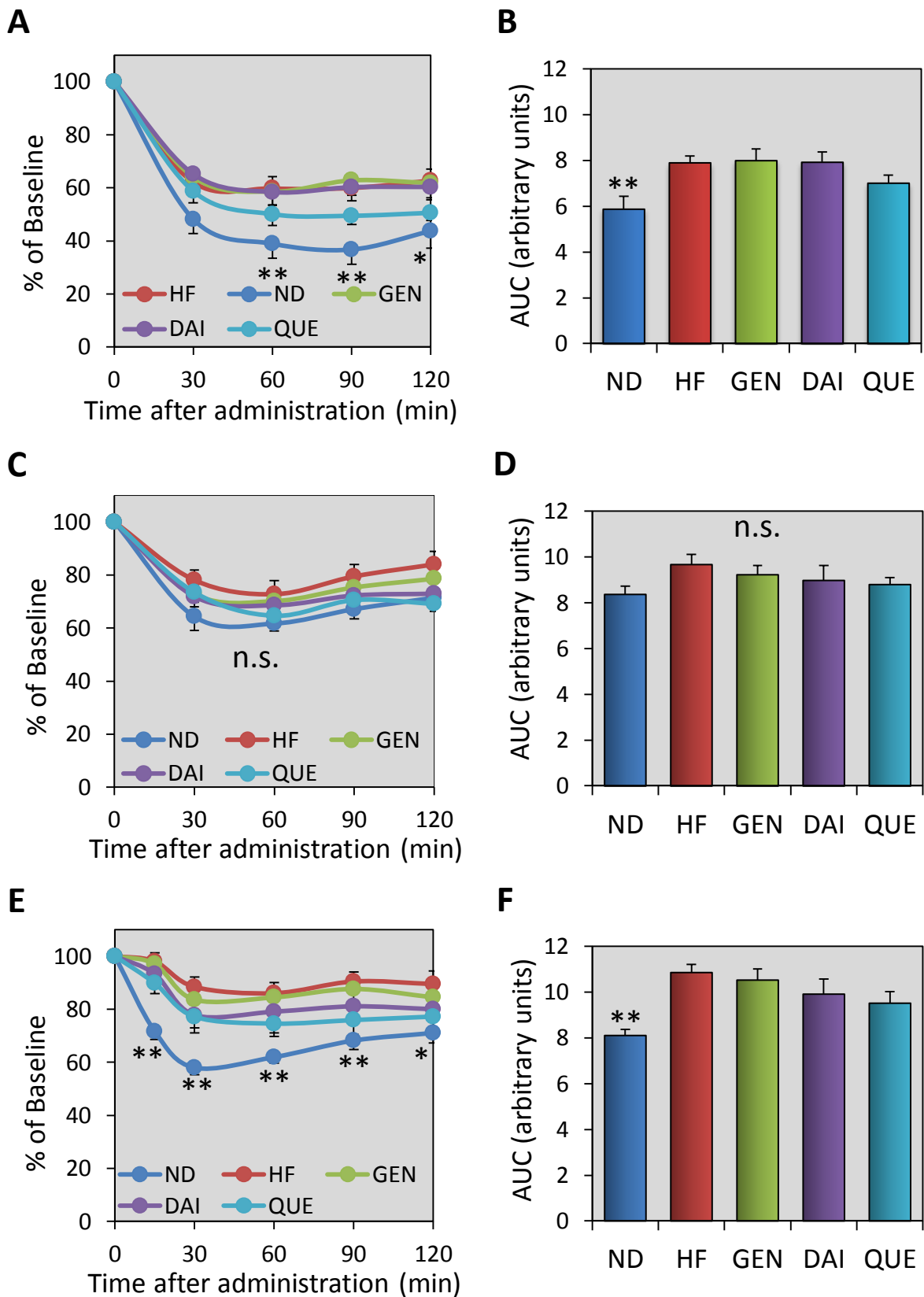


Fig.1-1-2-4 インスリン負荷試験におけるインスリン感受性の評価

A: 飼育12週目における血糖値の推移

C: 飼育16週目における血糖値の推移

E: 飼育20週目における血糖値の推移

B: 12週目の血糖値曲線下面積

D: 16週目の血糖値曲線下面積

F: 20週目の血糖値曲線下面積

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=7(ND), n=8(ND以外)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs. HF)

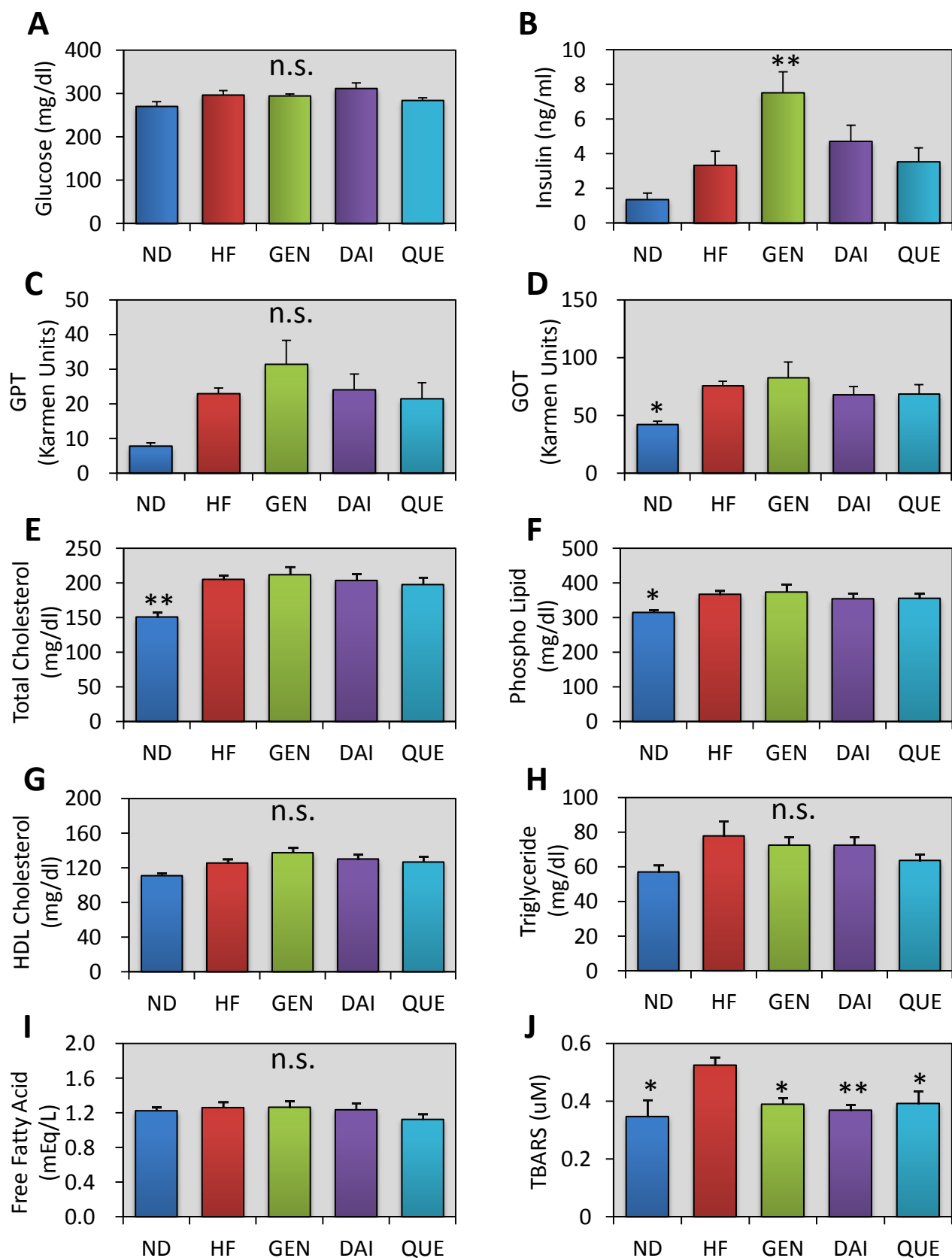


Fig.1-1-2-5 解剖時の血清パラメーター値

A: 血糖値

C: 血清GPT

E: 血清総コレステロール

G: 血清HDLコレステロール

I: 血清遊離脂肪酸

B: 血清インスリン

D: 血清GOT

F: 血清リン脂質

H: 血清トリグリセライド

J: 血清TBARS

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=7(ND), n=8(ND以外)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs. HF)

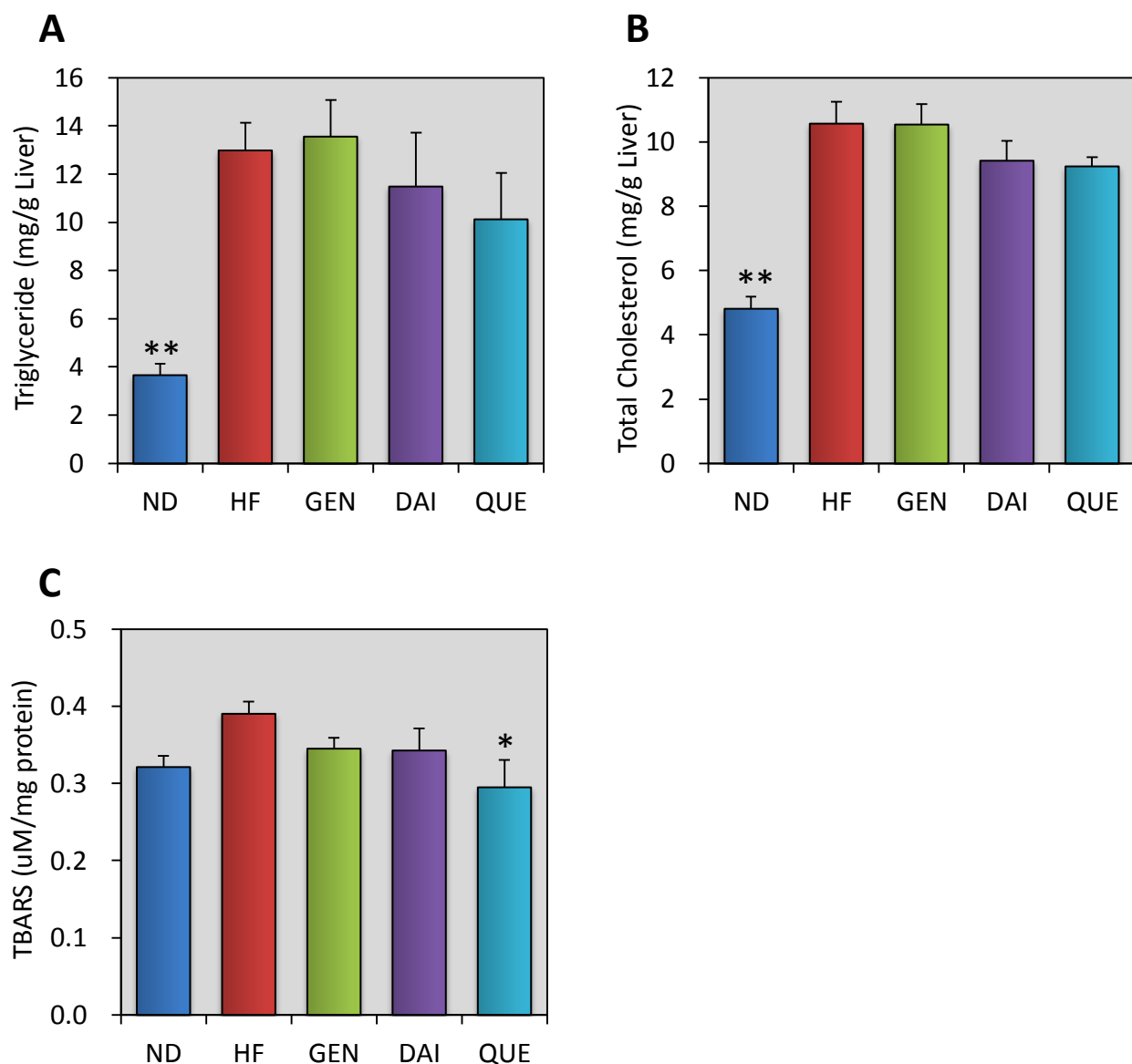


Fig.1-1-2-6 肝臓中脂質量およびTBARS量

A: 肝臓重量当たりのトリグリセライド量

B: 肝臓重量当たりの総コレステロール量

C: 肝臓タンパク質量当たりのTBARS濃度

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=7(ND), n=8(ND以外)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs. HF)

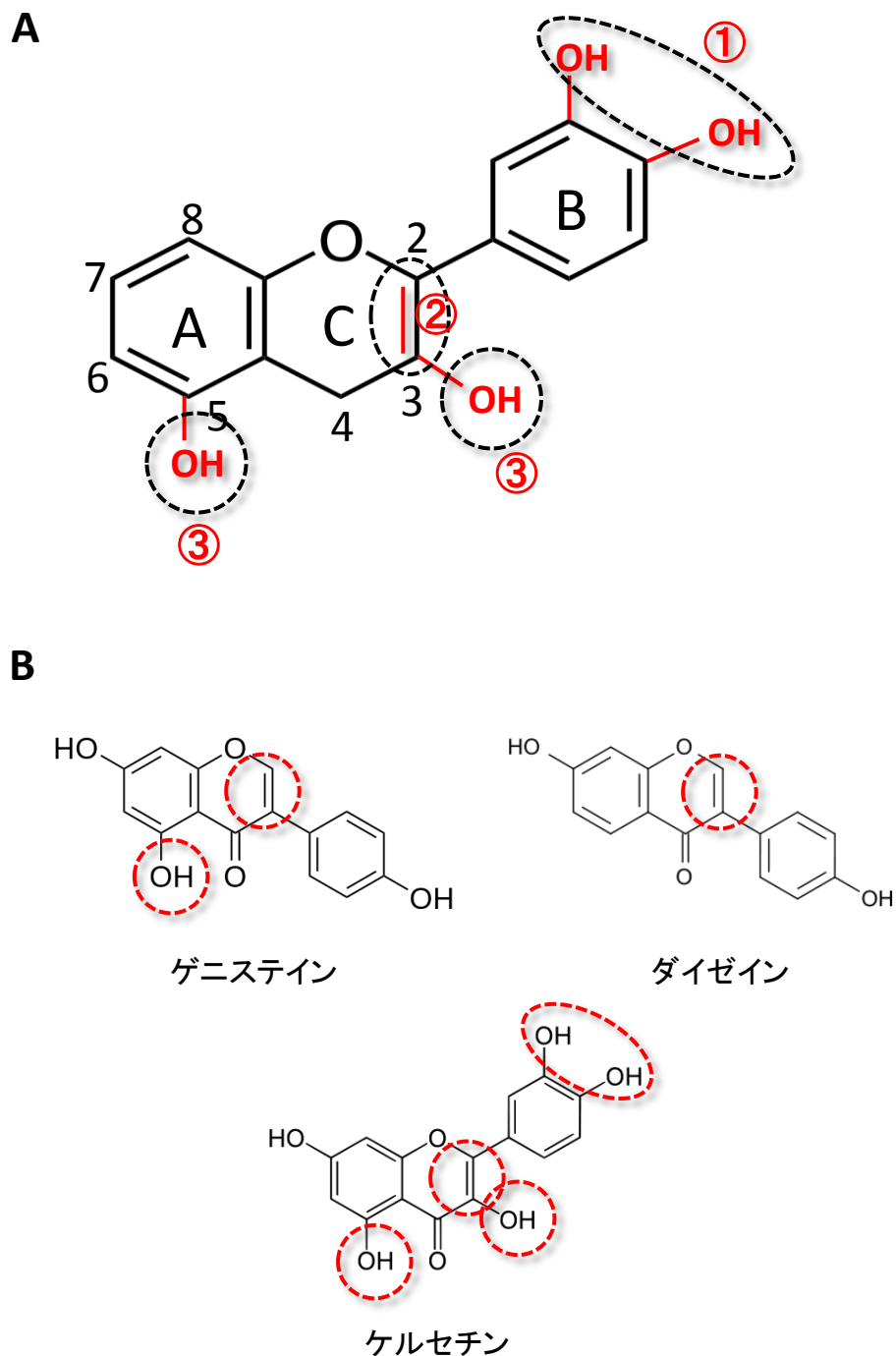


Fig.1-1-3-1 ラジカル捕捉活性に関与する部分構造と
イソフラボンとケルセチンの構造

A: ラジカル捕捉活性に関与する構造について

- ①B環のカテコール構造
- ②C環2位、3位の二重結合
- ③A環3位、5位の水酸基

B: イソフラボンとケルセチンにおけるラジカル捕捉活性に関与する構造部位

第二節

ケルセチンの摂取が西洋型食餌誘導性肥満マウスに及ぼす影響の解析

1-2-1 方法

飼育条件

7 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー）に AIN-93G を 1 週間給餌し、予備飼育を行った。飼育期間中の食餌と水は自由摂取とし、飼育室は明期（8:00～20:00）、暗期（20:00～8:00）の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育後、マウスを以下 3 群に分けて実験を開始した。マウスは個別飼育を行い、体重および摂食量については、週に 1 回測定した。

すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

- 1) ND 群: AIN-93G 群
- 2) WD 群: 西洋型食群
- 3) WD+Q 群: ケルセチンを 0.1% 添加した西洋型食群

西洋型食は高脂肪、高コレステロールおよび高スクロースを含む餌であり、飼料組成は Table 1-2-1 に示した。本実験に用いたケルセチンは第一章 第一節と同様に Sigma 社製の純度 98% 以上のものを用いた。

実験 7 週目にグルコース負荷試験、その 4 日後にインスリン負荷試験を行い、8 週目にピルビン酸負荷試験を行った。解剖は 8 週目に行った。解剖時には 2 時間絶食（明期 8:00～10:00）させたマウスにイソフルラン（MERCK Animal Health）で麻酔後、頸動脈より採血を行い、臓器を摘出した。摘出後、一部は RNA later®（Ambion）に一晩浸漬させ、残りは液体窒素中で凍結し、後の分析に供するまで - 80℃ で保存した。血液はヘパリン処理後、遠心分離（9,000 rpm, 10 min, 4℃）し、血漿を得た。得られた組織は後の解析まで - 80℃ で保存した。

グルコース負荷試験

「第一章 第一節 1-1-1 方法 グルコース負荷試験」と同様の方法を用いた。投与量は体重 1 kg あたり 2 g のグルコースとした。

インスリン負荷試験

「第一章 第一節 1-1-1 方法 インスリン負荷試験」と同様の方法を用いた。

ピルビン酸負荷試験

ピルビン酸負荷試験は 16 時間絶食後に行った。マウス腹腔内にピルビン酸溶液（体重 1kg あたり 1g）を注入した。その後経時的に尾静脈から採血を行い、血糖値を測定した。血糖値測定にはアセンシアブリーズ 2 センサー（Bayer）を使用した。

血液生化学検査

「第一章 第一節 1-1-1 方法 血液成分の測定」と同様の方法を用いた。

肝臓中脂質量測定

「第一章 第一節 1-1-1 方法 肝臓中脂質の測定」と同様の方法を用いた。

酵素活性測定

肝臓重量（g）に対して 5 倍容の氷冷 Homogenize Buffer を加え、マイクロホモジナイザー（BioMasher II; ニッピ）を用いて可溶化した。その後、homogenate を遠心分離（9,000×g, 10 min, 4℃）して、不溶画分を除き、その上清を酵素抽出液として用いた。得られた酵素抽出液は直ちに測定に用いた。

各種酵素活性の測定は、自動分析装置（Biolis 24i Premium; 東京貿易機械）を用いて 8 種の酵素活性を同時に測定した。各種酵素活性測定につき、176 μL の反応液と 4 μL の酵素抽出液（肝臓サンプル）を混合後、20 μL の反応開始液を添加し、吸光度を継時的に測定し活性を求めた。酵素抽出液に関しては測定酵素により適宜希釈して用いた。各酵素の反応液と反応開始液、測定波長については以下に示した（各反応液組成は終濃度を示している）。

Homogenize Buffer 組成

3 mM Tris-HCl, pH7.2

250 mM Sucrose

1 mM EDTA

グルコキナーゼ（GK: EC 2.7.1.2）、(Pilkis, 1975)

反応液

0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)

0.2 mM NADP

5 mM MgCl₂

5 mM ATP

1 unit/mL Glucose-6-phosphate dehydrogenase

反応開始液: 50 mM Glucose

測定波長: 340 nm

ピルビン酸キナーゼ (PK: EC 2.7.1.40)、(Malcovati and Valentini, 1982)

反応液

10 mM HEPES (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

50 mM KCl

2 mM ADP

0.5 mM NADH

1 unit/mL lactate dehydrogenase

反応開始液: 10 mM phosphoenolpyruvate 1K

測定波長: 340 nm

グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ

(G6PD: EC 1.1.1.49)、(Janke et al., 2010)

反応液

0.1 M Tris-HCl (pH7.6)

30 mM MgCl₂

1.2 mM NADP

0.5 unit/mL 6-phosphogluconate dehydrogenase

反応開始液: 3.3 mM Glucose-6-phosphate

測定波長: 340 nm

クエン酸合成酵素 (CS: E.C. 2.3.3.1)、(Veloso and Veech, 1975)

反応液

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)

0.2 mM DTNB

0.1 mM Acetyl-CoA

反応開始液: 0.5 mM Oxaloacetic acid

測定波長: 355 nm

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH: EC 1.1.1.42)、(Bergmeyer, 1974)

反応液

50 mM Glycylglycine Buffer (pH 7.4)

0.6 mM Manganese Chloride

1 mM NADP

反応開始液: 0.44 mM Isocitric acid

測定波長: 340 nm

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH: EC 1.1.1.37)、(Nakasa *et al.*, 1979)

反応液

100 mM potassium phosphate buffer (pH7.0)

0.31 mM β -NADH

反応開始液: 0.25 mM Oxaloacetic acid

測定波長: 340 nm

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT: EC 2.3.1.21)、(Abel, 2004)

反応液

58 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1.25 mM EDTA

0.1% Triton X-100

0.25 mM DTNB

反応開始液: 0.04 mM palmitoyl-CoA, 1.25 mM L-carnitine

測定波長: 412 nm

脂肪酸合成酵素 (FAS: EC 2.3.1.85)、(Nepokroeff *et al.*, 1975)

反応液

0.1 M potassium phosphate buffer (pH7.0)

50 nM Acetyl-CoA

0.3 mM NADPH

反応開始液: 0.2 mM Malonyl-CoA

測定波長: 340 nm

total RNA 抽出

total RNA 抽出には市販キット (NucleoSpin® RNA; MACHERE-NAGEL) を用いた。添付のプロトコルに従って行った。抽出後、RNA の純度は、260 および 280 nm における吸光度比 ($A_{260/280\text{ nm}}$) を nano drop にて測定し、その値が 1.9 以上であることで確認した。また、電気泳動により RNA のクオリティーも確認した。

DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは群ごとに total RNA サンプルをプールして行った。3'IVT Expression kit (Affymetrix) を用いて RNA の逆転写からビオチン標識 cRNA の断片化まで行った。各群の RNA を逆転写し第一鎖 cDNA を合成し、第二鎖 cDNA は DNA ポリメラーゼにより合成した。二本鎖 cDNA を鋳型としてビオチンで標識された cRNA を合成した後、生成したビオチン標識 cRNA を洗浄および断片化した。その後、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0

Array に 45°C、16 時間ハイブリダイズさせた。専用装置 Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて洗浄し、streptavidin-phycoerythrin 染色を行い、レーザーキャナー (Affymetrix Gene Array Scanner 3000) でシグナルを検出した。

DNA マイクロアレイデータ解析

データの取り込みは、Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC) を用いて行い、MAS5 で正規化した。得られたデータのうち、シグナル値が 50 以上を示し、かつ LogRatio が -0.5 以下または 0.5 以上のプローブセットを抽出した。この基準を満たすプローブセットを IPA (Ingenuity Pathway Analysis ver.17199142, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) あるいは Kegg (<http://kegg.jp>) へアップロードした。IPA は遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析を行うことができるツールであり、Kegg はトランスクリプトームとメタボロームの変動を KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) パスウェイ上で視覚的に俯瞰することができる。

メタボローム解析

メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社 (HMT) に委託した。-80°C で保存した肝臓組織 (≧30 mg) 19 検体を HMT へ送付した。以下の解析は HMT にて行われた。また、本解析では各群 n=2 となるようにサンプルをプールして行った。

前処理

マウス肝臓組織 50 mg に対し、1,500 μL の 50%アセトニトリル水溶液 (v/v) (カチオン用 20 μM およびアニオン用 5 μM 内部標準物質) を加え、冷却下にて卓上型破砕機 (bms, BMS-M10N21) を用いて破砕 (1,500 rpm, 120 秒×3 回) した。組織破砕後、遠心分離 (2,300 ×g, 4°C, 5 分) を行った。遠心分離後、各群 n=2 となるように (Table 1-2-1-3) プールし、限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に 400 μL×2 本移し取った。これを遠心 (9,100×g, 4°C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50 μL の Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

測定

本試験ではカチオンモード、アニオンモードの測定を以下に示す条件で行った。得られたピーク強度、形状から判断して、カチオンモードでの測定には2倍、アニオンモードでの測定には5 倍に希釈した試料を用いた。

陽イオン性代謝物質 (カチオンモード)

装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社)

Capillary : Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Rinse buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 10 sec

CE voltage : Positive, 27 kV

MS ionization : ESI Positive

MS capillary voltage : 4,000 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid : HMT Sheath Liquid (p/n : H3301-1020)

陰イオン性代謝物質 (アニオンモード)

装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社)

Capillary : Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I3302-1023)

Rinse buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I3302-1023)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 25 sec

CE voltage : Positive, 30 kV

MS ionization : ESI Negative

MS capillary voltage : 3,500 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid : HMT Sheath Liquid (p/n : H3301-1020)

データ解析

CE-TOF MAS により検出されたピークに、HMT 代謝物質データベースに登録された各代謝物質固有の質量電荷比 (m/z) および泳動時間 (MT) の値から候補化合物が付与された。全てのサンプルにおいて検出された 227 ピークについて、各群間の相対面積比を算出した値または定量値を用いた。西洋型食摂取により変動したもの (WD vs. ND) またはケルセチン摂取により変動したもの (WD+Q vs. WD) の Fold Change が 0.8 以下または 1.2 以上の代謝物を抽出した。この基準を満たす代謝物リストを IPA (Ingenuity Pathway Analysis ver.17199142, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com)あるいは Kegg (http://kegg.jp) へアップロードした。

統計解析

測定値は平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。統計解析は一元配置分散分析後、Tukey の方法を用いた。

1-2-2 結果

飼育期間中の体重推移、摂食量および摂取カロリー

体重は西洋型食餌 (WD 群および WD+Q 群) 摂取により有意に増加した (Fig. 1-2-2-1A)。WD 群と WD+Q 群の間に差は認められなかった。8 週目の体重減少は、糖負荷試験およびピルビン酸負荷試験前における絶食の影響である。

摂食量において 3 群間に差は認められなかった (Fig. 1-2-2-1B)。西洋型食摂取 (WD 群、WD+Q 群) による摂取カロリーの増加は、通常食と西洋型食のカロリー比の違いによるものである (Fig. 1-2-2-1C)。

グルコース負荷試験における血糖値推移

グルコース負荷後の血糖値推移を Fig. 1-2-2-2A に示した。全群で負荷後 30 分で急激に上昇し、その後穏やかに減少した。ND 群と比べ、WD 群では負荷後 60 分から 120 分まで有意に高値を推移し、耐糖能異常を示した。一方、WD+Q 群では WD 群に比べ 60 分から 120 分まで有意に低値を推移し、西洋型食による耐糖能異常を改善した。血糖値曲線下面積においても ND 群と比べ WD 群では有意に増加し、WD+Q 群はその増加を有意に抑制した (Fig. 1-2-2-2B)。

インスリン負荷試験における血糖値推移

インスリン負荷後の血糖値推移を Fig. 1-2-2-3A に示した。Fig. 1-2-2-3B に 0 分値に対する血糖値の割合を示した。血糖値はインスリン負荷後急激に減少し、負荷後 30 分から徐々に回復する推移を示した。ND 群と比べ WD 群および WD+Q 群の血糖値は高く推移し、西洋型摂取によるインスリン抵抗性が見られた。WD 群と WD+Q 群に差は認められなかった。

ピルビン酸負荷試験における血糖値推移

糖新生能を評価するため、ピルビン酸負荷試験を行った。Fig. 1-2-2-4A にピルビン酸負荷後の血糖値推移を示した。ND 群に比べ WD 群では負荷後の血糖値が高く推移し、糖新生の亢進が観察された。一方 WD+Q 群においては WD 群と比べ有意に低下し、ND 群と同程度に推移した。したがってケルセチン摂取は西洋型摂取による糖新生の亢進を抑制した。これは血糖値曲線下面積においても同様の傾向が認められ、WD 群と比べ ND 群および WD+Q 群では有意に低値を示した (Fig. 1-2-2-4B)。

臓器重量

体重当たりの肝臓重量、各脂肪重量 (腸間膜脂肪、後腹膜脂肪、精巣上体周囲脂肪) は、ND 群に比べ西洋型食餌摂取群 (WD 群および WD+Q 群) で有意

に増加し、WD 群と WD+Q 群の間に差は認められなかった (Fig. 1-2-2-5A, C, D, E)。一方、骨格筋重量は ND 群に比べ西洋型食餌摂取群 (WD 群および WD+Q 群) で有意に減少し、WD 群と WD+Q 群の間に差は認められなかった (Fig. 1-2-2-5B)。

血液パラメーター値

Fig. 1-2-2-6A に糖負荷試験時の空腹時血糖値を示した。ND 群と比べ、WD 群で有意に増加し、WD+Q 群では WD 群に比べ有意に低下した。

Fig. 1-2-2-6B, C, D, E には解剖時 (2 時間絶食) 血液パラメーターを示した。血漿インスリン値および総コレステロール値は WD 群において ND 群と比べ有意に増加し、ケルセチン摂取によりわずかに低下する傾向がみられた (Fig. 1-2-2-6B, D)。血漿トリグリセライド値および遊離脂肪酸値において西洋型食餌摂取により有意に増加し、ケルセチン摂取による影響は認められなかった (Fig. 1-2-2-6C, E)。

肝臓中トリグリセライドおよび総コレステロール量

肝臓中トリグリセライドおよび総コレステロール量は西洋型食餌摂取により著しく増加し、ケルセチン摂取は WD 群に比べさらに増加する傾向が認められた (Fig. 1-2-2-7A, B)。

肝臓中酵素活性

Fig. 1-2-2-8 に肝臓中の各種酵素活性を示した。グルコキナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよび脂肪酸合成酵素活性は、全群間に差は認められなかった (Fig. 1-2-2-8A, E, F, H)。グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、クエン酸合成酵素活性は西洋型食餌摂取により低下したが、ケルセチン摂取による影響は認められなかった (Fig. 1-2-2-8B, C, D)。カルニチンパルミトイルフェラーゼ活性は ND 群および WD 群と比べ、WD+Q 群で有意に減少した (Fig. 1-2-2-8G)。

遺伝子および代謝物網羅的解析

ケルセチンが生体に及ぼす作用をより詳細に解析するため DNA マイクロアレイおよびメタボローム解析を行った。マイクロアレイおよびメタボロームで得られたデータは IPA または Kegg へアップロードし、解析した。これらのデータは「糖代謝経路」、「変動の顕著な遺伝子」、「パスウェイ解析」、「グルタチオン代謝」について述べる。また、今回行ったメタボローム解析では CE-TOF MS により得られた化合物ピークのうち、同定された物質は 227 個であった。

糖代謝経路に及ぼす影響

マイクロアレイおよびメタボロームの結果を Kegg へアップロードした。解糖系、糖新生 (Fig. 1-2-2-9; 西洋型食の影響, Fig. 1-2-2-10; ケルセチンの影響) および TCA サイクル (Fig. 1-2-2-11) 経路において変動した遺伝子及び代謝物は色 (赤: 増加、緑: 減少) で示されている。また、変動した代謝物の面積比率を Fig. 1-2-2-12 に示した。西洋型食餌摂取により多数の遺伝子および代謝物の変動が認められたが、これらの変動はケルセチン摂取により部分的に抑制または増強された。遺伝子では *Pfkfb3*、*Pck2*、*Ldha*、*Acl*、*Idh3a*、*Sdhc*、代謝物では Glycerone-P、Acetyl-CoA、Citrate がケルセチン摂取により変動した因子である。メタボローム解析は、n=2 で行ったが、個体間のバラつきが大きく、その差は増加または減少傾向を示す程度であった。

変動倍率の大きい上位遺伝子

西洋型食餌摂取により発現変動が最も顕著であった遺伝子リストを Table 1-2-2-1 (増加した遺伝子) および Table 1-2-2-2 (減少した遺伝子) に、ケルセチン摂取により発現変動が最も顕著であった遺伝子リストを Table 1-2-2-3 (増加した遺伝子) および Table 1-2-2-4 (減少した遺伝子) に示した。これらの遺伝子リストを見ると、NME1 は西洋型食およびケルセチン食の両方に発現変動が顕著な遺伝子であり、西洋型食餌摂取による NME1 の発現減少をケルセチンの摂取により抑えた。

パスウェイの遺伝子発現に及ぼす影響

マイクロアレイデータを IPA にアップロードし、Core Analysis により解析を行った。発現変動が顕著な遺伝子群のパスウェイを Table 1-2-2-5 (西洋型食摂取による影響) および Table 1-2-2-6 (ケルセチン摂取による影響) に示した。これらのパスウェイを見ると、Estrogen-mediated S-phase Entry パスウェイが西洋型食摂取およびケルセチン摂取の影響で共に上位に挙がってきた。このパスウェイの各分子の発現変動を Fig. 1-2-2-13 に示した。Estrogen-mediated S-phase Entry に関与する分子の遺伝子発現は西洋型食餌摂取により減少し、ケルセチンの摂取はその減少を抑制するような変動がパスウェイ全体に認められた。

グルタチオン代謝に及ぼす影響

メタボロームデータを IPA にアップロードし、Metabolomics Analysis により解析を行った。西洋型食摂取により発現変動が顕著であった代謝物群のパスウェイを Table 1-2-2-11 に示した。これらパスウェイを見ると、Glutathione Biosynthesis パスウェイが Top3 に挙がった。また、ケルセチン摂取により顕著

な減少を示した代謝物リストの中にも酸化型グルタチオン (Glutathione (GSSG)) が含まれていた (Table 1-2-2-10)。そのため、西洋型食餌およびケルセチン摂取はグルタチオン代謝に影響することが考えられた。グルタチオンは抗酸化作用を持つペプチドであることから、グルタチオンの抗酸化作用に関わる代謝物および遺伝子について調べた。還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG) 量および GSH/GSSG 比を Fig.1-2-2-14A, B, C に示した。GSH/GSSG 比は西洋型摂取により減少し、ケルセチン摂取により増加する傾向にあった。これらの反応を触媒する酵素である Glutathione reductase (GR) および Glutathione peroxidase5 (GPX5) の mRNA 発現量はケルセチン摂取により増加する傾向にあり、GPX5 に関しては西洋型摂取により減少する傾向にあった (Fig. 1-2-2-14D, E)。これらのデータはマイクロアレイおよびメタボロームのデータを示したものである。

1-2-3 考察

本節では、西洋型食により誘導される代謝疾患に対するケルセチンの作用について検討を行った。

ケルセチンの糖代謝に及ぼす影響

西洋型食の摂取は肥満 (脂肪組織重量) および糖代謝異常 (耐糖能異常、インスリン抵抗性、糖新生亢進、空腹時血糖値)、脂質異常症 (高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高遊離脂肪酸血症)、脂肪肝 (高トリグリセリド、高コレステロール) といった病態を示した。このような病態に対してケルセチンの摂取は耐糖能異常改善および糖新生亢進作用を示した。ケルセチンによる耐糖能異常改善作用は以前に報告されており (Zhou *et al.*, 2012)、本研究の結果と一致した。一方で、インスリン感受性に関してはケルセチンの摂取は影響しなかった。つまり、ケルセチンによる糖代謝改善作用はインスリン感受性を介したのではなく、糖新生亢進抑制作用を含む他の機序が関与していることが示された。網羅的遺伝子発現解析により解糖系および糖新生関連酵素の発現量を確認したところ、ケルセチン摂取により *Pfkf* および *Pck2* の発現変動が認められた。*Pfkf* (phosphofructokinase, platelet) は解糖系の律速酵素であり、フルクトース-6-リン酸をフルクトース-1,6-ビスリン酸に変換する酵素である。*Pfkf* の発現は西洋型食摂取により減少し、その減少をケルセチンの摂取は抑制したことから、西洋型食摂取による解糖系抑制をケルセチンが改善した可能性が考えられる。一方 *Pck2* (phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) はオキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸に変換する糖新生の律速酵素であり、ケルセチン摂取により発現減少が認められた。インスリンやグルココルチコイ

ド等の血糖制御ホルモンはこれらを含む解糖系および糖新生関連酵素群の発現を変動させることにより血糖を制御していることから (Beale *et al.*, 1984; Moeller *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2001)、ケルセチンによる糖代謝改善作用に *Pfkfb* および *Pck2* の発現変動が関与していることが考えられた。

西洋型食およびケルセチン摂取が遺伝子発現に及ぼす作用

Estrogen-mediated S-phase entry pathway 関連因子 (*Cycl1*, *Rbl1*, *Cycb*, *Cdc2*, *Cdc25a*, *Cdk4*, *c-myc*, *Cdkn1a* 等) や *Nme1* の発現は西洋型食摂取により著しく減少したが、ケルセチン摂取により正常食群レベルまで増加した (Fig. 1-2-2-13, Table 1-2-2-2, Table 1-2-2-3)。これらはパスウェイ解析および発現レベルにおいて上位に位置しており、西洋型食およびケルセチン摂取による影響を強く受けている因子であると考えられる。これらの因子は細胞周期やガン細胞の転移抑制遺伝子として機能していることが分かっており、ガン抑制遺伝子として有名な p53 により制御されていることが知られている (Chen *et al.*, 2003; Izzotti *et al.*, 2004; Kappler *et al.*, 2004; MacLachlan *et al.*, 2000; Philipp-Staheli *et al.*, 2004; Sheen and Dickson, 2002; Zawacka-Pankau *et al.*, 2011)。実際に *p53* の発現は西洋型食により増加しており、p53 経路の活性化が考えられた。p53 の活性化は、*Tigfb* の発現増加や *Pfkfb* の発現抑制により解糖系を抑制することが知られている (Bensaad *et al.*, 2006; Zawacka-Pankau *et al.*, 2011)。Tigfb は解糖系の律速酵素である phosphofructokinase-1 をアロステリックに調節しているフルクトース-2,6-ビスリン酸 (Fru-2,6-P2) のレベルを抑制的に調節していることが知られ、Tigfb の発現が高くなると解糖系は抑制される (Bensaad *et al.*, 2006)。一方、解糖系の律速酵素である *Pfkfb* は p53 の活性化により発現減少を示すことが明らかとなっている (Zawacka-Pankau *et al.*, 2011)。西洋型食摂取によって Tigfb は発現増加、*Pfkfb* は発現減少を示し、西洋型食による耐糖能異常に p53 の活性化を介した Tigfb および *Pfkfb* の発現が関与していることが考えられた。

ケルセチン摂取は上述した p53 の標的遺伝子である Estrogen-mediated S-phase entry pathway 関連因子や *Nme1* の発現だけでなく、Tigfb や *Pfkfb* の発現も西洋型食とは反対の挙動を示した (Tigfb は減少、*Pfkfb* は増加)。したがってケルセチンは西洋型食摂取による p53 の活性化を減少させることが示唆された。Radewicz TA *et al.* はケルセチンが p53 活性を減少させることを報告しており、本実験の結果を支持している (Radewicz *et al.*, 2010)。したがって、ケルセチン摂取による p53 の活性抑制による解糖系調節遺伝子 (Tigfb、*Pfkfb*) の発現制御を介した耐糖能異常改善作用が考えられた。

CPT を介した血糖値抑制作用

CPT はミトコンドリア外膜および内膜に存在し、アシル CoA を細胞質からミトコンドリアへ輸送する際のカルニチン転移酵素である。CPT には CPT1 と CPT2 の 2 種が存在し、CPT1 はミトコンドリア外膜でアシル CoA をアシルカルニチンに変換し、CPT2 はミトコンドリア内膜でアシルカルニチンをアシル CoA に再転換する。肝臓中 CPT 活性を測定した結果、ケルセチン摂取は CPT 活性を有意に低下させた。CPT1a の活性を約半分に落とした CPT1a ヘテロ欠損ノックアウトマウス（ホモ欠損では胎生致死のため）は空腹時血糖の低下および血漿遊離脂肪酸濃度の上昇を示すことが報告されており (Nyman *et al.*, 2005)、本研究の空腹時血糖の低下に CPT1a が関与していることを支持している。一方、CPT2 の変異患者は絶食時のケトン体合成の消失や筋疲労が認められている (Bonnefont *et al.*, 2004)。したがって CPT 活性の低下は、血糖値の低下という側面だけでなく、遊離脂肪酸の増加や筋疲労等の生体への悪影響を与えていることが考えられる。また、脂肪細胞においてケルセチンは CPT の発現を増加させ、 β 酸化を亢進させることが報告されており (Moon *et al.*, 2013)、組織ごとに応答が異なることも考えられる。今後、様々な組織を用いて生体への副作用等も含めケルセチンの CPT 活性に及ぼす影響を検討する必要がある。

ケルセチンのグルタチオン代謝を介した抗酸化作用

メタボロームの結果を用いて西洋型食およびケルセチン摂取により変動が顕著であったパスウェイや代謝物をみると、ともにグルタチオン代謝（西洋型食では Glutathione Biosynthesis、ケルセチン摂取では Glutathione(GSSG)）に関連するパスウェイまたは代謝物が挙げられた。グルタチオンは抗酸化作用を持つペプチドであり、過酸化水素やペルオキシナイトライトのような活性酸素種 (ROS) の存在下で還元型グルタチオン (GSH) から酸化型グルタチオン (GSSG) に変換し、ROS を消去する (Fig. 1-2-2-14F)。この反応を触媒する酵素に Glutathione reductase (GR) と Glutathione peroxidase (GPX) がある。これらの遺伝子発現量は西洋型食を摂取したマウスにより減少する傾向がみられ、ケルセチンの摂取により増加する傾向がみられた (Fig. 1-2-2-14D, E)。GR や GPX の発現量増加はグルタチオン代謝を活性化していると考えられ、実際にグルタチオン代謝の指標である GSH/GSSG 比はケルセチン摂取により増加する傾向にあった。したがって、ケルセチン摂取によりグルタチオン代謝を活性化することにより、西洋型食摂取による酸化ストレスの増加を抑制していることが示唆された。また、酸化ストレスの誘導は糖代謝を増悪化することが数多く報告されており (Lopes *et al.*, 2008; West, 2000)、ケルセチンによる耐糖能異常改善作用にグルタチオン代謝活性化による抗酸化作用が関与している可能性が

考えられた。しかし、酸化ストレスによる糖代謝異常にはインスリン抵抗性を介していることが報告されており、ケルセチン摂取による糖代謝改善作用にインスリン感受性が関与していない結果からも、ケルセチンによる抗酸化作用と糖代謝改善作用の関係についてはさらに検討する必要がある。

まとめ

西洋型食摂取およびケルセチン摂取により認められた作用を Table 1-2-2-13 にまとめた。西洋型食摂取は生活習慣病にて観察される様々な病態を示した。一方、ケルセチン摂取はその中の耐糖能異常および糖新生亢進に効果的に作用した。また、酵素活性および遺伝子発現解析、メタボローム解析にて西洋型食およびケルセチン摂取による肝臓での詳細な生理応答を確認したところ、CPT 活性はケルセチン摂取により著しく抑制された。また、**Estrogen mediated S-phase entry pathway** 関連遺伝子群および *Nme1* 遺伝子発現、グルタチオン代謝といった西洋型食摂取により顕著に変動した因子をケルセチン摂取は抑制していることが明らかとなった。*Nme1* や **Estrogen mediated S-phase entry pathway** 関連遺伝子群の発現変動から、ケルセチンによる p53 活性への作用が示唆され、これらの変動はケルセチン摂取により見られた糖代謝酵素の発現量の変動を介して西洋型食摂取による糖代謝異常を改善していることが考えられた。

Table 1-2-1 飼料組成

Component	AIN-93G	Western style diet
Caseine	20	19.82
L-cystine	0.3	0.3
cornstarch	39.7486	3.7458
α -cornstarch	13.2	1.25
Sucrose	10.25	34.25
Soy bean oil	7	1
cellulose	5	5
Vitamine mix	1	1
Mineral mix	3.5	3.5
Butter	-	20
Maltodextrin	-	9.98
Cholesterol	-	0.15
Total	100	100

(%)

Table 1-2-2 飼料のカロリー比

Component	AIN-93G	Western style diet
Protein	20	17
Carbohydrate	64	43
Fat	16	40
Total	100	100

(%)

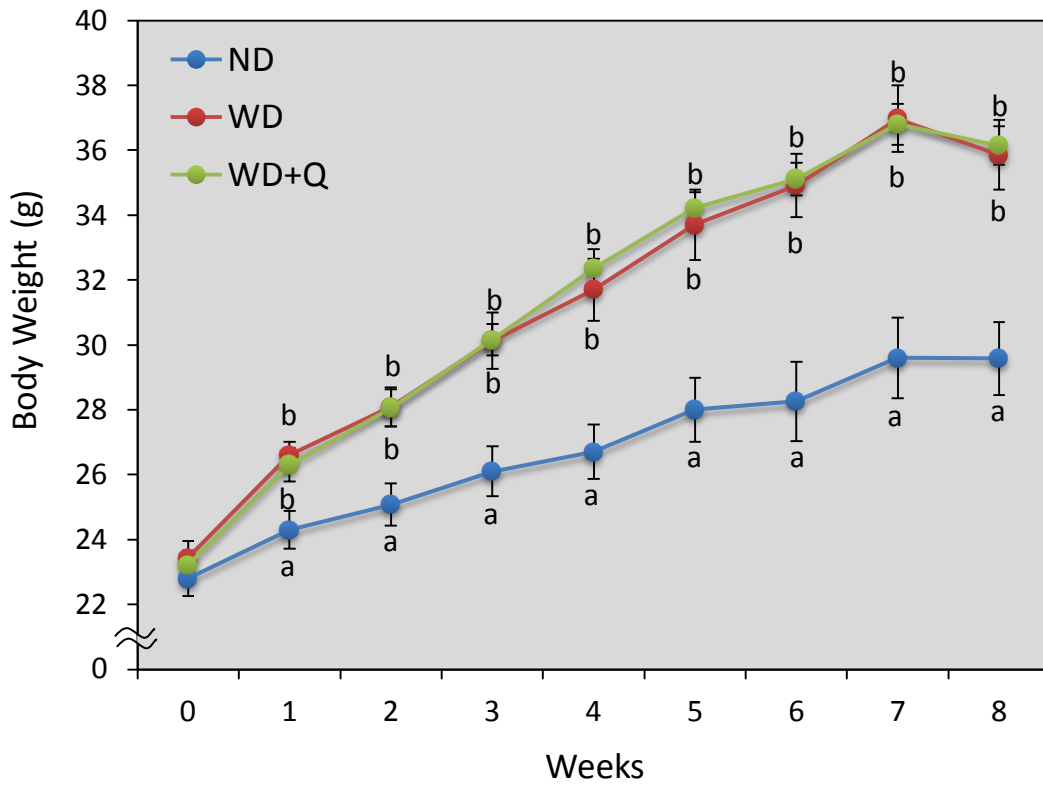
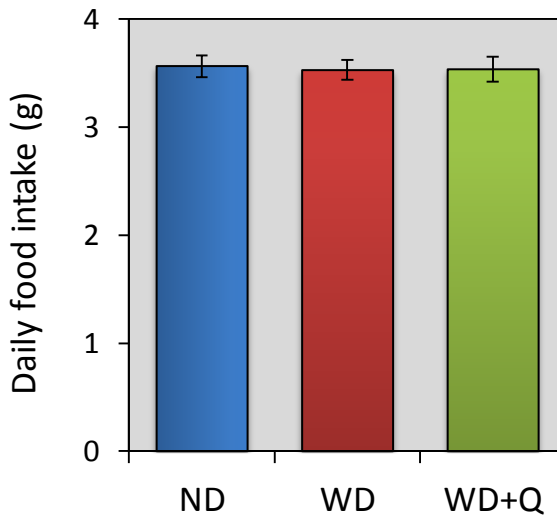
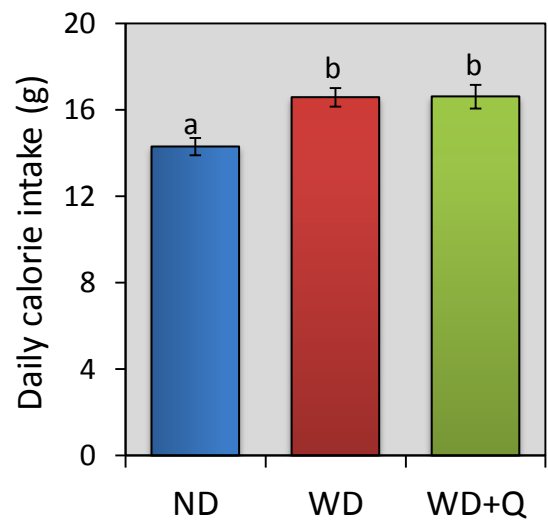
A**B****C**

Fig. 1-2-2-1 飼育期間中の体重および摂食量、摂取カロリー

A: 飼育期間中の体重推移

B: 飼育期間中の総摂食量

C: 飼育期間中の総カロリー摂取量

グラフの値は平均±S.E.を示す。 n=5 (ND),n=7 (WD,WD+Q)
異符号間で有意差あり($p<0.05$)

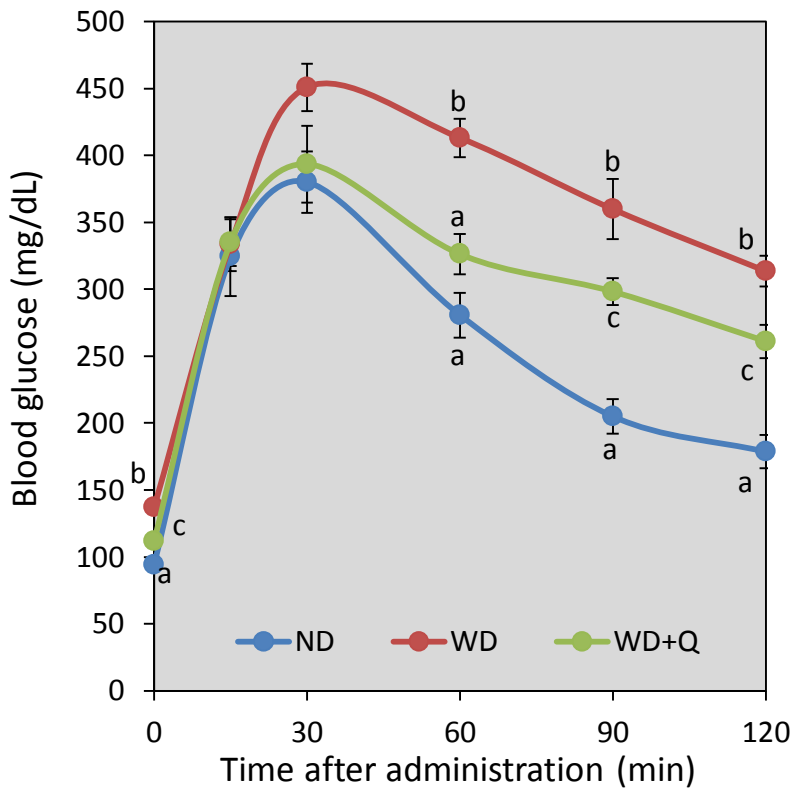
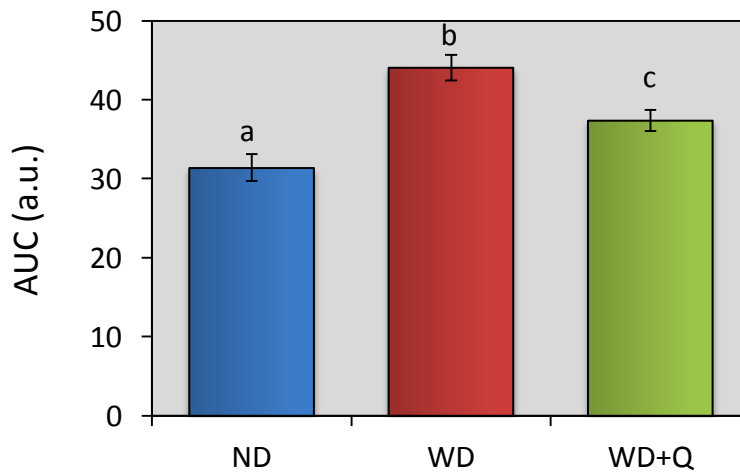
A**B**

Fig. 1-2-2-2 グルコース負荷試験における耐糖能の評価

A: グルコース負荷後の血糖値の推移

B: 血糖値曲線下面積

グラフの値は平均±S.E.を示す。 , n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)
異符号間で有意差あり($p < 0.05$)

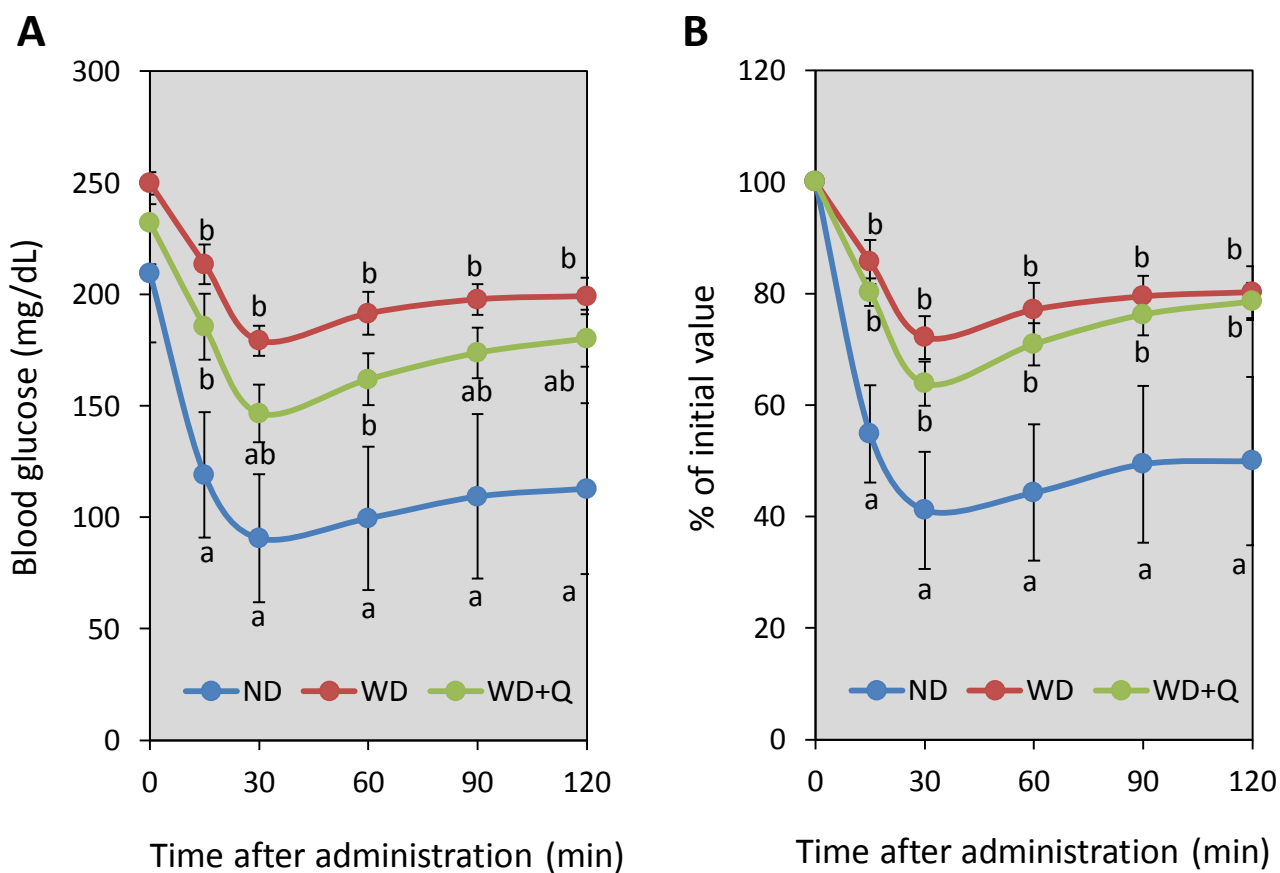


Fig. 1-2-2-3 インスリン負荷試験におけるインスリン感受性の評価

A: インスリンインスリン負荷後の血糖値の推移

B: 0分時の血糖値を100%とした時の血糖値の低下率の推移

グラフの値は平均±S.E.を示す。 n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)
異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

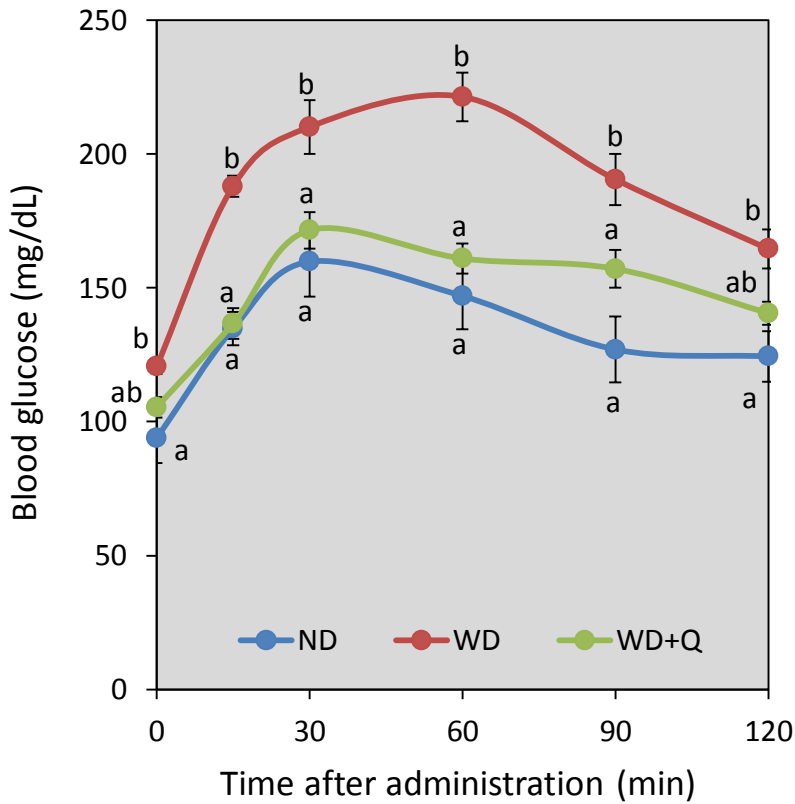
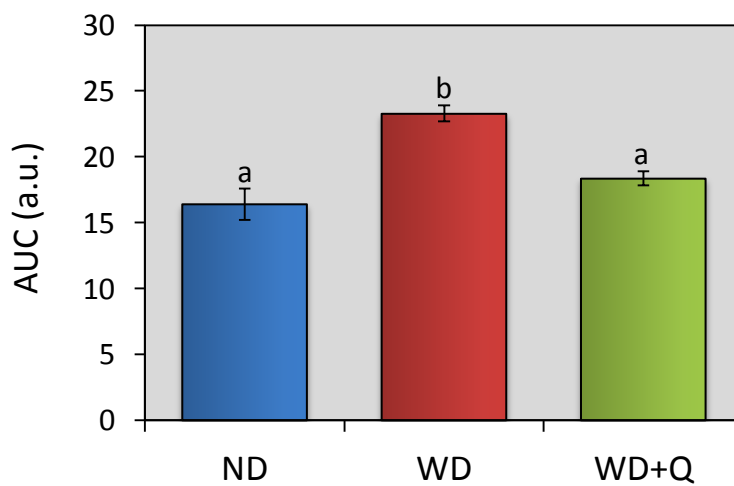
A**B**

Fig. 1-2-2-4 ピルビン酸負荷試験における糖新生の評価

A: ピルビン酸負荷後の血糖値の推移

B: 血糖値曲線下面積

グラフの値は平均±S.E.を示す。 n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)
異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

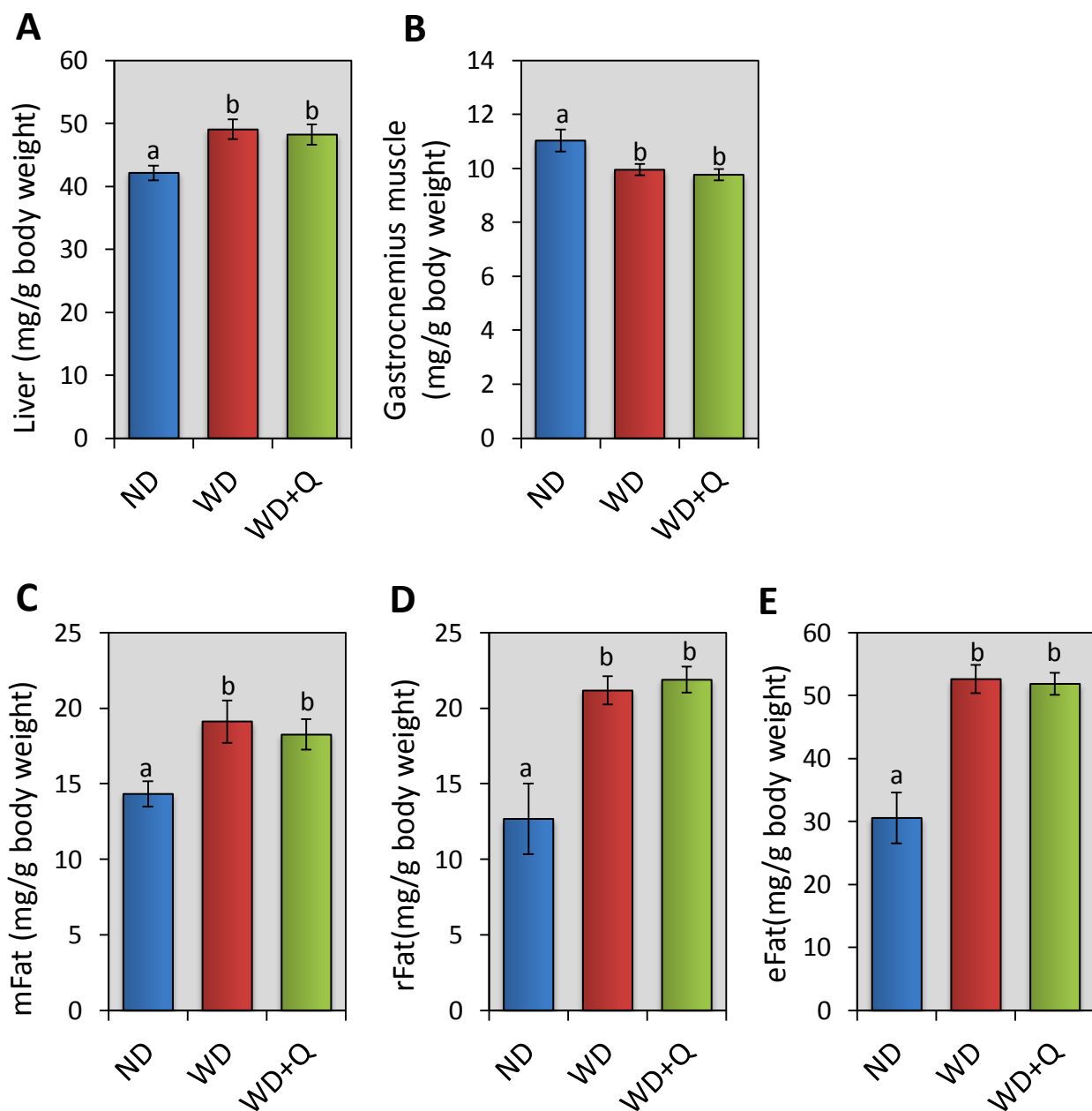


Fig.1-2-2-5 解剖時の臓器重量

A: 肝臓重量

B: 腓腹筋重量

C: 腸間膜脂肪 (mesentery fat) 重量

D: 後腹膜脂肪 (retroperitoneal fat) 重量

E: 精巣上体周囲脂肪 (epididymal fat) 重量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)

異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

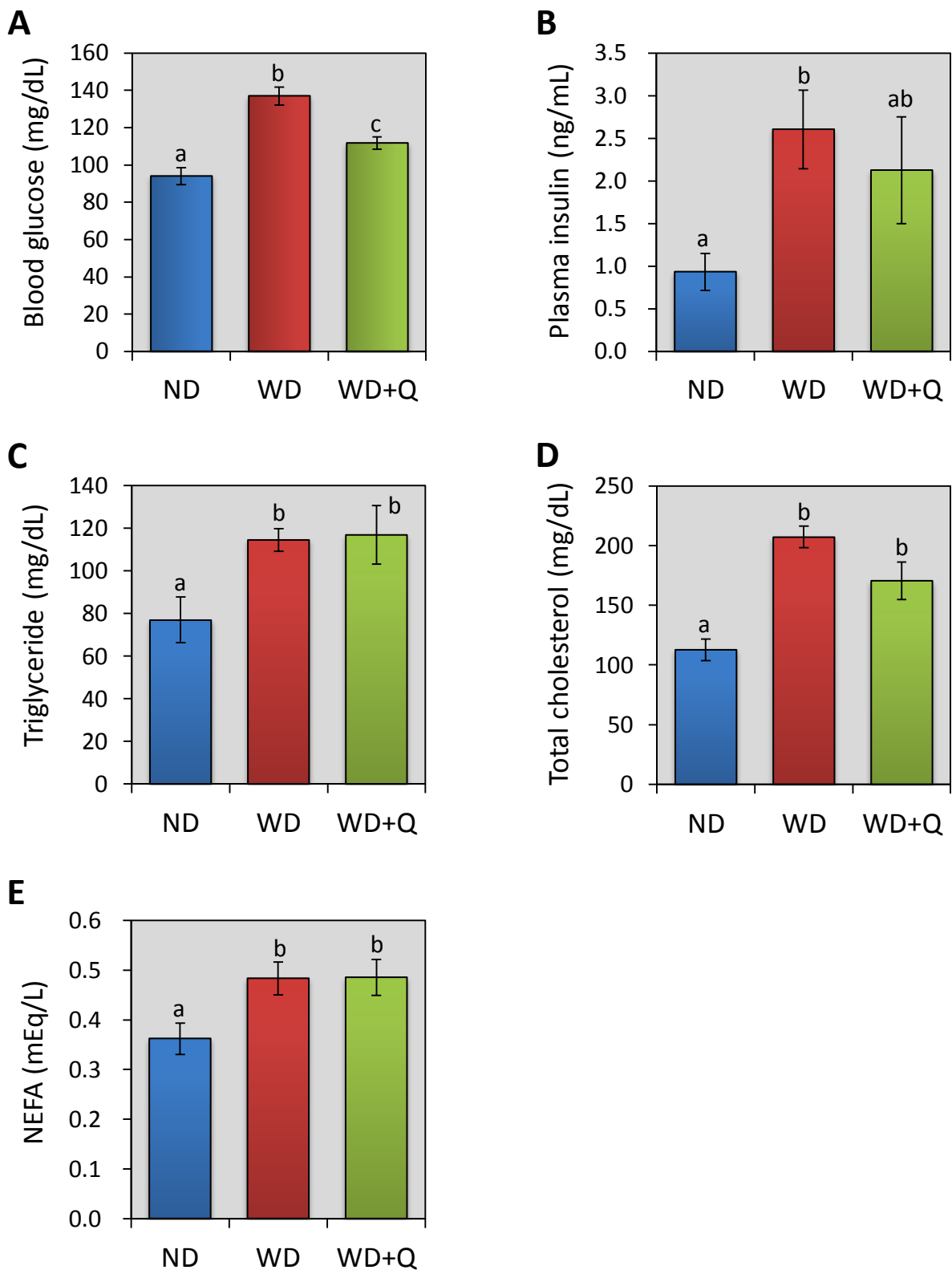


Fig.1-2-2-6 血液パラメーター値

A: 空腹時血糖値 (IPGTTの0分時)

B: インスリン値 (解剖時)

C: トリグリセライド値 (解剖時)

D: 総コレステロール値 (解剖時)

E: 遊離脂肪酸値 (解剖時)

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)

異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

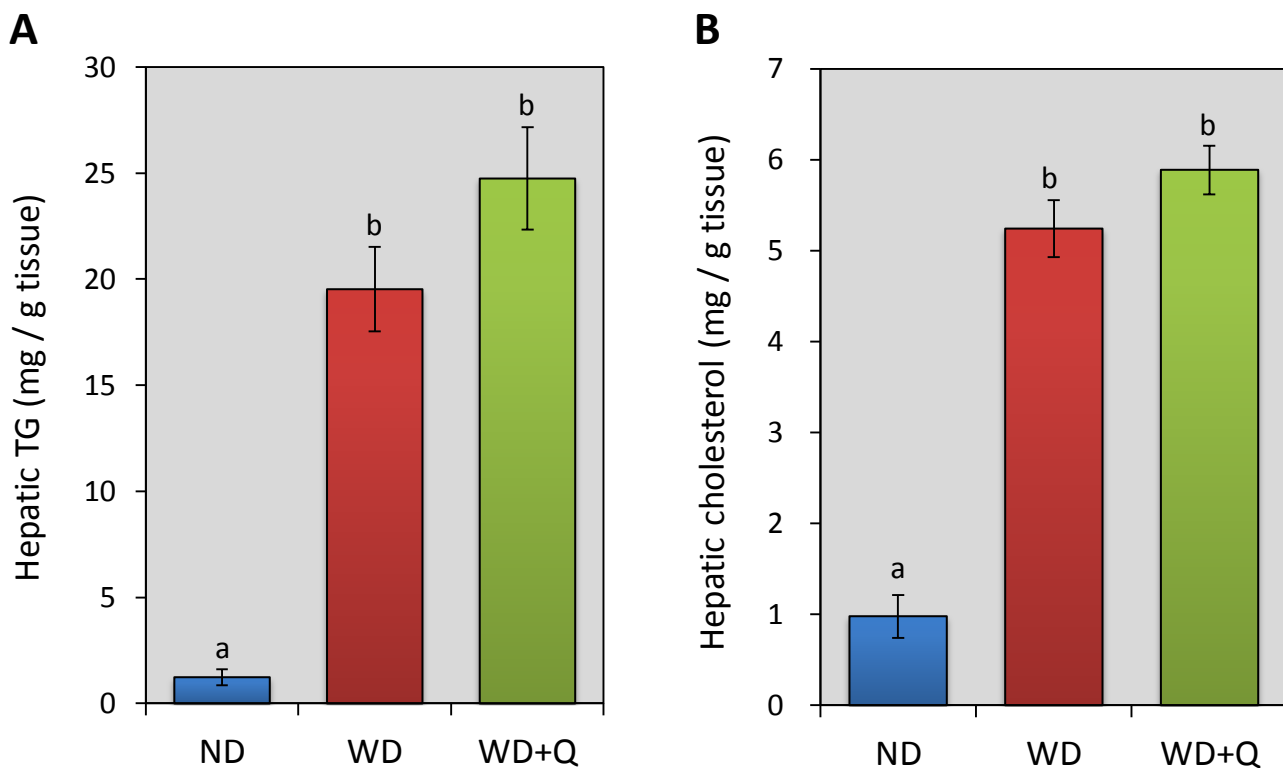


Fig.1-2-2-7 肝臓中トリグリセライド量および肝臓中総コレステロール量

A: 肝臓中トリグリセライド量

B: 肝臓中総コレステロール量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5 (ND),n=7 (WD,WD+Q)

異符号間で有意差あり($p<0.05$)

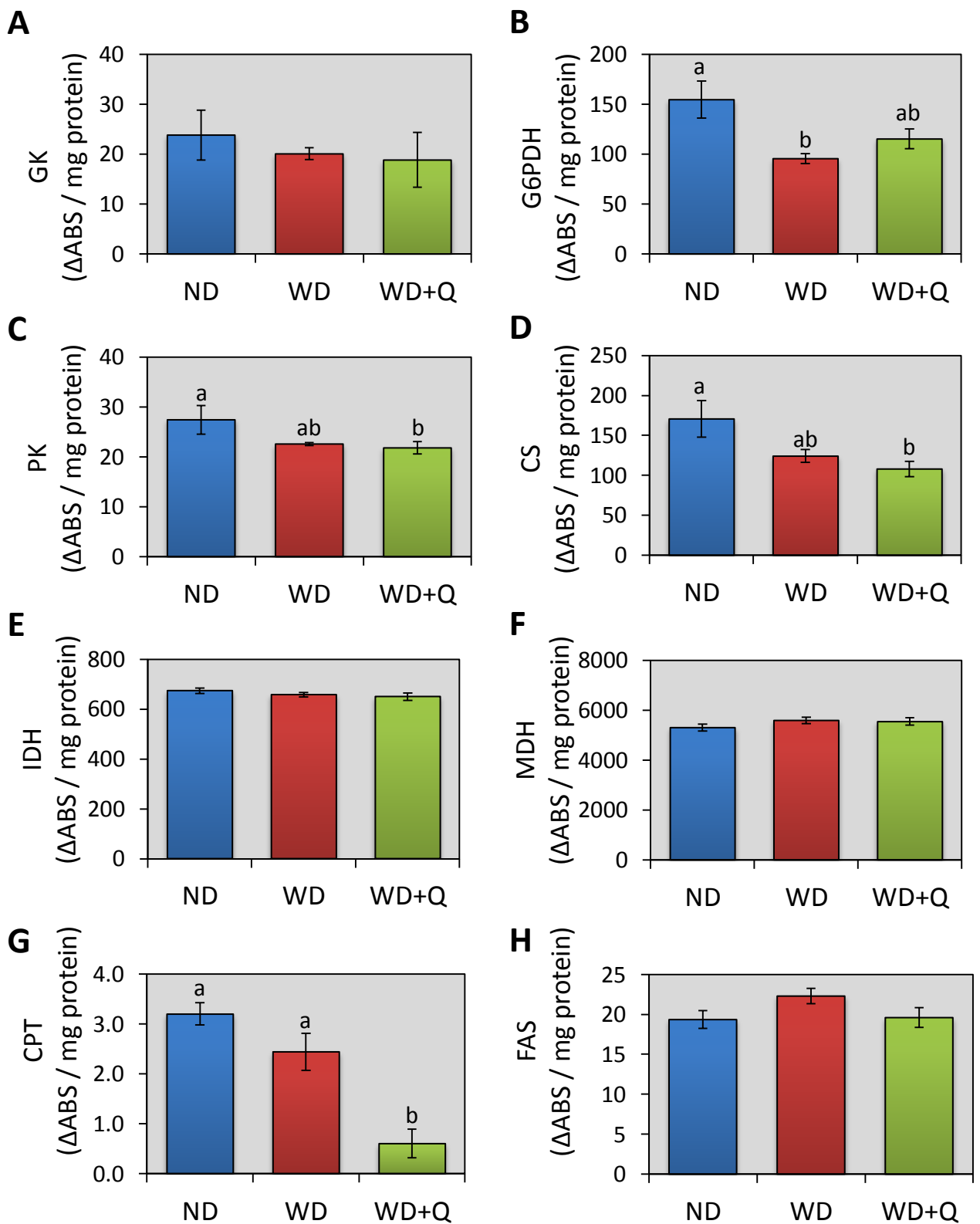


Fig.1-2-2-8 肝臓中酵素活性

A: グルコキナーゼ

C: ピルビン酸キナーゼ

E: イソクエン酸デヒドロゲナーゼ

G: カルニチンパルミトイルフェラーゼ

B: グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ

D: クエン酸合成酵素

F: リンゴ酸デヒドロゲナーゼ

H: 脂肪酸合成酵素

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5 (ND), n=7 (WD, WD+Q)

異符号間で有意差あり(p<0.05)

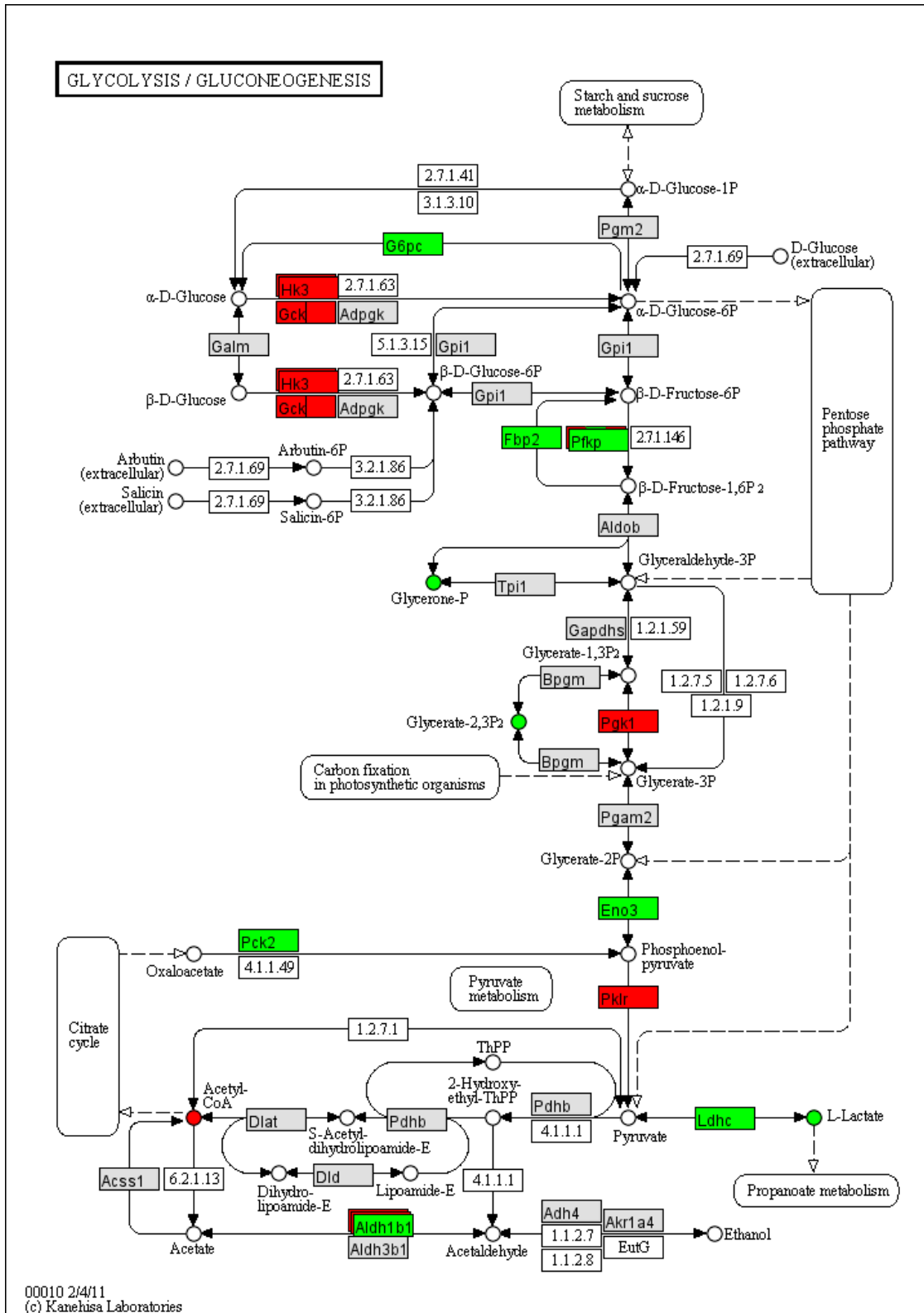


Fig.1-2-2-9 西洋型食餌摂取による解糖系・糖新生関連遺伝子および代謝物の変動
通常食群に比べ、西洋型食餌摂取により発現変動が認められた遺伝子および代謝物をKegg1eにアップロードした。変動のあった分子を色付けした(赤色:増加、緑色:減少)。

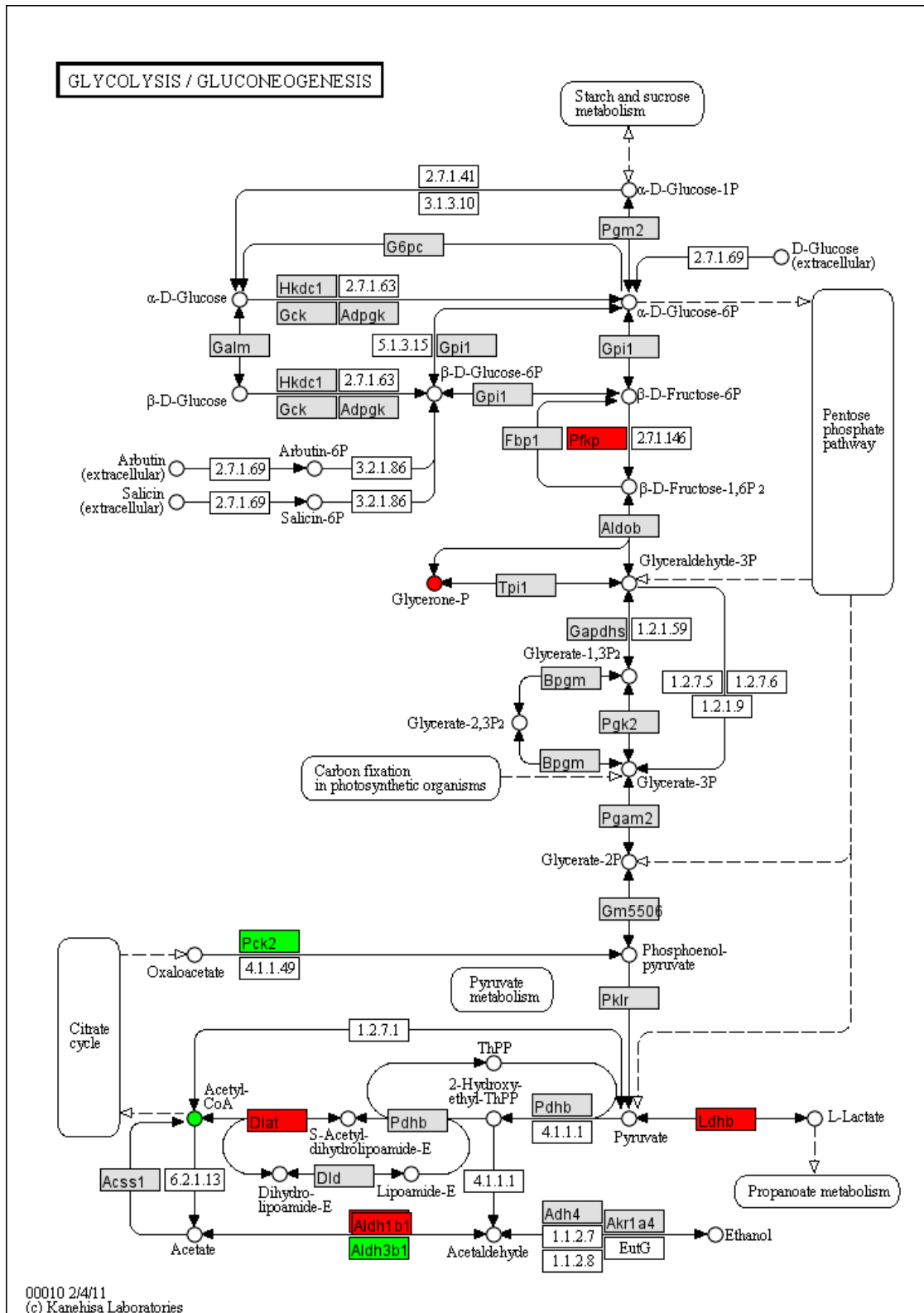


Fig.1-2-2-10 ケルセチン摂取による解糖系・糖新生関連遺伝子および代謝物の変動

西洋型食群に比べ、ケルセチン摂取により発現変動が認められた遺伝子および代謝物をKeggにアップロードした。変動のあった分子を色付けした(赤色:増加、緑色:減少)。

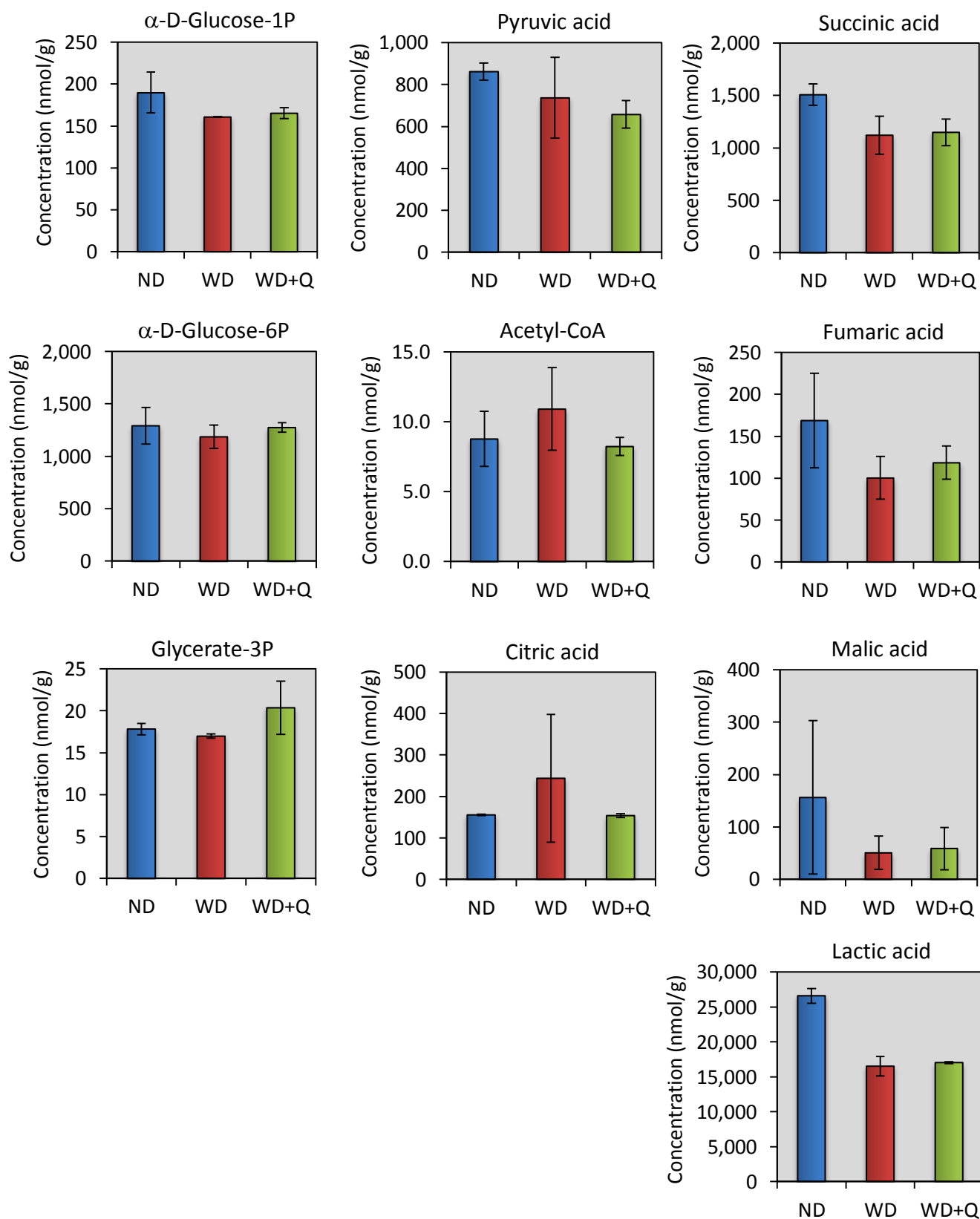


Fig.1-2-2-12 解糖系、糖新生およびTCAサイクルに関する代謝物量
 平均値±標準偏差で示した。n=2

Table 1-2-2-1 西洋型食餌摂取により顕著に増加した遺伝子およびその変動率
(Log ratio up-regulated)

Gene Symbol	Gene Name	Log Ratio
<i>CYP7A1</i>	cholesterol 7alpha-monooxygenase	2.473
<i>EZR</i>	ezrin	2.468
<i>BAD</i>	BCL2-associated agonist of cell death	2.394
<i>CLSTN3</i>	calsyntenin 3	2.368
<i>Orm1</i>	orosomucoid 1	2.286
<i>TPM2</i>	tropomyosin 2	2.031
<i>PAQR7</i>	progesterin and adipoQ receptor family member VII	1.977
<i>SHROOM2</i>	shroom family member 2	1.898
<i>Ces1d</i>	carboxylesterase 1D	1.895
<i>AATK</i>	apoptosis-associated tyrosine kinase	1.879

Table 1-2-2-2 西洋型食餌摂取により顕著に減少した遺伝子およびその変動率
(Log ratio down-regulated)

Gene Symbol	Gene Name	Log Ratio
<i>NME1</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1	-2.440
<i>CDC20</i>	cell division cycle 20	-2.419
<i>ENHO</i>	energy homeostasis associated	-2.402
<i>TFF3</i>	trefoil factor 3 (intestinal)	-2.271
<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated 1	-2.191
<i>COL3A1</i>	collagen, type III, alpha 1	-2.146
<i>IGFBP1</i>	insulin-like growth factor binding protein 1	-2.074
<i>CDK1</i>	cyclin-dependent kinase 1	-2.070
<i>PPP2R1A</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	-1.998
<i>ECT2</i>	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	-1.981

Table 1-2-2-3 ケルセチン摂取により顕著に増加した遺伝子およびその変動率
(Log ratio up-regulated)

Gene Symbol	Gene Name	Log Ratio
<i>SIGMAR1</i>	sigma non-opioid intracellular receptor 1	2.981
<i>NME1</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1	2.363
<i>RASSF1</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	2.011
<i>PHGDH</i>	phosphoglycerate dehydrogenase	1.977
<i>NDUFC2</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	1.756
<i>UBR1</i>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	1.745
<i>PPP2R1A</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	1.737
<i>IL1A</i>	interleukin 1, alpha	1.664
<i>JAM3</i>	junctional adhesion molecule 3	1.657
<i>BCAR3</i>	breast cancer anti-estrogen resistance 3	1.636

Table 1-2-2-4 ケルセチン摂取により顕著に減少した遺伝子およびその変動率
(Log ratio down-regulated)

Gene Symbol	Gene Name	Log Ratio
<i>ONECUT1</i>	one cut homeobox 1	-2.594
<i>ST3GAL6</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	-2.340
<i>INHBB</i>	inhibin, beta B	-2.331
<i>FOXN3</i>	forkhead box N3	-1.909
<i>KHSRP</i>	KH-type splicing regulatory protein	-1.882
<i>RPL37A</i>	ribosomal protein L37a	-1.862
<i>SLC7A1</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	-1.718
<i>DNM2</i>	dynamin 2	-1.714
<i>PPP1R10</i>	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	-1.714
<i>Ces1d</i>	carboxylesterase 1D	-1.707

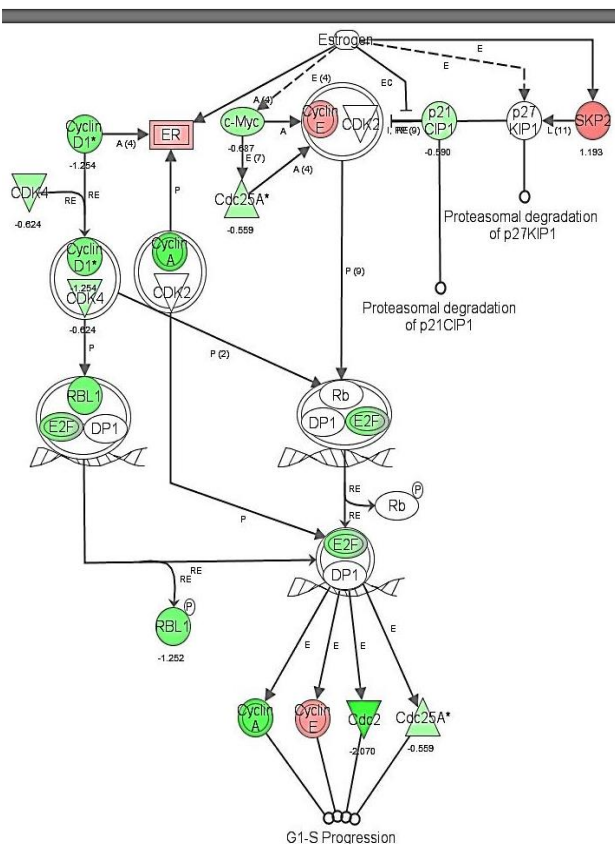
Table 1-2-2-5 西洋型食餌摂取により発現変動が顕著であった
遺伝子群のパスウェイ

Top canonical pathway	-log(P-value)
ATM Signaling	4.69E00
Estrogen-mediated S-phase Entry	3.08E00
GADD45 Signaling	2.67E00
Role of JAK2 in Hormone-like Cytokine Signaling	2.55E00
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.31E00
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	2.12E00
TR/RXR Activation	2.07E00
Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	1.82E00
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	1.76E00
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	1.69E00

Table 1-2-2-6 ケルセチン摂取により発現変動が顕著であった
遺伝子群のパスウェイ

Top canonical pathway	-log(P-value)
Estrogen-mediated S-phase Entry	3.72E00
Calcium Signaling	3.43E00
PTEN Signaling	3.32E00
Glioma Signaling	3.22E00
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.9E00
Glucocorticoid Receptor Signaling	2.66E00
Renal Cell Carcinoma Signaling	2.63E00
ATM Signaling	2.57E00
GADD45 Signaling	2.46E00
IGF-1 Signaling	2.4E00

A



B

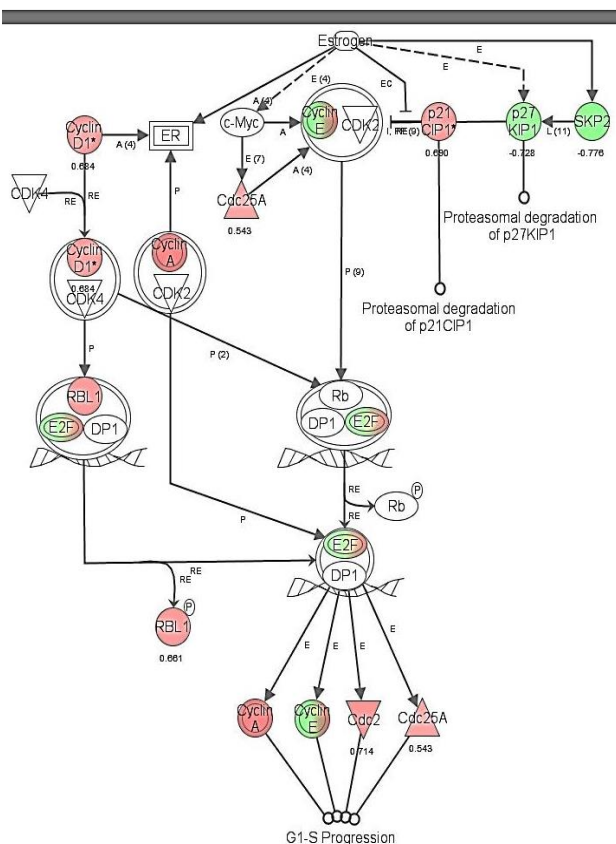


Fig.1-2-2-13 西洋型食とケルセチン摂取によるEstrogen-mediated S-phase entry pathway因子の変動

IPAにより生成された図を示す。赤色はその発現が上昇したことを表し、緑色は発現が抑制されたことを表している。色が濃い程発現変動が大きいことを示している。

A: 西洋型食餌摂取による影響

B: ケルセチン摂取による影響

Table 1-2-2-7 西洋型食餌摂取により顕著に増加した代謝物および
その変動率(Fold Change up-regulated)

Metabolite Name	Fold Change
Isethionic acid	2.4
XA0019	2.2
Myristoleic acid	2.1
UDP-glucuronic acid	1.8
Isoglutamic acid	1.7
Ethyl glucuronide	1.6
Citric acid	1.6
Taurine	1.5
Glucuronic acid	1.5
Ascorbate 2-glucoside	1.5

Table 1-2-2-8 西洋型食餌摂取により顕著に減少した代謝物および
その変動率(Fold Change down-regulated)

Metabolite Name	Fold Change
Cholic acid	0.06
S-Methylmethionine	0.2
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	0.2
Trimethylamine	0.2
Dihydroxyacetone phosphate	0.2
Ophthalmic acid	0.2
3-Indoxylsulfuric acid	0.3
<i>N</i> ⁸ -Acetylspermidine	0.3
Malic acid	0.3
<i>myo</i> -Inositol 1-phosphate <i>myo</i> -Inositol 3-phosphate	0.4

Table 1-2-2-9 ケルセチン摂取により顕著に増加した代謝物および
その変動率(Fold Change up-regulated)

Metabolite Name	Fold Change
Cholic acid	3.8
3-Ureidopropionic acid	1.7
Ascorbic acid	1.6
Decanoic acid	1.6
Sarcosine	1.5
Cys	1.5
Adenylosuccinic acid	1.4
N-Acetylneuraminic acid	1.4
XC0126	1.4
<i>myo</i> -Inositol 1-phosphate <i>myo</i> -Inositol 3-phosphate	1.4

Table 1-2-2-10 ケルセチン摂取により顕著に減少した代謝物および
その変動率(Fold Change down-regulated)

Metabolite Name	Fold Change
XA0019	0.4
Glucosamine	0.5
Pterin	0.5
Phenaceturic acid	0.6
Citric acid	0.6
Creatinine	0.7
Glutathione (GSSG)_divalent	0.7
Spermine	0.7
Acetyl CoA_divalent	0.8
4-Guanidinobutyric acid	0.8

Table 1-2-2-11 西洋型食餌摂取により変動が顕著であった代謝物のパスウェイ

Metabolite Name	-log(P value)
TCA Cycle II (Eukaryotic)	3.8E00
Glycine Degradation (Creatine Biosynthesis)	3.72E00
Glutathione Biosynthesis	3.43E00
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	3.29E00
Colanic Acid Building Blocks Biosynthesis	3.27E00
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis II	3.23E00
Urate Biosynthesis/Inosine 5'-phosphate Degradation	3.19E00
L-carnitine Biosynthesis	2.99E00
Purine Nucleotides Degradation II (Aerobic)	2.95E00
UDP-N-acetyl-D-glucosamine Biosynthesis II	2.81E00

Table 1-2-2-12 ケルセチン摂取により変動が顕著であった代謝物のパスウェイ

Metabolite Name	-log(P value)
UDP-N-acetyl-D-glucosamine Biosynthesis II	5.42E00
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis II	4.64E00
Spermine and Spermidine Degradation I	4.13E00
Acetyl-CoA Biosynthesis III (from Citrate)	3.27E00
Serotonin and Melatonin Biosynthesis	2.63E00
Spermine Biosynthesis	2.2E00
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	2.2E00
Fatty Acid Biosynthesis Initiation II	2.2E00
GDP-L-fucose Biosynthesis II (from L-fucose)	2.03E00
Antioxidant Action of Vitamin C	2.03E00

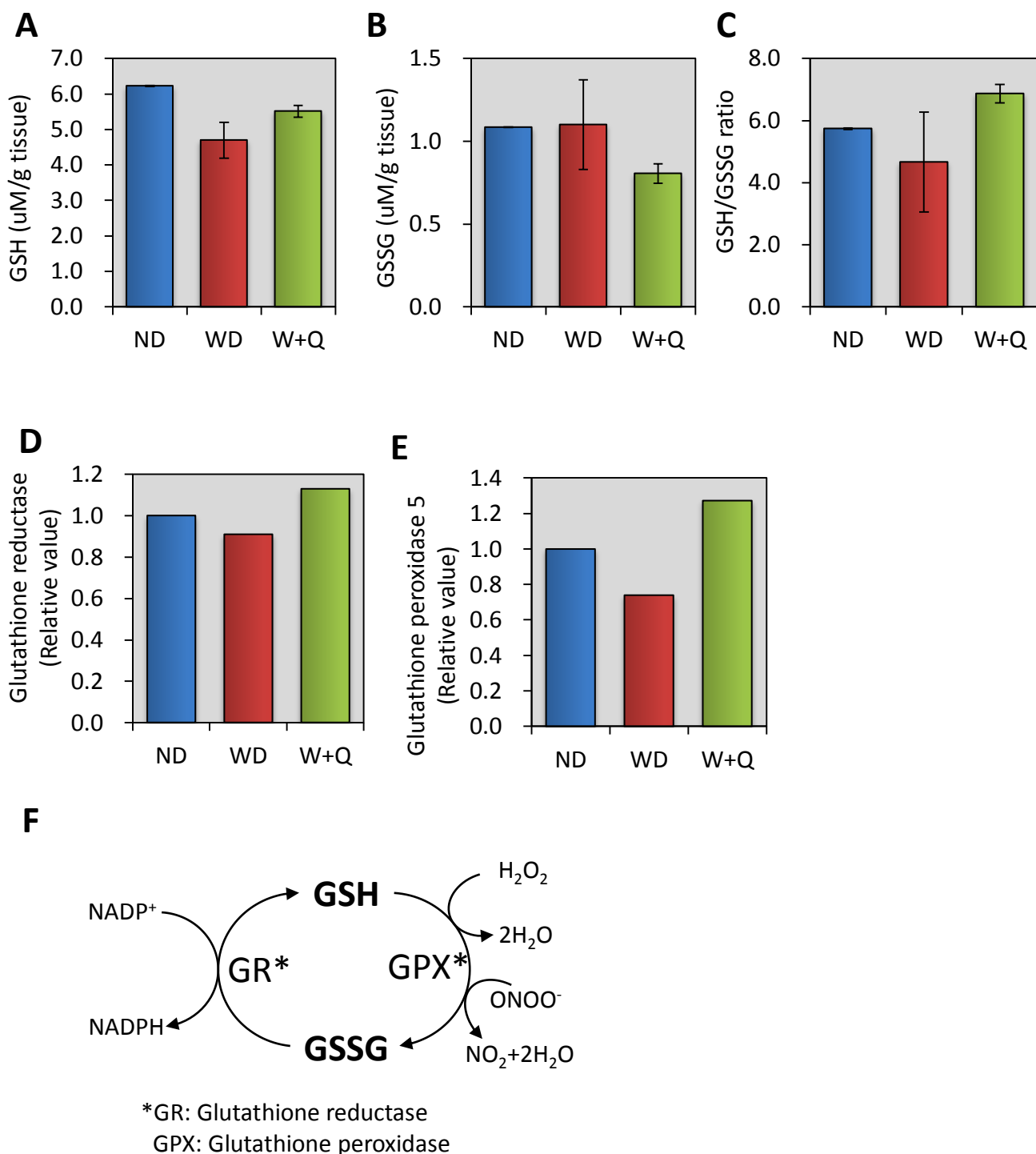


























Fig.1-2-2-14 グルタチオン代謝に関する代謝物量および遺伝子発現

- A: グルタチオン(GSH)量(メタボロームデータ)
 B: 酸化型グルタチオン(GSSG)量(メタボロームデータ)
 C: GSH/GSSG比(メタボロームデータ)
 D: グルタチオンレダクターゼmRNA発現量(マイクロアレイデータ)
 E: グルタチオンペルオキシダーゼ5 mRNA発現量(マイクロアレイデータ)
 F: グルタチオン代謝関連マップ

平均値±標準偏差で示した。

メタボロームデータ: n=2, マイクロアレイデータ: n=1


Table 1-2-2-13 西洋型食およびケルセチンの影響のまとめ


	WD vs. ND	WD+Q vs. WD
体重・脂肪重量		
耐糖能		
インスリン感受性		
糖新生		
血中TG		
血中コレステロール		
肝臓TG		
肝臓コレステロール		
CPT活性		
エストロゲン経路遺伝子発現		
NME1発現		
グルタチオン代謝		


WD vs. ND: NDに対するWDの変化


WD+Q vs. WD: WDに対するWD+Qの変化

 : 増加、亢進

 : 減少、抑制

 : 増加傾向、亢進傾向

 : 減少傾向、抑制傾向

 : 変化なし

第二章

フラボノイドの摂取が

廃用性筋萎縮モデル動物に及ぼす影響の解析

緒言

近年の医学・医療の進歩と生活環境基盤の整備により、日本は世界に例を見ない高齢社会となった。そして生じてきた問題点は寝たきり等の介護の必要な高齢者が急激に増加傾向を示してきた。また、この中には要支援、軽度の要介護高齢者が多くを占めており、運動器疾患対策を充実させれば自立を保てる高齢者が多い。高齢者が運動器疾患を引き起こす過程は腰痛や変形性関節症などの慢性疼痛による廃用性症候群（筋萎縮や骨量減少等）と加齢に伴う運動機能の低下による骨粗鬆症や筋機能の低下（サルコペニア）がある。いずれも早期診断と早期治療、予防が重要であり、運動療法などのリハビリテーション治療により防ぐことができる。

運動器疾患の中でも、人体最大の組織である骨格筋の萎縮は高齢者の QOL に重大な影響を与える。筋萎縮は筋ジストロフィー等の遺伝的なもの、加齢により誘導されるサルコペニア、骨折や寝たきり等による廃用性筋萎縮および糖尿病や癌、敗血症等により引き起こされる二次性の筋萎縮等が存在する(Lecker *et al.*, 1999)。この中でも高齢者において問題視されている筋萎縮はサルコペニアと廃用性筋萎縮であり、これらの筋萎縮発症の分子メカニズムやその治療法に関する研究が精力的に行われている。

筋肉量は筋タンパク質の合成と分解のバランスにより調製されていると考えられており、筋萎縮は筋タンパク質合成の低下または、分解の亢進により発症すると考えられている。筋タンパク質合成は成長ホルモン等の内分泌系による制御や(Vandenberg *et al.*, 1991)、タンパク質やアミノ酸といった栄養素の摂取等により制御されていることがわかっている。一方、筋タンパク質分解は、飢餓状態(Gomes *et al.*, 2001)やステロイド剤投与(Shimizu *et al.*, 2011)、悪液質および酸化ストレス等(Cai *et al.*, 2004)により制御されていることがわかっており、その際にタンパク質分解経路の一つであるユビキチン・プロテアソーム活性が上昇していることが報告されている(Jagoe and Goldberg, 2001)。Bodine *et al.*は筋萎縮時のユビキチン・プロテアソーム活性上昇に関与するユビキチンリガーゼとして *Atrogin1* と *Murf1* を同定した(Bodine *et al.*, 2001)。これら 2 つの遺伝子の発現は神経切除や飢餓状態等により増加し、これらのノックアウトマウスは筋萎縮を抑制することがわかっている。また、これらの発現誘導には成長因子を介した IGF-1 - Akt 経路(Sandri *et al.*, 2004)や悪液質因子等を介した IKK - NF- κ B 経路(Cai *et al.*, 2004)が関与していることが明らかとなっている (Fig. 2-0-1、Fig. 2-0-2)。 *Atrogin1* および *Murf1* のノックアウトマウスが筋萎縮に抵抗性を示すことからわかるように、これら遺伝子の発現抑制を示すものは筋萎縮抑制作用を持つことを示唆している。

我々の研究室では以前、ゲニステインを摂取させた *db/db* マウス（糖尿病モデル）の骨格筋で DNA マイクロアレイを行った際に *Atrogin1* の発現が抑制されていることを見出している(末安, 2011)。また、骨格筋培養細胞を用いた研究等において、ケルセチン等のポリフェノールが *Atrogin1* や *Murfl* の発現を低下させることが報告されている(Hemdan *et al.*, 2009)。これらの報告は、ゲニステインやケルセチンの摂取が筋萎縮を抑制することを示唆している。しかしながら、これらフラボノイドの摂取による筋萎縮抑制作用についてはほとんど報告されておらず、その機能性は不明である。

そこで、本章では新規のフラボノイドの機能性として、ゲニステイン及びケルセチンが筋萎縮に及ぼす作用について、筋萎縮モデルラットを用いて検討した。筋萎縮の誘導は坐骨神経切除により行い、このモデルは廃用性筋萎縮のモデルとして広く用いられている。本章では以下の 2 点について検討を行った。

第一節 筋萎縮誘導初期（神経切除 4 日目）でのフラボノイドの効果の検証

第二節 筋萎縮誘導後期（神経切除 10 日目）でのフラボノイドの効果の検証

これは、これまでに食品因子による筋萎縮抑制作用に関する坐骨神経切除モデルを用いた研究で、筋萎縮誘導初期または後期でその作用が異なることが報告されており(Ogawa *et al.*, 2013)、誘導初期に筋萎縮抑制効果を示すことが報告されているため、誘導期間の違いによる作用を検証した。

第一節

フラボノイドの摂取が坐骨神経切除誘導性筋萎縮ラットに及ぼす影響の解析①

2-1-1 方法

飼育条件

9 週齢雄性 Wistar ラット（日本チャールズブリバー）を室温 24℃、12 時間明暗サイクルの明暗条件下（8:00～20:00 明期）で 1 週間予備飼育した。予備飼育後、ラットを標準食群（CON 群）および 0.05%、0.2%、0.5% ゲニステイン（LC Laboratories, G-6055, >99%）添加食群（0.05G 群、0.2G 群、0.5G 群）、0.1%、0.2%、0.5% ケルセチン（sigma, Q4951, ≥98%）添加食群（0.1Q 群、0.2Q 群、0.5Q 群）の 7 群（n=3）に分け、17 日間飼育した（Fig. 2-1-1-1A）。餌は AIN-93G を基にタンパク質量を 20%、また油脂源をコーン油に調製したものを用いた（Table 2-1-1）。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

1) CON 群	AIN-93G 食群
2) GEN 0.05%群	0.05%ゲニステイン添加食群
3) GEN 0.2%群	0.2%ゲニステイン添加食群
4) GEN 0.5%群	0.5%ゲニステイン添加食群
5) QUE 0.1%群	0.1%ケルセチン添加食群
6) QUE 0.2%群	0.2%ケルセチン添加食群
7) QUE 0.5%群	0.5%ケルセチン添加食群

14 日目に片方の肢の坐骨神経を切除し（Denervation; Den）、もう一方の肢には偽手術（Sham）処置を施した。坐骨神経切除の方法については以下に示した。筋萎縮誘導 4 日後に解剖を行った。解剖はソムノペンチル（共立製薬）麻酔下で、腹部大静脈より採血を行い、放血後、下肢骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋）の摘出を行った。血液はヘパリン処理後、遠心分離し（3,000×g、4℃、10 min）、血漿を得た。下肢骨格筋は湿重量を測定後、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

坐骨神経の切除

器具の消毒はオートクレーブまたは 5%ヒビテン液（大日本住友製薬）で行った。イソフルラン（インターベット）麻酔下で、大腿骨近位部を約 1 cm 切開し（Fig. 2-1-1-2）、大腿二頭筋と大腿四頭筋の間をピンセットでかき分け坐骨神経を露出させ、約 1cm 切除した。Sham 処置は坐骨神経を露出させるところまで

行った。その後縫合を行い、術後はイソジン（Meiji Seika ファルマ）で切開部位の消毒を行った。

統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析は一元配置の場合は Dunnett 法を用いて行った。二元配置の場合は二元配置分散分析後、Tukey 法を用いて有意差の検定を行った。

2-1-2 結果

体重および摂食量

14 日目および 17 日目の体重は、全ての群で有意な差は認められなかったが、ゲニステインは濃度依存的に体重を減少させる傾向にあった（Fig. 2-1-2-1A）。ケルセチン摂取による影響は認められなかった。

0.2%以上のゲニステイン摂取は、摂食量を濃度依存的に低下させる傾向があった（Fig. 2-1-2-1B）。ケルセチンによる摂食量への影響は認められなかった。

坐骨神経切除 4 日後の筋重量および Sham 肢に対する筋重量比

坐骨神経切除 4 日後の腓腹筋およびヒラメ筋、前脛骨筋重量はすべての群において Sham 肢に比べ Den 肢で有意な減少または減少傾向を示した（Fig. 2-1-2-2A, C, E）。Sham 肢および坐骨神経切除肢の筋重量にフラボノイド摂取の影響は認められなかった。また、Sham 肢に対する坐骨神経切除肢の重量比はすべての筋肉において、フラボノイド摂取による影響は認められなかった（Fig. 2-1-2-2B, D, F）。

第二節

フラボノイドの摂取が坐骨神経切除誘導性筋萎縮ラットに及ぼす影響の解析②

2-2-1 方法

飼育条件

9 週齢雄性 Wistar ラット（日本チャールズブリバー）を室温 24℃、12 時間明暗サイクルの明暗条件下（8:00～20:00 明期）で 1 週間予備飼育した。予備飼育後、ラットを標準食（CON）群、ゲニステイン添加食（GEN）群、ケルセチン添加食（QUE）群の 3 群に分け、24 日間飼育した（Fig. 2-1-1-1B）。CON 群には AIN-93G 食を、GEN 群には 0.05%ゲニステイン添加食を、QUE 群には 0.1%ケルセチン添加食を摂取させた。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

- 1) CON 群 : AIN-93G 食群
- 2) GEN 群 : 0.05%ゲニステイン添加食群
- 3) QUE 群 : 0.1%ケルセチン添加食群

14 日目に片方の肢の坐骨神経を切除し（Denervation; Den）、もう一方の肢には偽手術（Sham）処置を行った。坐骨神経切除の方法については「第一章 第一節 坐骨神経の切除」と同様の方法で行った。21 日目に小動物用 X 線 CT 装置（Latheta ; 日立 Aloka）により筋肉量を測定し、24 日目に解剖を行った。解剖はソムノペンチル（共立製薬）麻酔下で、腹部大静脈より採血を行い、放血後、下肢骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋）の摘出を行った。血液はヘパリン処理後、遠心分離（3000×*g*、4℃、10 min）し、血漿を得た。下肢骨格筋（腓腹筋およびヒラメ筋、前脛骨筋）は湿重量を測定後、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

小動物用 X 線 CT 装置を用いた筋肉量の測定

小動物用 X 線 CT 装置を用いた筋肉量の測定は、坐骨神経切除 3 および 7 日目に、ラットをイソフルラン（インターベット）麻酔下で行った。Fig. 2-2-1-1A のように脛骨と腓骨が撮影断面に対して垂直になるように、ラットを装置に固定した。測定は脛骨と腓骨の近位側の接点から遠位側の接点までを 1 mm 間隔で行った（Fig. 2-2-1-1B）。得られたデータは付属のソフトウェアを用いて、筋肉量を求めた。

血中の生化学的パラメーター解析

血漿パラメーターは市販のキットを用いて行った。インスリンはモリナガラットインスリン測定キット (Morinaga) を用いてサンドイッチエライザ法で測定した。アルブミンは A/G B-テストワコー (Wako) を用いて BCG 法により測定した。TBARS 濃度は市販の TBARS assay kit (Cayman Chemical) を用いて行った。方法はキットのプロトコルに従って行った。

骨格筋からの total RNA の抽出

ヒラメ筋 (約 50 mg) を 1 ml TRIzol 試薬 (Invitrogen) に入れポリトロン型ホモジナイザー (Kinematica) でホモジナイズした。室温で 5 分静置した後、200 μ l クロロホルムを加えて強く攪拌した。室温で 2~3 分間静置した後、遠心分離を行った (4°C、16,000 $\times g$ 、15 min)。上層 250 μ l に 500 μ l のイソプロパノールを加えて軽く転倒混和し、室温で 10 分間静置後、遠心分離を行った (4°C、16,000 $\times g$ 、10 min)。上清を取り除いた後に 80%エタノールを 1 ml 入れて軽く転倒混合し、遠心分離を行った (4°C、16,000 $\times g$ 、5 min)。上清を取り除き蒸発乾固させた後、RNase Free Water を加えてインキュベーションを行った (55°C、10 min)。さらにエタノール沈殿を一度行い、抽出した RNA サンプルはアガロースゲル電気泳動^{*1}により分解がないことを確認した後、-80°C で保存した。

※1 電気泳動

25 ml D.D.W に 0.75 g アガロース S (ニッポン・ジーン) を入れ加熱して透明になるまで溶かした。そこに 65°C で加温した 8.5 ml ホルムアルデヒド、11.5 ml D.D.W、5 ml 10 \times MOPS (Sigma-Aldrich) 溶液を加えた。混合溶液を 65°C で 10 分加温した後、型に流し込んで約 60 分間静置しゲルを作製した。抽出した RNA サンプル 2.0 μ g に 8.0 μ l 変性 buffer を加え 65°C で 10 分間加温後、氷上で保管しゲルに全量をアプライして電気泳動を行った。

定量的 RT-PCR

逆転写は PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いて行った。PCR は設計したプライマーと SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus; タカラバイオ) を用いて行った。方法はタカラバイオ社の標準プロトコルに従った。

プライマー

Atrogin1 F: TTGTGCGATGTTACCCAAGAA

Atrogin1 R: GGTGAAAGTGAGACGGAGCA

Murf1 F: GAGGAGGAGGAGGAGGATCAA

Murf1 R: CAAGGAGCCCTAACCCCATC
18s rrna F: ACTCAAACACGGGAAACCTCA
18s rrna R: AACCAGACAAATCACCTCCAC

DNA microarray

マイクロアレイは群ごとに total RNA をプールし行った。total RNA 100 ng 相当量を調製しマイクロアレイを行った。3' IVT Express Kit (Affymetrix) を用いて RNA からの cDNA 合成、cDNA を鋳型としたビオチン標識 cRNA を合成した。洗浄、および断片化した後に GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) に 45°C、16 時間ハイブリダイズした。方法は Affymetrix 社の標準プロトコルに従って行った。データの解析には GCOS (Affymetrix GeneChip® Operating Software) を用いた。

変動遺伝子の発現解析には、IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) (<http://www.ingenuity.com/index.html>) を用いた。CON 群において神経切除により変動した遺伝子 (Den vs. Sham) または、GEN 群および QUE 群の神経切除肢において変動が認められた遺伝子 (GEN-Den vs. CON-Den, QUE-Den vs. CON-Den) を IPA にアップロードし、解析を行った。

骨格筋からのタンパク質抽出液の調製

ヒラメ筋を SK ミル - 100 (Tokken) で凍結破碎後、約 50 mg を秤り取り、500 µl の RIPA buffer (組成は後述) に入れポリトロン型ホモジナイザー (Kinematica) でホモジナイズした。1 時間ローテーターで攪拌後、遠心分離 (14,000×g、4°C、30 min) し、上清をタンパク質抽出液とした。抽出液のタンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いて、BCA 法により測定した。測定はキットに付属のプロトコルに従って行った。

RIPA Buffer 組成

50 mM Tris pH 7.6
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1% TritonX-100
1% Sodium Deoxycholate
0.1% SDS

ウエスタンブロット法

SDS-PAGE に供する際、8-10%のアクリルアミドゲルを用いた。タンパク質 20 µg のタンパク抽出液に 3×Laemmli's Buffer を加えて 5 分間煮沸したサンプル

ルを SDS-PAGE に供した。いずれも、泳動槽は Mini-PROTEAN 3 cell (Bio-Rad) を用いた。泳動終了後、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) へのブロッティングを、セミドライブロッター (アナテック) を用いたセミドライ式で行った (定電流 1mA/cm²、45~60 分)。なお用いた泳動 Buffer および Blotting Buffer の組成については後述する。

ブロッティング終了後、PVDF 膜を Blocking Buffer [TBS-T (組成は後述) +3% BSA (ナカライテスク)] または PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO) に浸し、室温で 1 時間もしくは 4°C で一晩ブロッキングした。

各種抗体による検出は、次のように行った。すなわち、1 次抗体は後述する濃度に Blocking Buffer または Can Get Signal Solution1 でそれぞれ希釈して用い、4°C で一晩インキュベートした。続いて、TBS-T で 5 回洗浄後、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体 (GE Healthcare または Santa Cruz) を TBS-T または Can Get Signal Solution2 で 1:2500~1:10000 に希釈して用い、室温で 1~1.5 時間インキュベートした。最後に TBS-T で 5 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で化学発光させた。化学発光は Ez-CaptureMG (ATTO) で検出し、CS Analyzer3.0 (ATTO) を用いてデンシトメトリー解析により定量を行った。

用いた一次抗体およびその希釈倍率は以下のとおりである。

anti-Akt antibody (Cell Signaling, #9272): rabbit polyclonal

希釈倍率 1:1000

anti-phospho-Akt(Ser473) antibody (Cell Signaling, #9271): rabbit polyclonal

希釈倍率 1:1000

anti-Foxo1 antibody (Cell Signaling, #2880): rabbit monoclonal

希釈倍率 1:1000

anti-ER α antibody (Millipore, 04-1564): mouse monoclonal

希釈倍率 1:1000

anti-ER β antibody (Millipore, 04-824): rabbit monoclonal

希釈倍率 1:1000

anti-IRS-1 antibody (Millipore, 06-428): rabbit polyclonal

希釈倍率 1:1000

anti-GAPDH antibody (Santa Cruz, sc-48167): goat polyclonal

希釈倍率 1:250

anti- α -Tubulin antibody (Cell Signaling, #3873): mouse monoclonal

希釈倍率 1:1000

泳動 Buffer 組成

25 mM Tris (ナカライテスク)

192 mM Glycine (関東化学)

0.1% SDS (ナカライテスク)

Blotting Buffer 組成

25 mM Tris (ナカライテスク)

192 mM Glycine (関東化学)

0.1% SDS (ナカライテスク)

15% (v/v) メタノール (関東化学)

TBS-T (pH7.4) 組成

25 mM Tris (ナカライテスク)

135 mM NaCl (関東化学)

2.5 mM KCl (関東化学)

0.1% (v/v) Tween20 (関東化学)

統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析は一元配置の場合は Dunnett 法を用いて行った。二元配置の場合は二元配置分散分析後、Tukey 法を用いて行った。

結果

体重および摂食量

体重推移は、すべての群において差は認められなかった (Fig. 2-2-2-1A)。摂食量も、飼育期間中および坐骨神経切除前後のどの時期においても全ての群間に差は認められなかった (Fig. 2-2-2-1B, C, D)。

血漿インスリンおよびアルブミン値

インスリンおよびアルブミン値は全ての群において差は認められなかった (Fig. 2-2-2-2A, B)。

筋肉量および筋湿重量

Fig. 2-2-2-3 は X 線 CT スキャンを用いて測定した坐骨神経切除 3 日後および 7 日後の筋肉量を示している。3 日目において神経切除による筋肉量の減少は認められず、フラボノイド摂取による影響も認められなかった (Fig. 2-2-2-3A)。7 日目の筋肉量は神経切除により減少が認められ (Fig. 2-2-2-3C)、Sham 肢に対して約 20%の減少が認められた (Fig. 2-2-2-3D)。しかし、フラボノイド摂

取による影響は認められなかった。

Fig. 2-2-2-4 は坐骨神経切除 10 日目の骨格筋重量を示している。すべての筋肉（腓腹筋、ヒラメ筋および前脛骨筋）において神経切除による筋重量の減少が認められた（Fig. 2-2-2-4A, C, E）。ヒラメ筋では神経切除肢重量が GEN 群および QUE 群で CON 群に比べ、増加する傾向にあり、Sham 肢に対する神経切除肢の重量比においては、CON 群に比べ有意に増加した（Fig. 2-2-2-4C, D）。腓腹筋および前脛骨筋においてはフラボノイド摂取の筋重量比に対する影響は認められなかった（Fig. 2-2-2-4B, F）。

ヒラメ筋における *Atrogin1* および *Murf1* mRNA 発現量

Atrogin1 発現量は神経切除により増加したが、GEN 群および QUE 群において、その発現の増加は有意に低下した（Fig. 2-2-2-5A）。*Murf1* においても *Atrogin1* 同様に神経切除による発現増加を、GEN 群および QUE 群で有意に減少した（Fig. 2-2-2-5B）。

変動遺伝子数

変動遺伝子の基準は、「GCOS により発現量が増動していると判定され、かつ、少なくとも一つの群で発現が認められていること」とした。神経切除により増加した遺伝子は 3368 個、減少した遺伝子は 2743 個であった（CON-Den vs. CON-Sham）。また、Fig. 2-2-2-6 にフラボノイド摂取による変動遺伝子数を示した。

Atrogin-1 及び *MuRF-1* 上流遺伝子の探索

Atrogin1 および *Murf1* 上流因子で変動している遺伝子の探索を、IPA を用いて行った。神経切除により変動した遺伝子は Fig. 2-2-2-7A に示した。この遺伝子の中で、GEN 群により変動した遺伝子は SKP1/SKP1P2 および、FOXO1、UBE2J1 の 3 つであり、これらは神経切除により発現増加し、ゲニステイン摂取により発現減少した（Fig. 2-2-2-7B）。一方、QUE 群ではこの経路において変動した遺伝子は認められなかった（Fig. 2-2-2-7C）。

標的遺伝子の発現変動による、関与転写因子の予測（ゲニステインの影響）

IPA の Transcription Factor Analysis 機能を用いて、ゲニステイン摂取により標的遺伝子の発現変動または変動遺伝子数が顕著であった転写因子を Table 2-2-2-1 に示した。ゲニステイン摂取により Estrogen receptor の標的遺伝子が数多く変動していた（Fig. 2-2-2-8）。

ヒラメ筋での Akt のリン酸化レベルおよび

Foxo1、ER α 、ER β のタンパク質量に及ぼすゲニステインの影響

ウェスタンブロットにおけるバンドを Fig. 2-2-2-9A に示した。ヒラメ筋における Akt タンパク質量は神経切除により増加し、ゲニステイン摂取による影響は認められなかった (Fig. 2-2-2-9A)。一方、リン酸化 Akt レベルは神経切除の有無、ゲニステイン摂取による影響は認められず、Total Akt に対するリン酸化 Akt の割合は神経切除により減少し、ゲニステイン摂取による作用は認められなかった (Fig. 2-2-2-9B)。Foxo1 タンパク質量は神経切除により約 3 倍に増加し、ゲニステインの摂取はその増加を有意に抑制した (Fig. 2-2-2-9C)。ER α タンパク質量は神経切除により増加し (Fig. 2-2-2-9D)、ER β タンパク質量は神経切除により減少した (Fig. 2-2-2-9E)。しかし、ゲニステイン摂取は ER α および ER β タンパク質量に影響しなかった。

ヒラメ筋における Akt のリン酸化レベルおよび IRS-1 タンパク質量

ウェスタンブロットのバンドを Fig. 2-2-2-10A に示した。各バンドの濃さを解析した結果、Total Akt に対するリン酸化 Akt の割合は神経切除により減少し、CON 群神経切除肢に比べ QUE 群神経切除肢では有意に増加した (Fig. 2-2-2-10B)。IRS-1 タンパク質量は神経切除により有意に減少した (Fig. 2-2-2-10C)。ケルセチン摂取による差は認められなかった。

Akt リン酸化制御遺伝子の探索 (ケルセチン)

IPA を用いて、ケルセチンにより発現変動し、なおかつ Akt 活性を制御することが知られている遺伝子を Fig. 2-2-2-11 に示した。発現増加により Akt の活性化を引き起こす遺伝子として、*Adipoq*、*Axl*、*Il33*、*Fn1*、*Lox*、発現減少により Akt の活性化を引き起こす遺伝子として、*Nqo2*、*Apln*、*Ikbkb* が挙げられた。最も発現変動の大きかったものは *Ikbkb* であった。

血清 TBARS 濃度 (ケルセチン)

Fig. 2-2-2-12 に血清 TBARS 濃度を示した。TBARS 濃度はケルセチン摂取により約 10% 低下した ($p < 0.05$)。

第三節 考察

第 2 章では坐骨神経切除による廃用性筋萎縮モデルラットを用いて、筋萎縮誘導初期および後期におけるフラボノイド摂取の影響を検討した。フラボノイド摂取は萎縮誘導 10 日目で改善作用が認められたが、誘導初期の 4 日目では認められなかった。また、その作用はヒラメ筋において限定的であった。骨格筋は主に遅筋および速筋といった 2 つ筋繊維タイプにより構成されている。ヒラメ筋は赤筋タイプの割合が高く、腓腹筋は遅筋と速筋タイプの割合が同程度、

前脛骨筋は速筋タイプの割合が高いことがわかっている。坐骨神経切除や後肢懸垂といった筋萎縮誘導モデルを用いた研究において、速筋よりも遅筋の方が急速な萎縮を示すことが報告されており、筋繊維タイプの違いにより応答が異なると考えられている(Dehority *et al.*, 1999)。Ogawa *et al.*は、坐骨神経切除モデルマウスへの β カロテン投与の効果は、筋萎縮誘導初期(7日目では効果は消失)のヒラメ筋において認められることを報告している(Ogawa *et al.*, 2013)。そこで、坐骨神経切除4日目および10日目におけるフラボノイドの作用を3種の骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋)を用いて検討した。ゲニステインおよびケルセチンの摂取は神経切除10日目におけるヒラメ筋重量の低下を抑制した。一方、神経切除4日目の骨格筋および10日目の腓腹筋、前脛骨筋重量に対しては差が認められず、フラボノイドの筋萎縮抑制作用はヒラメ筋に限定的であり、その作用は萎縮誘導後期に現れることが明らかとなった。ヒラメ筋は上述の通り、他の筋肉に比べ急速に萎縮が誘導されることに加え、毛細血管密度が高いことが分かっている(Brown *et al.*, 1976)。したがって、他の筋肉(腓腹筋および前脛骨筋)に比べヒラメ筋ではフラボノイドの取り込み量が多いのかもしれない。また、ヒラメ筋において、神経切除による *Atrogin1* および *Murf1* の発現増加もゲニステインおよびケルセチンは抑制した。*Atrogin1* および *Murf1* は筋萎縮により発現が誘導されるユビキチンリガーゼであり、これら遺伝子のノックアウトマウスは坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示すことが報告されている(Bodine *et al.*, 2001)。したがって、ケルセチンおよびゲニステインの筋萎縮抑制作用の一つとしてこれら遺伝子の発現抑制が考えられた。*Atrogin1* および *Murf1* のノックアウトマウスの筋萎縮に対する抵抗性は神経切除7日目以降に起こることが分かっており、筋萎縮誘導初期の段階では野生型マウスと同様に萎縮を引き起こすことが明らかとなっている(Bodine *et al.*, 2001)。この結果はフラボノイド摂取による影響が誘導10日目で見られていることを支持しており、誘導初期でゲニステインおよびケルセチンの作用が認められなかった原因の一つであると考えられた。

ゲニステインの作用

ゲニステインはエストロゲン受容体に結合し、その転写活性を制御することはよく知られているが(Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; McCarty, 2006)、骨格筋におけるその作用は報告されていない。本研究において、DNA マイクロアレイ解析により、ゲニステイン摂取は萎縮筋において多くのエストロゲン受容体標的遺伝子の発現を変動させることが明らかとなり、骨格筋においてもエストロゲン受容体に作用していることが示唆された。一方、このようなゲニステインによるエストロゲン受容体標的遺伝子の変動は Sham 肢では認められな

かった (data not shown)。したがって、ゲニステインは Sham 肢よりも萎縮筋でエストロゲン受容体に作用しやすいことが考えられた。そこで、各エストロゲン受容体アイソフォームのタンパク質量を確認したところ、萎縮筋で α アイソフォームは増加し、 β アイソフォームは減少した。つまり、神経切除によりゲニステインのエストロゲン受容体アイソフォームへのアフィニティーが変動したことにより、萎縮筋にのみ標的遺伝子の変動がみられた可能性が考えられた。

変動したエストロゲン受容体標的遺伝子の一つに *Igf1* があった。Nguyen *et al.*はゲニステインやエストラジオールの投与が心筋での *Igf1* 遺伝子の発現を増加させることを報告しており (Nguyen *et al.*, 2012)、本研究の結果を支持している。IGF-1 は筋タンパク質合成促進および分解抑制作用を示すホルモンであり、筋萎縮抑制作用を有することが分かっている (Barton *et al.*, 2002)。この筋タンパク質合成および分解抑制作用は PI3K-Akt 経路の活性化を介していることが報告されている (Birkenkamp and Coffey, 2003; Glass, 2003)。したがって、ゲニステインの摂取が *Igf1* 遺伝子増加を介して、PI3K-Akt 経路の活性化を介し、*Atrogin1* および *Murf1* の発現を抑制することが予想されたが、Akt のリン酸化レベルにはゲニステインの作用は認められなかった。したがって、ゲニステイン摂取はエストロゲン受容体を介して多くの遺伝子発現を制御していることが示唆されたが、*Atrogin1* および *Murf1* の発現抑制作用には *Igf1* の発現増加以外の作用が考えられた。

次にこれら、*Atrogin1* および *Murf1* の発現変動の原因を探るため、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。IPA を用いて、除神経により変動した *Atrogin1* および *Murf1* の上流および結合因子をリストアップした。これらの中で、ゲニステイン摂取により変動した遺伝子は *Skp1* および *Foxo1*、*Ube2/1* であった。*Skp1* および *Ube2/1* は *Atrogin1* と *Murf1* にそれぞれ結合することが報告されているが (Bosanac *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2001; Tintignac *et al.*, 2005)、それらの発現を変動させるといった報告はされていない。一方、*Foxo1* は *Atrogin1* および *Murf1* の転写を促進することが報告されている (Shimizu *et al.*, 2011)。また、骨格筋特異的 *Foxo1* 過剰発現マウスは筋萎縮を発症することが明らかとなっており (Kamei *et al.*, 2004)、本実験において *Foxo1* mRNA およびタンパク質が減少したことから、*Foxo1* の減少を介した *Atrogin1* および *Murf1* の発現抑制による筋萎縮抑制作用が考えられた。

興味深いことに、*Foxo1* はリガンド依存的にエストロゲン受容体 α と結合することと、互いの転写活性を制御することが報告されている (Essagher *et al.*, 2009; Schuur *et al.*, 2001)。*Foxo1* は細胞質から核内へ移行することにより、その転写活性を増加させることがわかっている。また、この標的遺伝子の中に *Foxo1* も存在し、*Foxo1* 自身によりその遺伝子発現の制御を行うことが報告さ

れている(Essaghir *et al.*, 2009)。したがって、ゲニステイン摂取による *Foxo1* の発現変動にエストロゲン受容体が関与している可能性が考えられた。

ケルセチンの作用

ケルセチン摂取は神経切除によるヒラメ筋の萎縮を抑制し、*Atrogin1* および *Murf1* の発現上昇を抑制した。また、ケルセチンはこれらの制御因子である Akt のリン酸化を萎縮筋にて増加させた。リン酸化 Akt は Foxo をリン酸化することにより、Foxo の核内移行を阻害し、その転写活性を抑制することが明らかとなっている(Birkenkamp and Coffey, 2003)。この Akt-Foxo 経路は *Atrogin1* および *Murf1* の発現制御にも関与することが明らかとなっており(Birkenkamp and Coffey, 2003)、ケルセチンによる *Atrogin1* および *Murf1* の発現抑制は Akt のリン酸化を介していることが示唆された。Akt 経路の活性化はインスリンまたは IGF-1 といった種々のホルモンにより活性化されるが、血清インスリン値や骨格筋 *Igf1* の遺伝子発現に変動が認められなかったことから、これらホルモンの分泌を介した作用ではないと思われる。また、後肢懸垂等による廃用性筋萎縮には Cbl-b (ユビキチンリガーゼ) や C1-Ten (チロシンリン酸化酵素) の発現誘導を介した IRS-1 のタンパク質分解が関与していることが報告されているが(Koh *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2009)、ケルセチン摂取は神経切除による IRS-1 のタンパク質量の減少に影響しなかった。したがって、ケルセチンによる Akt のリン酸化制御にはインスリンや IGF-1 といったホルモンや IRS-1 のタンパク質量に影響していないことが明らかとなった。

次に IPA を用いて、Akt のリン酸化を制御することが報告されている因子で、ケルセチンにより変動している遺伝子の探索を行った。Akt の活性化を発現増加により引き起こす遺伝子として、*Adipoq*、*Axl*、*Il33*、*Fn1*、*Lox*、発現減少により引き起こす遺伝子として、*Nqo2*、*Apln*、*Ikbkb* が挙げられた。したがって、これら遺伝子の変動により Akt のリン酸化が制御されたことが考えられた。しかし、これら遺伝子の Akt リン酸化に関する報告は様々な細胞および組織、条件で行われたものであるため、今後これらの発現が萎縮筋下においても Akt のリン酸化を制御するか、より詳細に解析する必要がある。一方、上記に含まれる IKKB の活性化は NF- κ B 活性化を介して *Murf1* 転写活性を増加し、筋萎縮を誘導することが報告されている(Cai *et al.*, 2004)。本実験において、ケルセチン摂取により *Ikbkb* の発現は抑制された。したがって、ケルセチンの *Murf1* 発現抑制に *Ikbkb* が関与していることが考えられた。また、この IKKB による NF- κ B 活性化を介した筋萎縮誘導作用には活性酸素種 (ROS) が関与していると考えられており、ROS の増加は NF- κ B を活性化させることがわかっている。坐骨神経切除を行った萎縮筋では ROS の産生と消去の不均衡が引き起こること

も報告されており、ROS は筋萎縮の誘導、増悪化に関与していると考えられている(Muller *et al.*, 2007)。したがって、抗酸化物質の投与は ROS の消去を介して、筋肉量および筋機能を改善することが期待されている(Lawler *et al.*, 2003; Servais *et al.*, 2007)。抗酸化物質である *N*-アセチル-L-システイン (NAC) の筋肉投与は後肢懸垂による筋萎縮および TBARS の増加を抑制することも報告されている(Mukai *et al.*, 2010)。ケルセチンはフラボノイドの中でも強力な抗酸化作用を有しており、本研究においてもケルセチン摂取による血漿 TBARS の低下が示され、ケルセチンの抗酸化作用が認められた。したがって、ケルセチン摂取は抗酸化作用を介して NF- κ B 活性抑制により筋萎縮を抑制することが考えられた。しかし、本研究では血漿における TBARS の測定しか行っていないため、今後骨格筋における TBARS を測定し、萎縮筋での酸化ストレスに対するケルセチンの作用を検討する必要がある。また、Brocca *et al.*は骨格筋におけるタンパク質の酸化および脂質過酸化は腓腹筋よりもヒラメ筋で誘導されることを報告しており(Brocca *et al.*, 2010)、ケルセチンによる筋萎縮抑制作用がヒラメ筋に限定されたことの原因のひとつとして考えられた。

以上の結果をまとめると、ゲニステインおよびケルセチンの摂取は坐骨神経切除によるヒラメ筋の萎縮を抑制し、筋萎縮誘導の鍵因子である *Atrogin1* および *Murf1* の発現抑制を示した。これら遺伝子の発現抑制には、ゲニステインではエストロゲン受容体の制御や *Foxo1* の発現変動が考えられ、ケルセチンでは抗酸化作用を介した Akt リン酸化維持作用が考えられた。筋萎縮に対するエストロゲン受容体の役割やケルセチンによる Akt のリン酸化制御機構については、今後検討する必要がある。

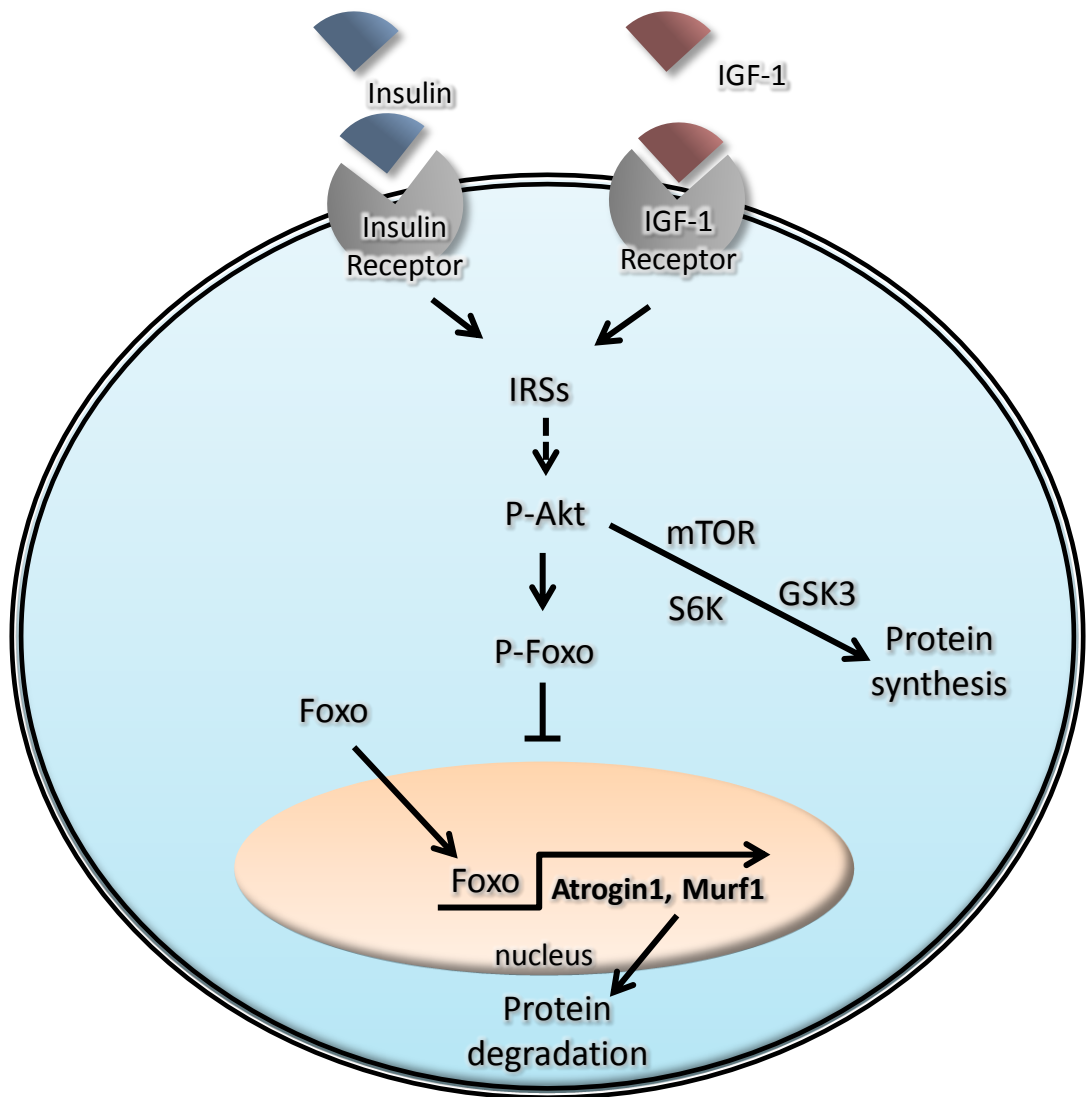


Fig. 2-0-1 Akt-Foxo pathwayによるタンパク質合成および分解経路

インスリンおよびIGF-1等の成長因子によりAktがリン酸化され、さらにFoxoをリン酸化する。リン酸化されたFoxoは核内への移行が阻害される。一方、この経路が阻害されると、Foxoの核内移行が起こり、Atrogin1およびMurf1の発現誘導が起こり、タンパク質分解が高まる。リン酸化AktはmTOR、GSK3、S6Kを活性化させ、タンパク合成を高める。

IRSs: Insulin receptor substrate

Foxo: Forkhead box protein O

mTOR: mammalian target of rapamycin

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

S6K: Ribosomal protein S6 kinase

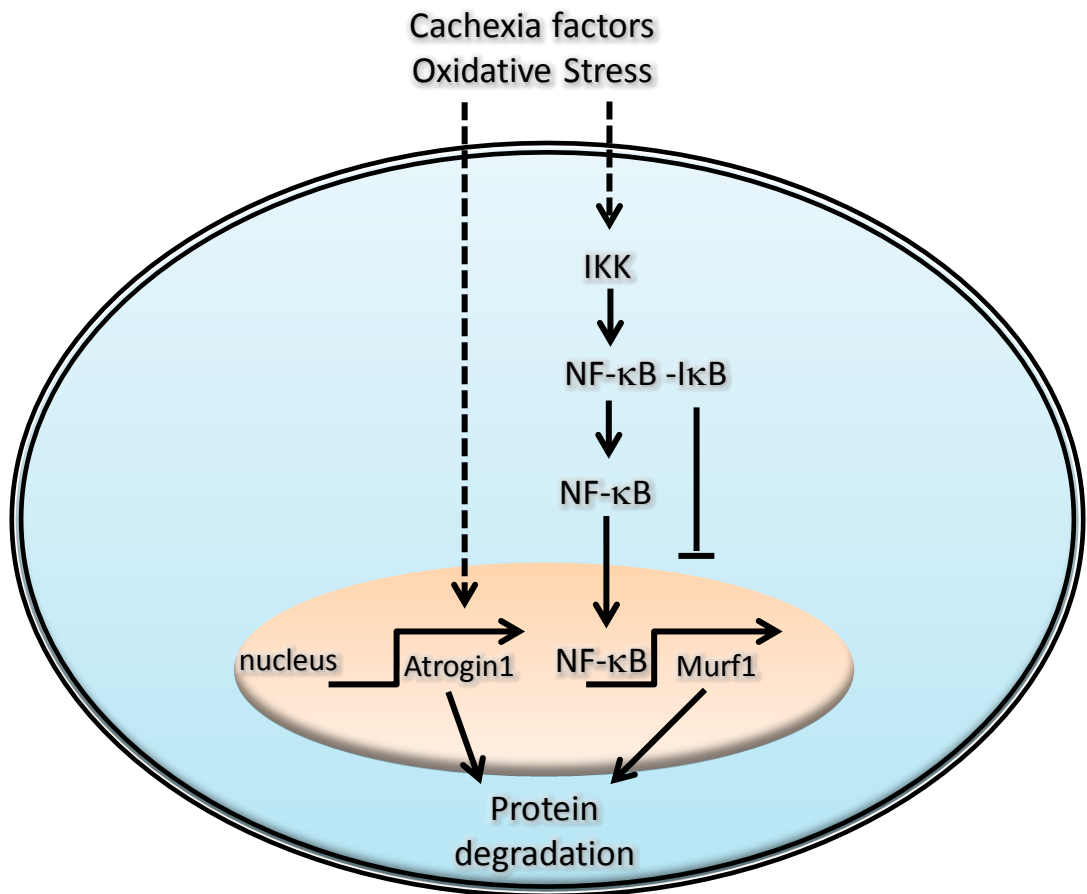


Fig. 2-0-2 IKK – NF-κB pathwayによるタンパク質分解経路

悪液質因子や酸化ストレスはIKKを活性化させ、NF-κBとIκB複合体を解離させ、NF-κBの核内移行を促進する。これによりMurf1の転写活性が増加する。また、悪液質因子や酸化ストレスは、間接的にAtrogin1の転写活性を増加させる。これらAtrogin1やMurf1の発現上昇によりタンパク質分解が亢進し、筋萎縮が誘導される。

NF-κB: nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells

IκB: NF-κB inhibitor β

IKK: IκB kinase

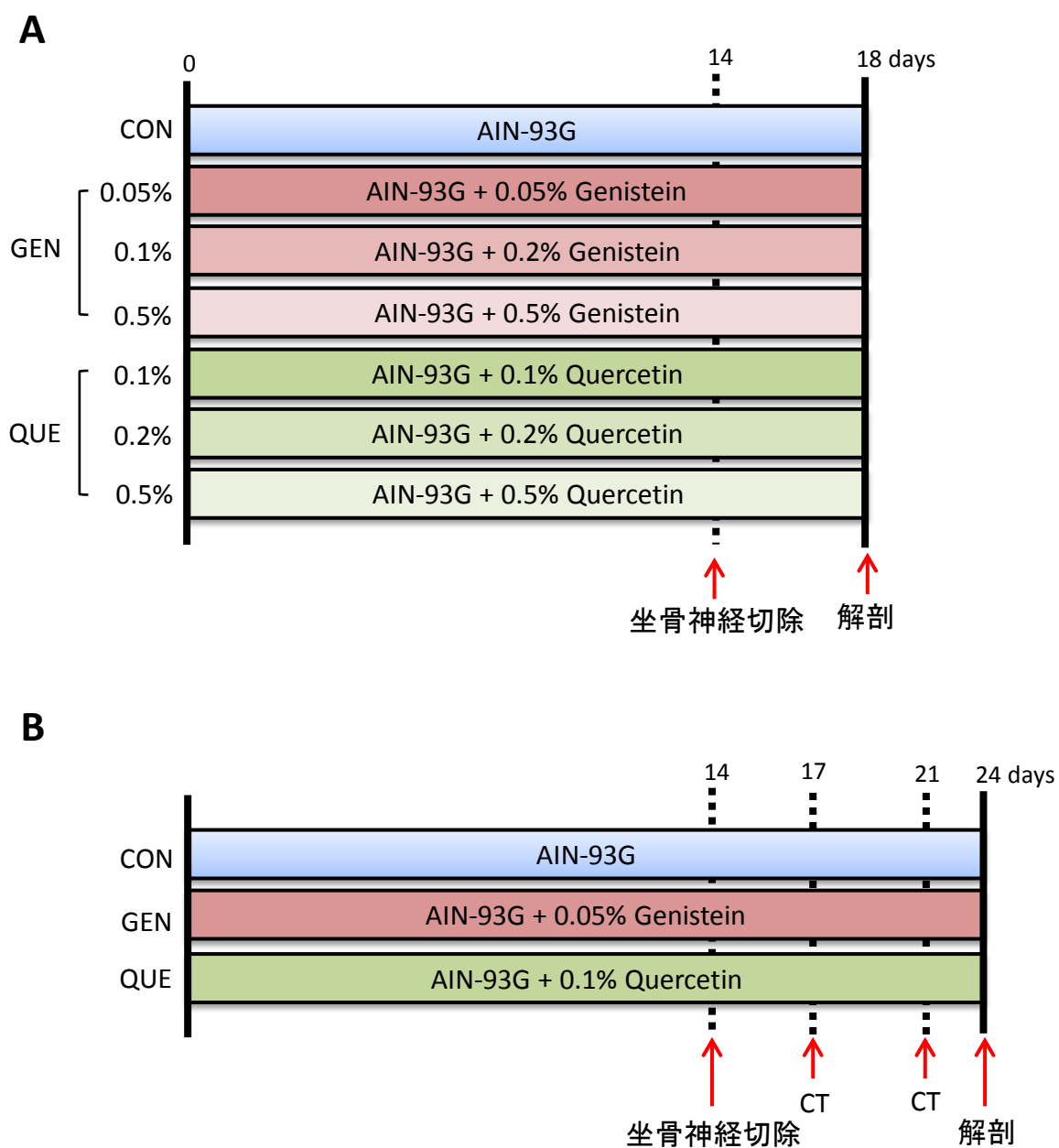


Fig. 2-1-1-1 飼育条件

A: 第一節での飼育条件

B: 第二節での飼育条件

Table 2-1-1 飼料組成

Ingredient	CON	0.05G	0.2G	0.5G	0.1Q	0.2Q	0.5Q
Casein	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn Starch	36.4186	36.3686	36.2186	35.9186	36.3186	36.2186	35.9186
α -Corn Starch	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Corn Oil	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-93G Mineral MIX	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93G Vitamine MIX	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
tert - Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Genistein		0.05	0.2	0.5			
Quercetin					0.1	0.2	0.5
Total	100	100	100	100	100	100	100

(%)

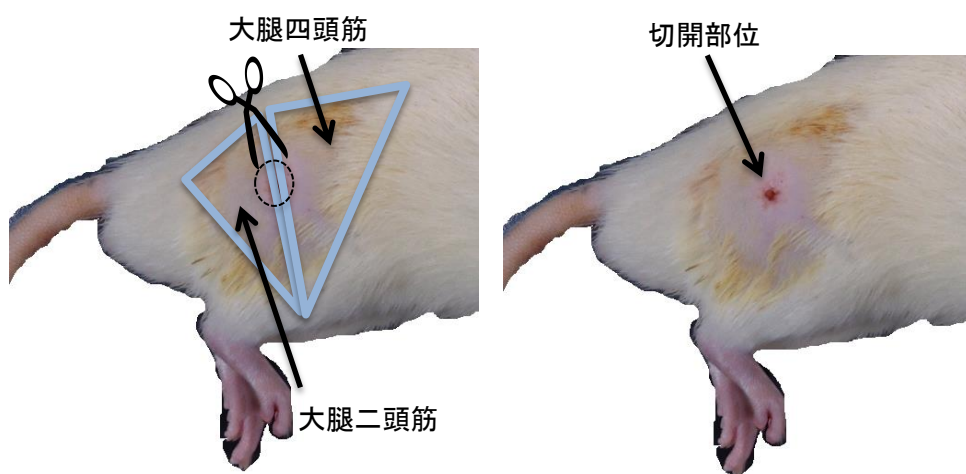


Fig. 2-1-1-2 坐骨神経切除における切開部位

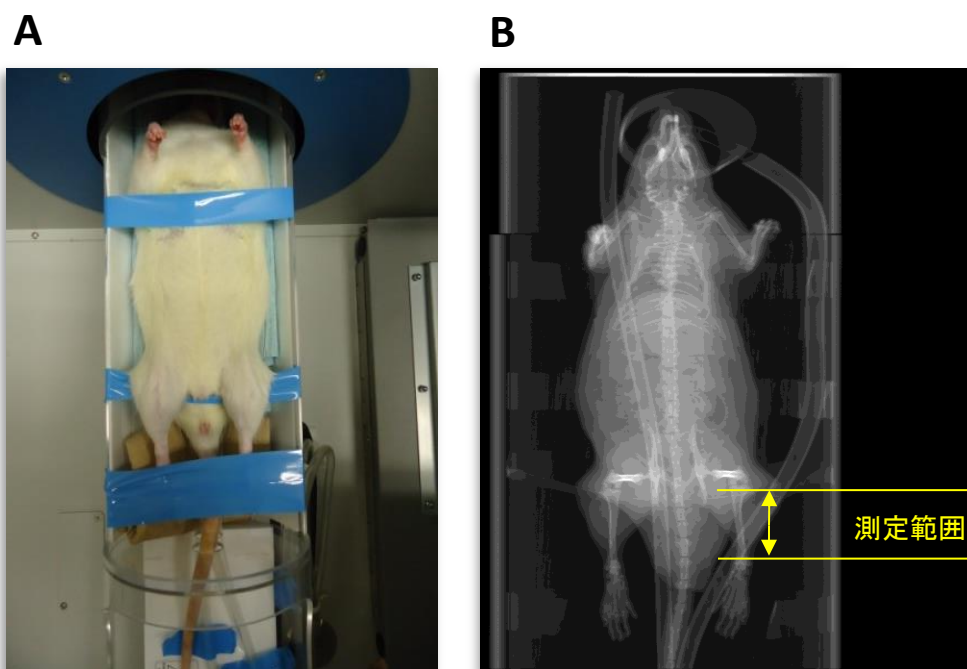


Fig. 2-2-1-1 X線CT撮影時のラットの固定図

A: CT装置へのラット固定写真

B: X線画像

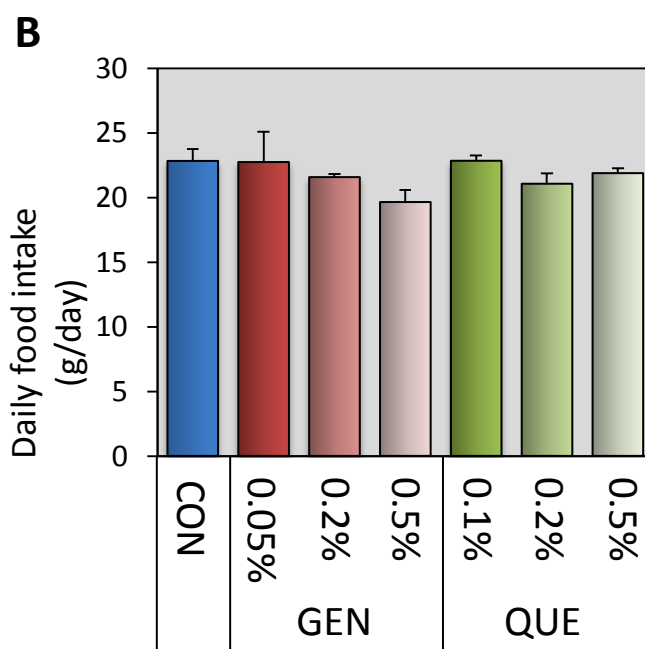
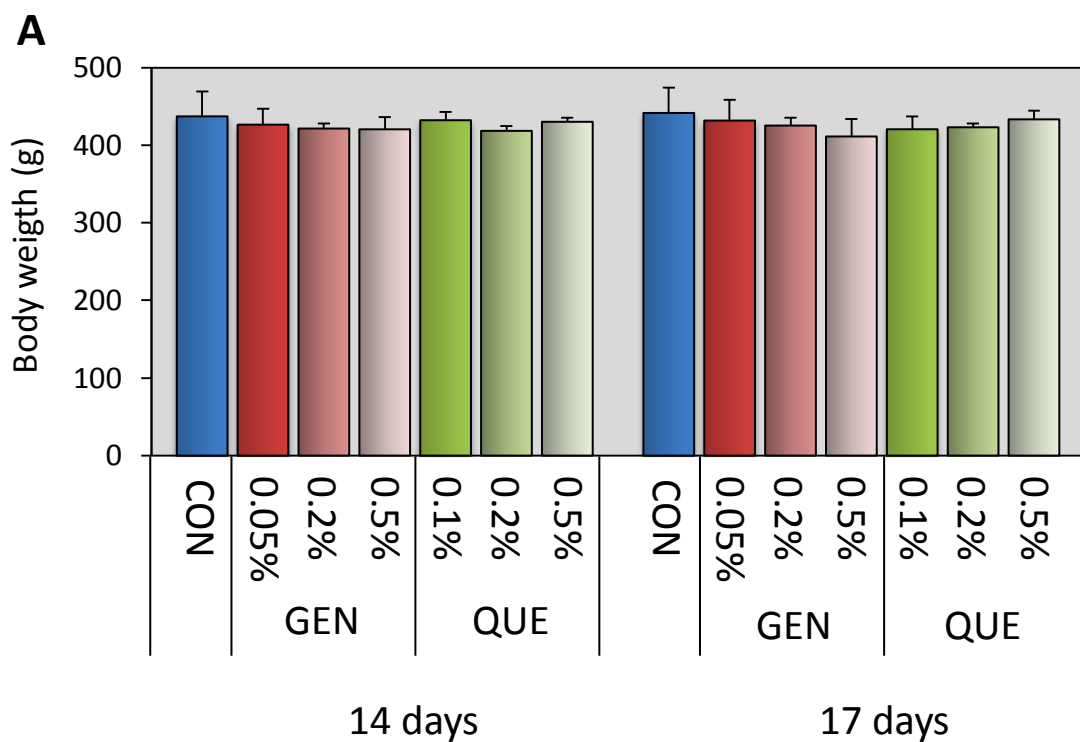


Fig. 2-1-2-1 体重と摂食量

A: 飼育14日目（神経切除前）および17日目（解剖時）の体重

B: 飼育期間中の一日当たりの摂食量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett: vs. CON)

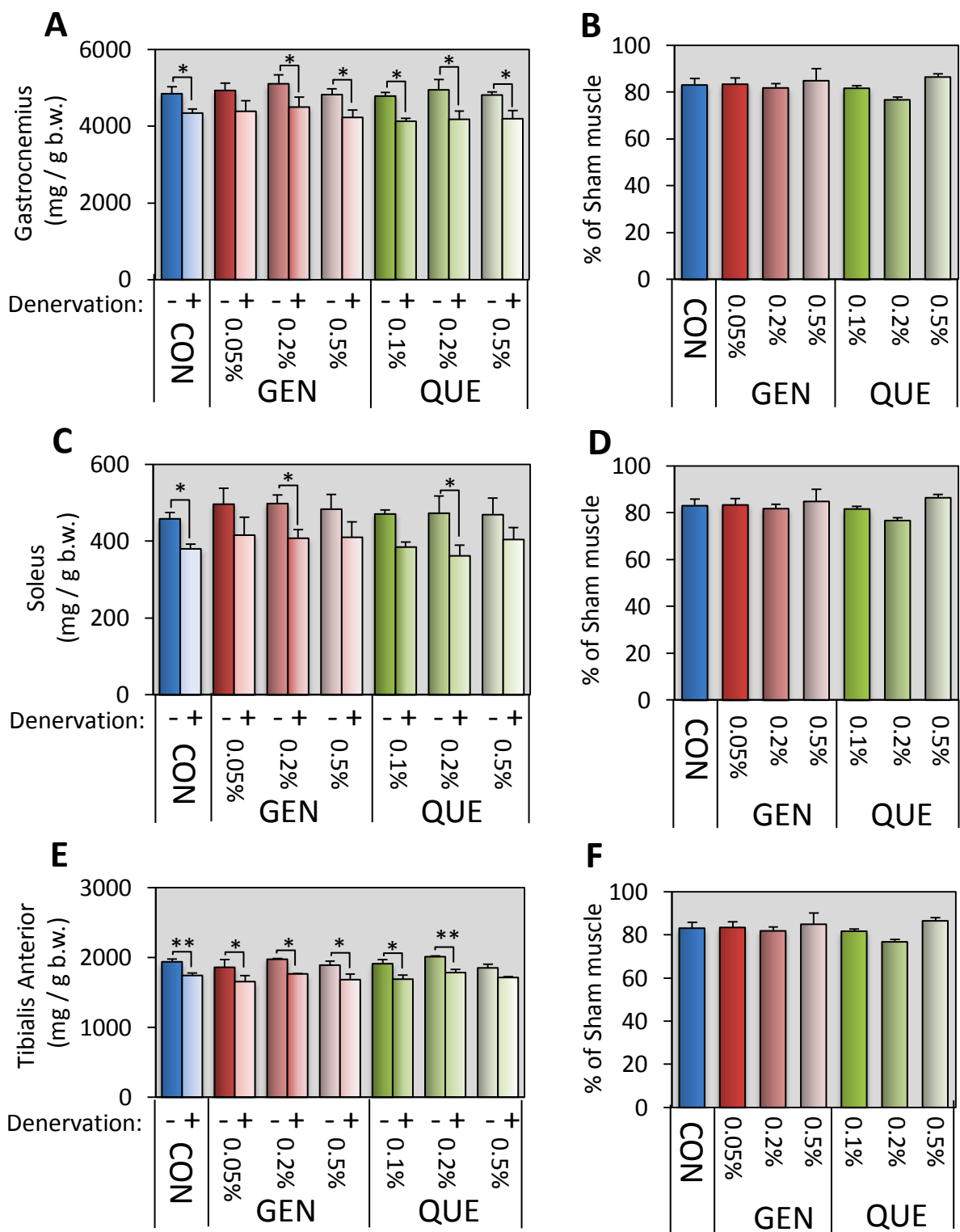


Fig. 2-1-2-2 筋重量およびSham肢に対する筋重量比率

A: 腓腹筋重量

C: ヒラメ筋重量

E: 前脛骨筋重量

B: Sham肢に対する腓腹筋重量比

D: Sham肢に対するヒラメ筋重量比

F: Sham肢に対する前脛骨筋重量比

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=3

A,C,E: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

B,D,F: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett: vs. CON)

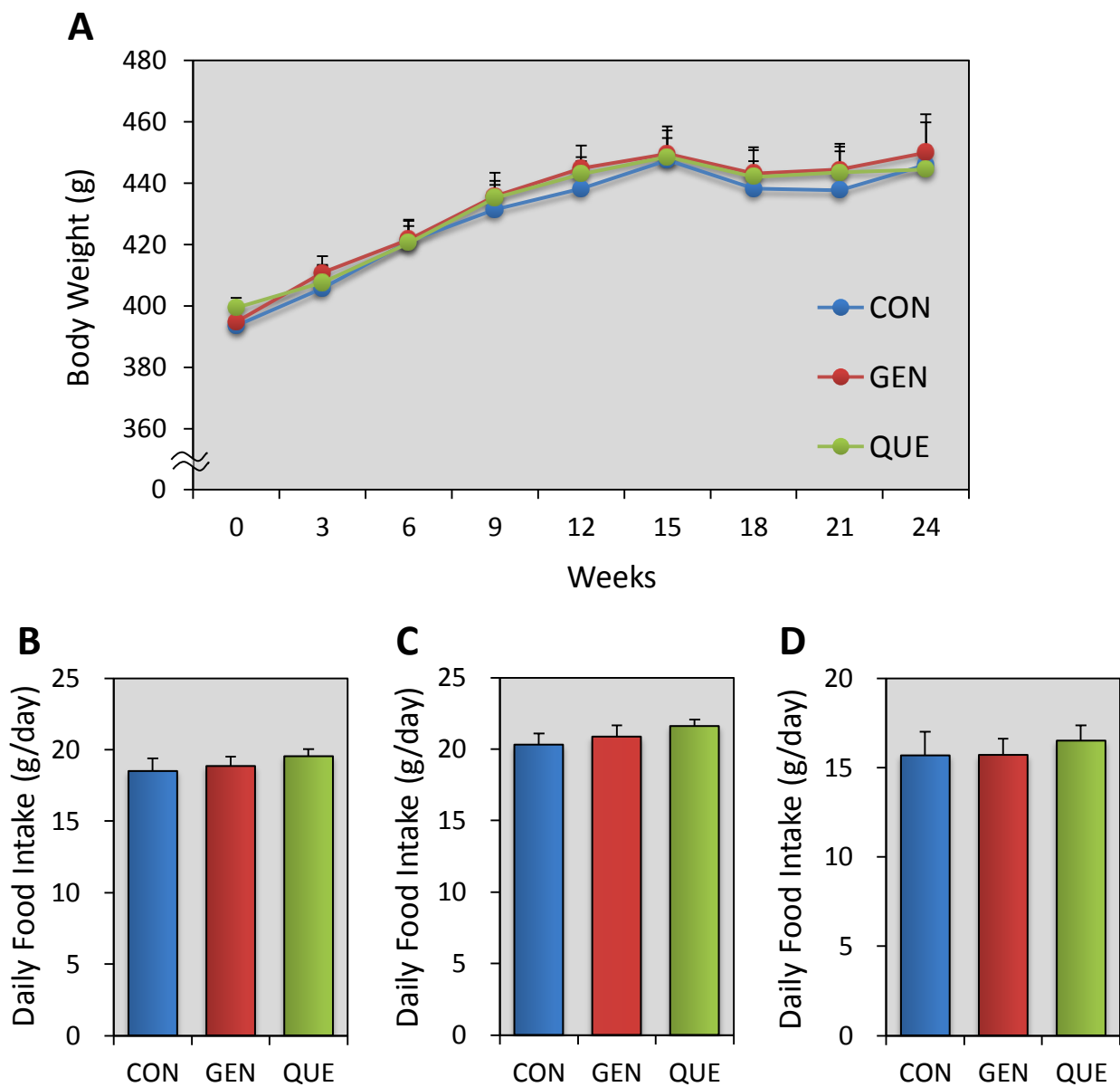


Fig. 2-2-2-1 飼育期間中の体重および摂食量

A: 飼育期間中の体重の推移

B: 飼育期間中の一日当たりの摂食量

C: 飼育14日目までの一日当たりの摂食量(坐骨神経切除前)

D: 飼育14~24日目までの一日当たりの摂食量(坐骨神経切除後)

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=16

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett: vs. CON)

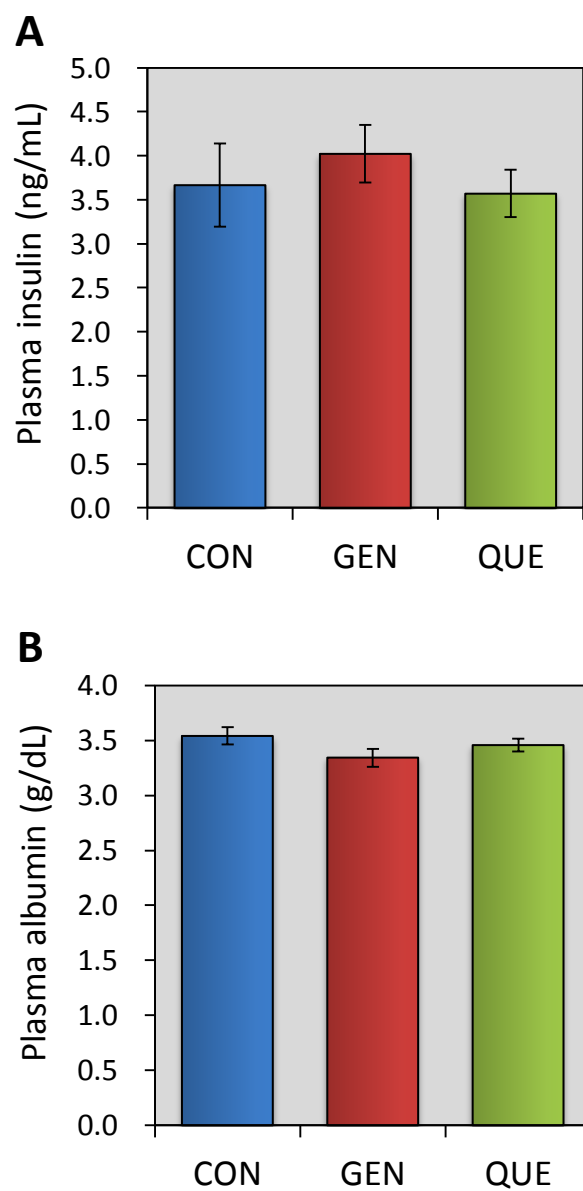


Fig. 2-2-2-2 血漿インスリンおよびアルブミン値

A: インスリン値 B: アルブミン値

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett: vs. CON)

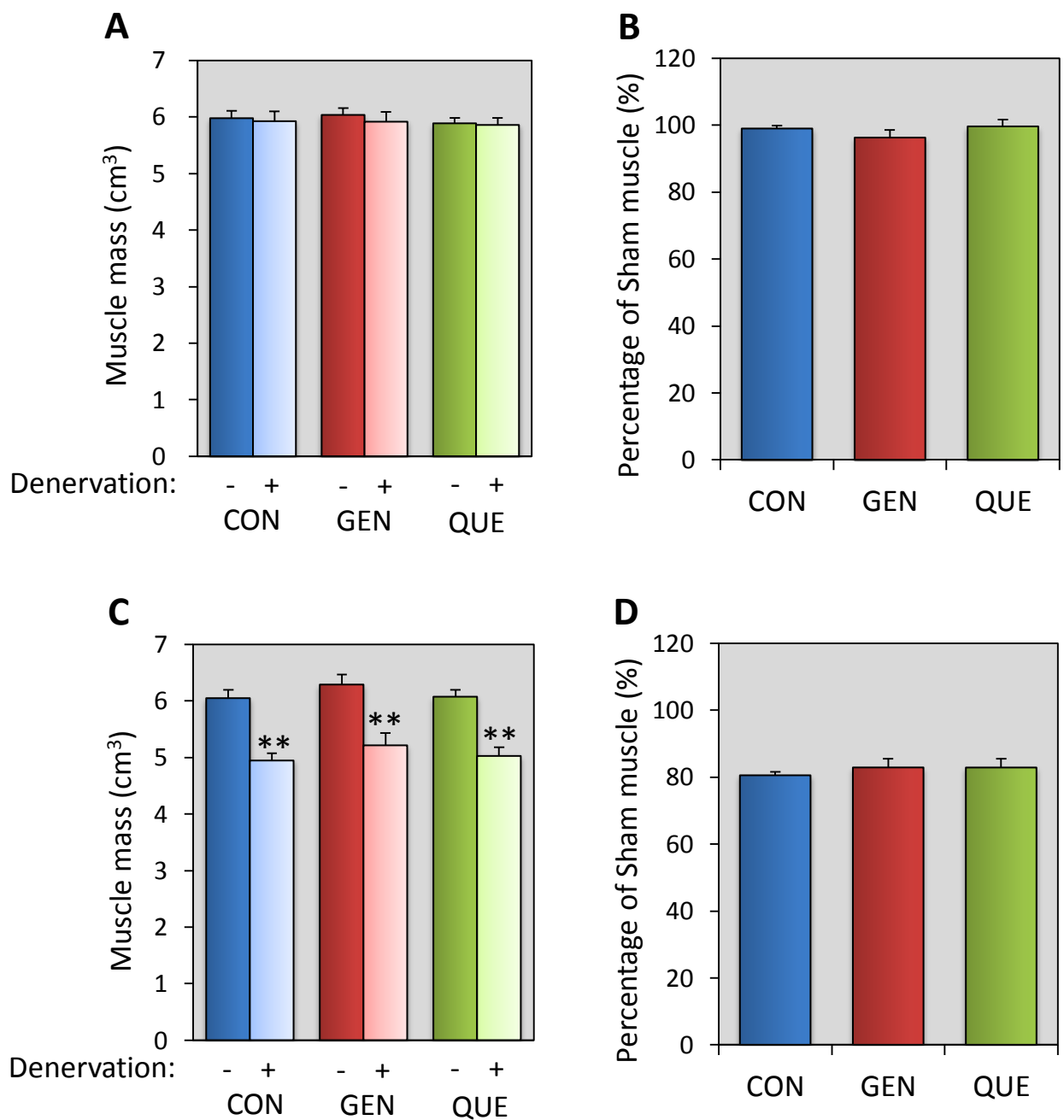


Fig. 2-2-2-3 X線CTスキャンにより測定した筋肉量およびSham肢に対する筋肉量比

A: 坐骨神経切除3日後の筋肉量

B: 3日目の筋肉量比

C: 坐骨神経切除7日後の筋肉量

D: 7日目の筋肉量比

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=8

A,C,E: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

B,D,F: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett: vs. CON)

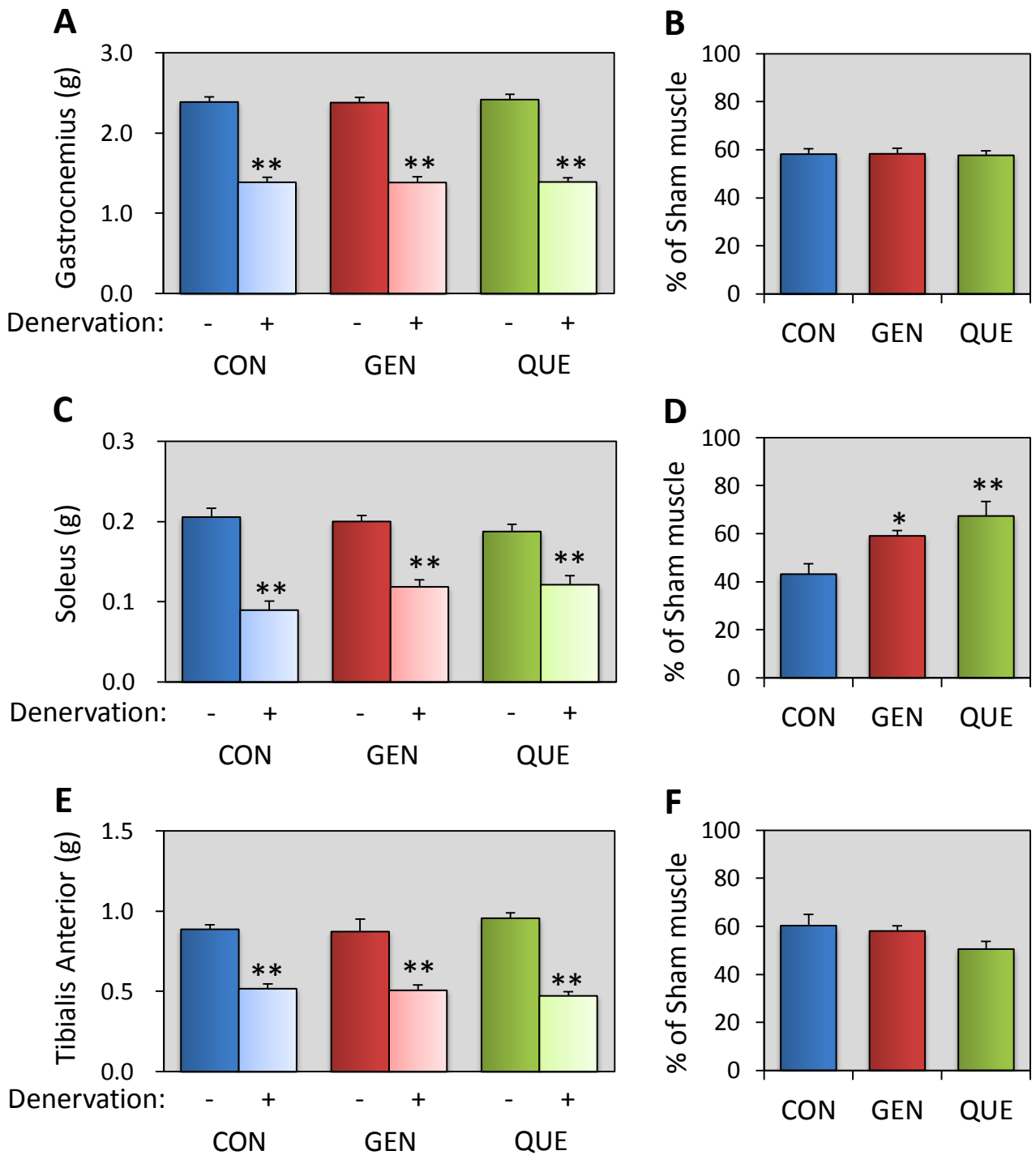


Fig. 2-2-2-4 解剖時の筋重量およびSham肢に対する筋重量比

A: 腓腹筋重量

B: Sham肢に対する腓腹筋重量比

C: ヒラメ筋重量

D: Sham肢に対するヒラメ筋重量比

E: 前脛骨筋重量

F: Sham肢に対する前脛骨筋重量比

グラフの値は平均+S.E.を示す。n=16

A,C,E: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

B,D,F: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett: vs. CON)

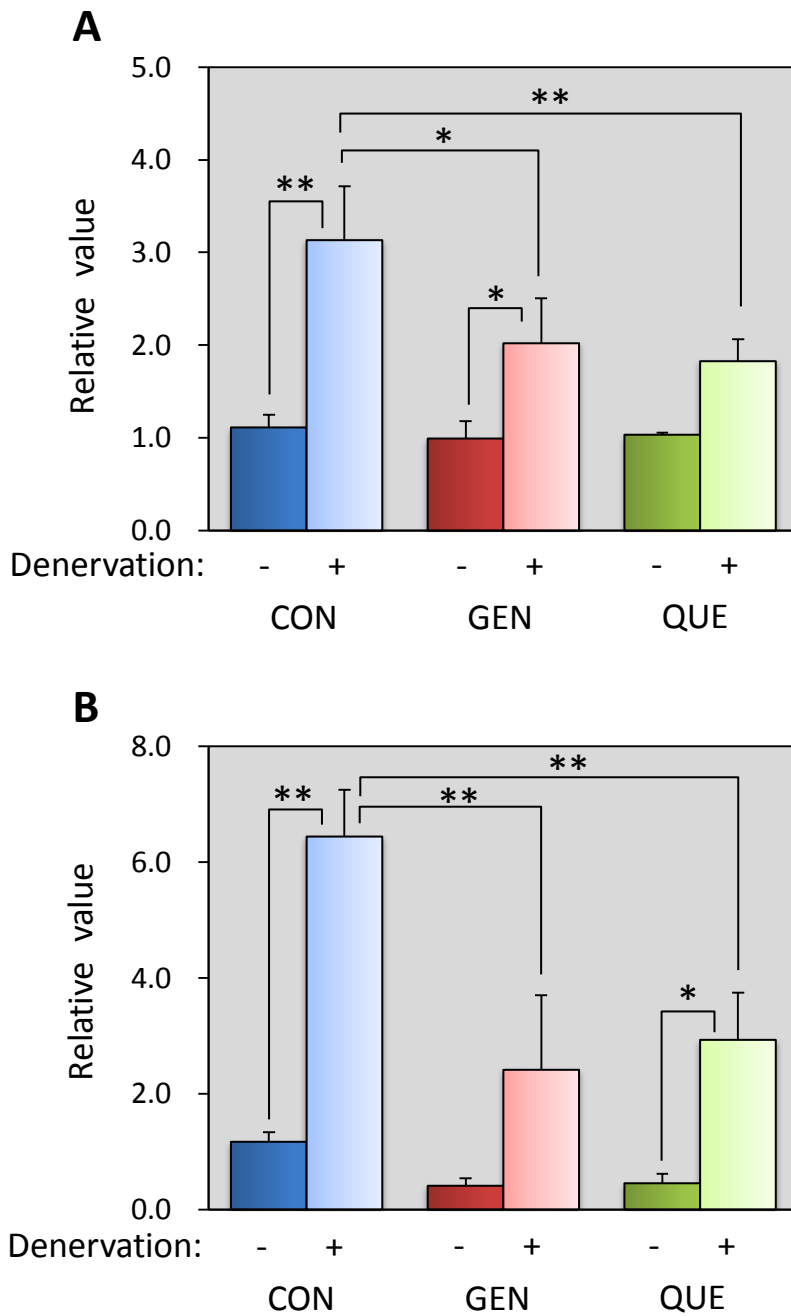


Fig. 2-2-2-5 ヒラメ筋における*Atrogin1* および *Murf1* mRNA発現量

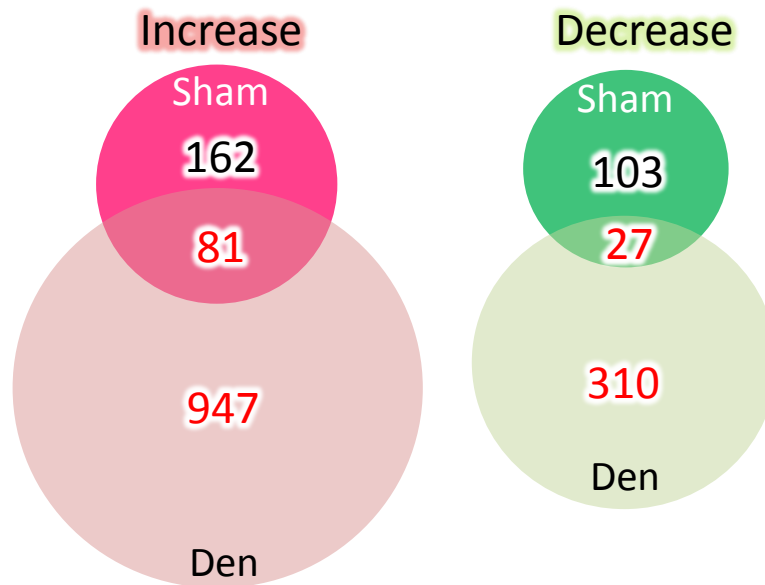
A: *Atrogin1* mRNA発現量

B: *Murf1* mRNA発現量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

A



B

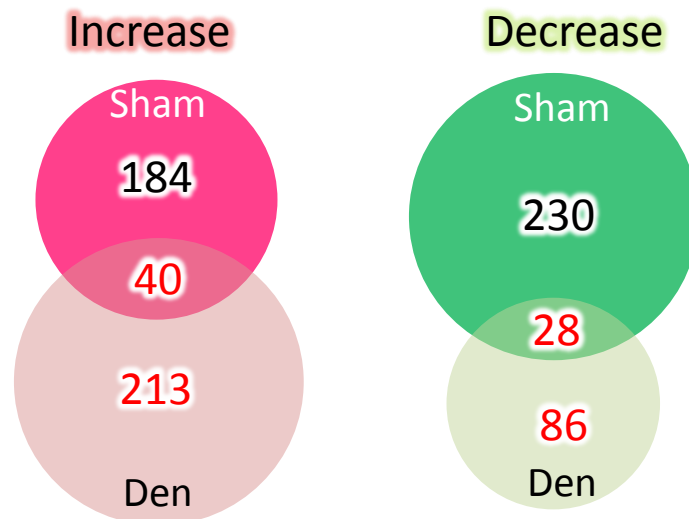


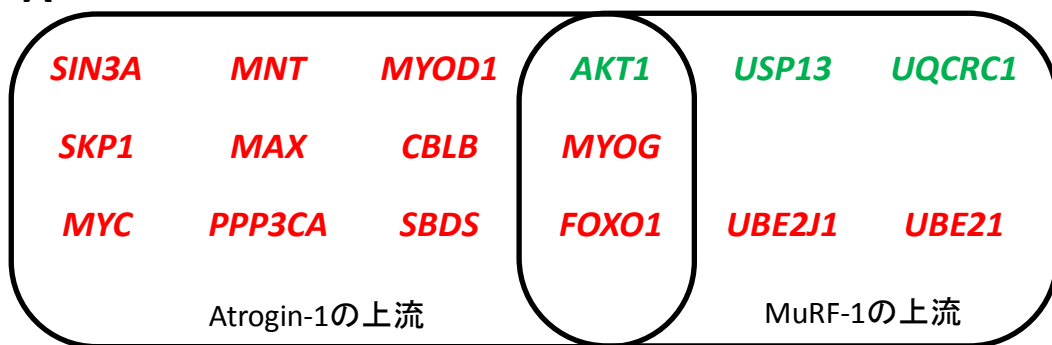
Fig. 2-2-2-6 発現が変動したと判定された遺伝子(プローブセット)数

A: ゲニステイン摂取により変動した遺伝子数

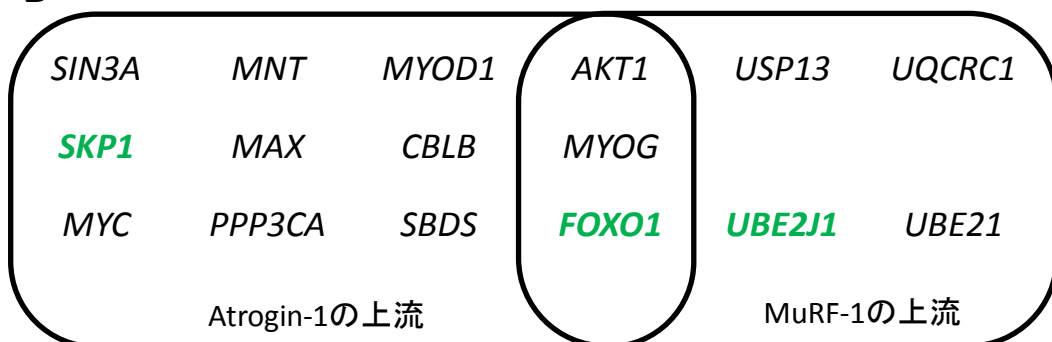
B: ケルセチン摂取により変動した遺伝子数

CON群の各肢(ShamおよびDen)と比較した。神経切除肢(Den)により変動した遺伝子(赤字)をIPAにアップロードした。

A



B



C

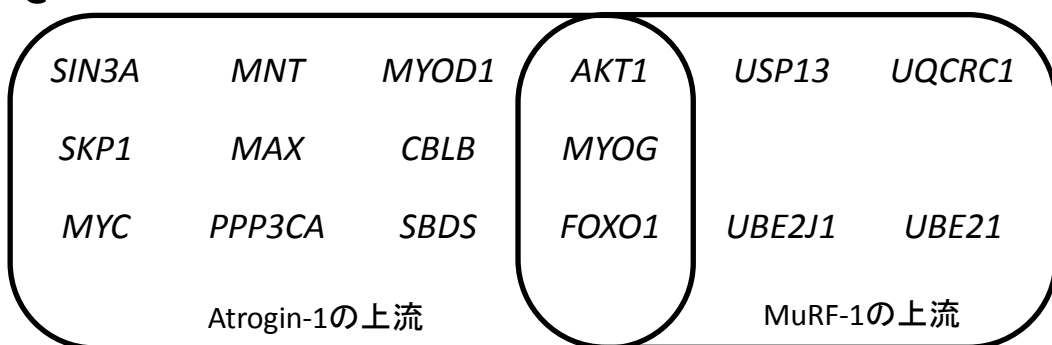


Fig. 2-2-2-7 除神経により変動するAtrogin-1およびMuRF-1上流因子の発現変動

A: 除神経による影響 (Den vs. Sham)

B: ゲニステインによる影響 (GEN-Den vs. CON-Den)

C: ケルセチンによる影響 (QUE-Den vs. CON-Den)

赤は増加、緑は減少を示した遺伝子。

Table 2-2-2-1 ゲニステイン摂取により標的遺伝子の発現変動の大きかった転写因子

Transcription Regulator	Predicted Activation State*	Regulation z-score	P-value of overlap
Estrogen receptor	Inhibited	-2.395	6.37E-08
MYC	Inhibited	-4.164	2.27E-06
SMAD7	Inhibited	-2.076	1.41E-04
SNAI2	Activated	2.512	2.37E-03
MYCN	Inhibited	-4.244	1.05E-02
TP63	Inhibited	-2.712	2.40E-02

* Predicted Activation State:

Regulation z-scoreが2以上でActivated, -2以下でInhibitedと判定される。

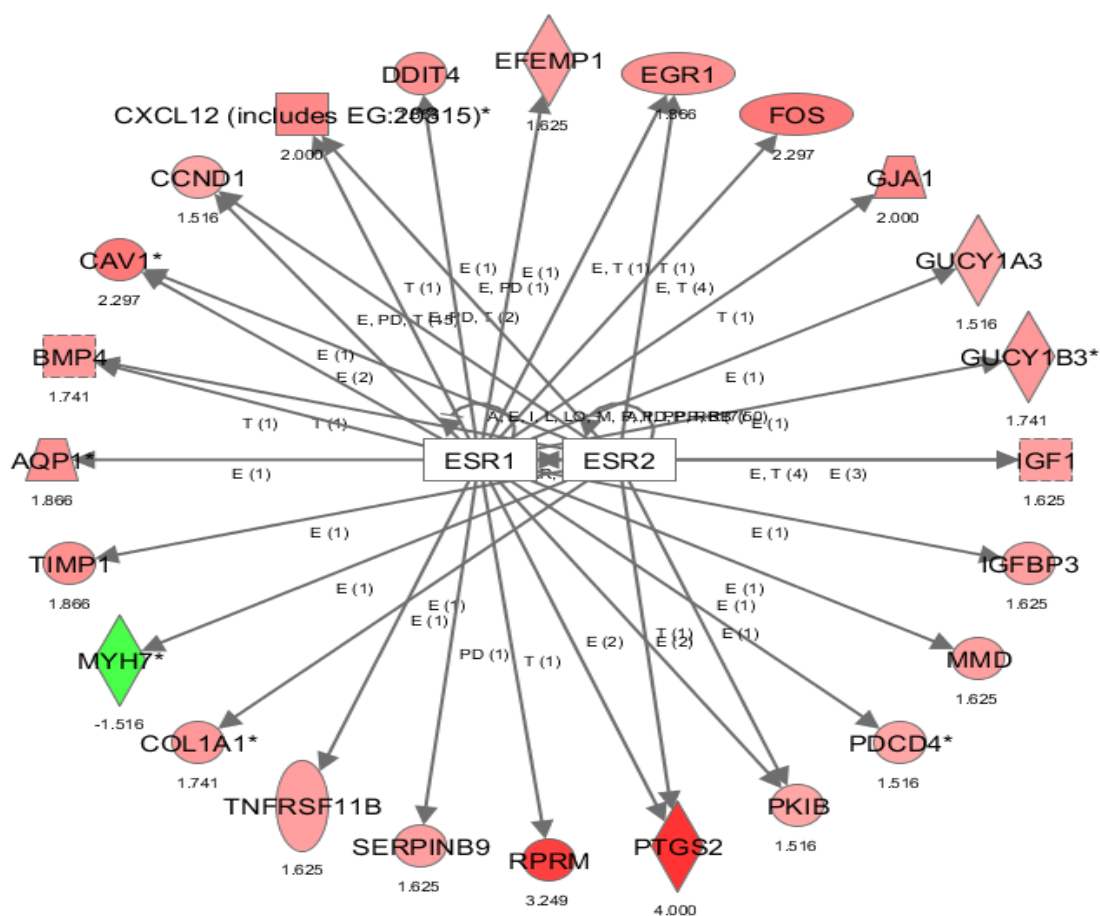


Fig. 2-2-2-8 エストロゲン受容体標的遺伝子の発現変動
赤は増加、緑は減少を示した遺伝子。

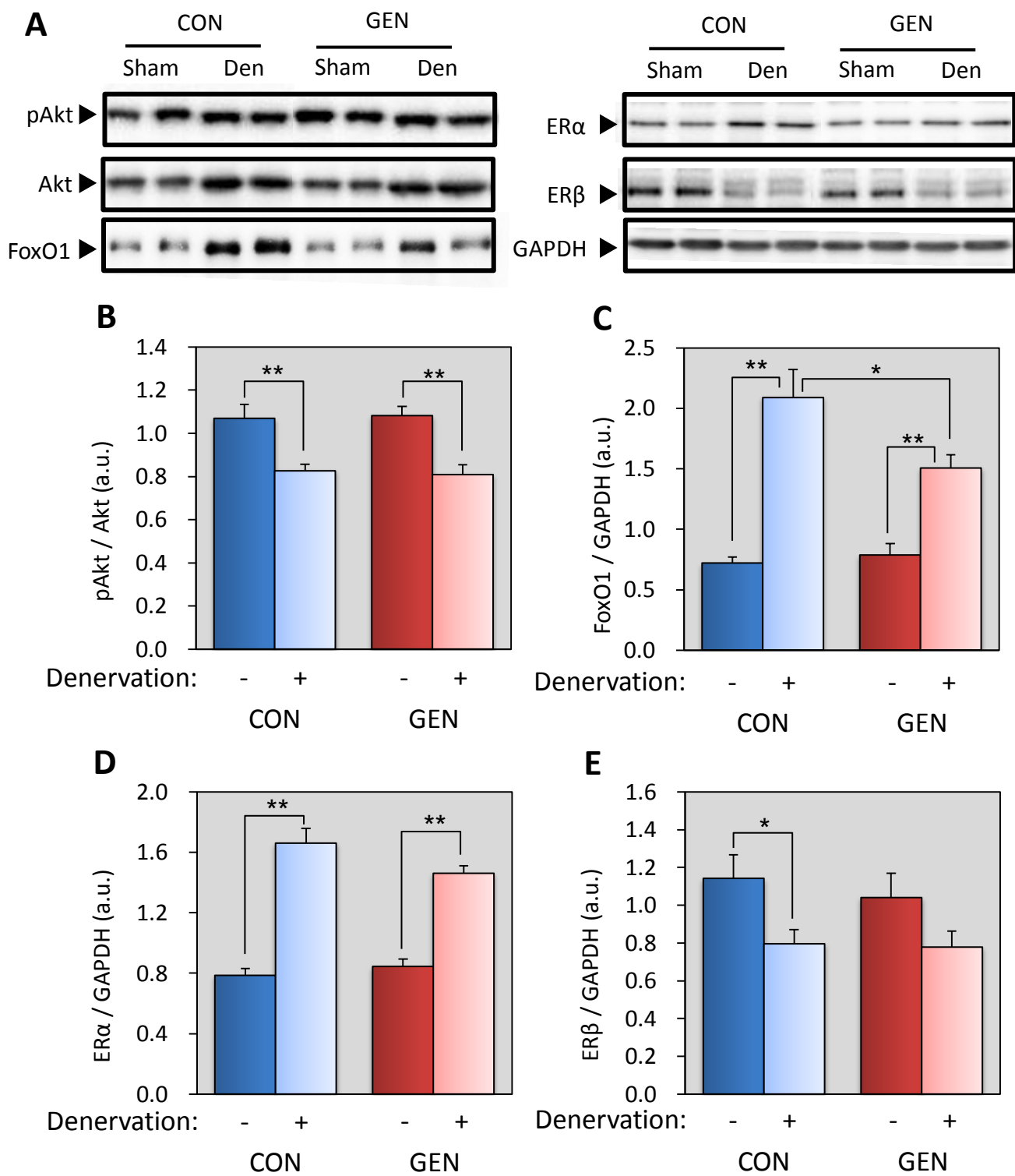


Fig. 2-2-2-9 Aktのリン酸化レベルおよびFoxO1、ERα、ERβのタンパク質量(ヒラメ筋)に及ぼすゲニステインの影響

A: ウェスタンブロットにおけるバンド

B: Aktのリン酸化レベル

D: Estrogen Receptorα タンパク質量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

C: FoxO1 タンパク質量

E: Estrogen Receptorβ タンパク質量

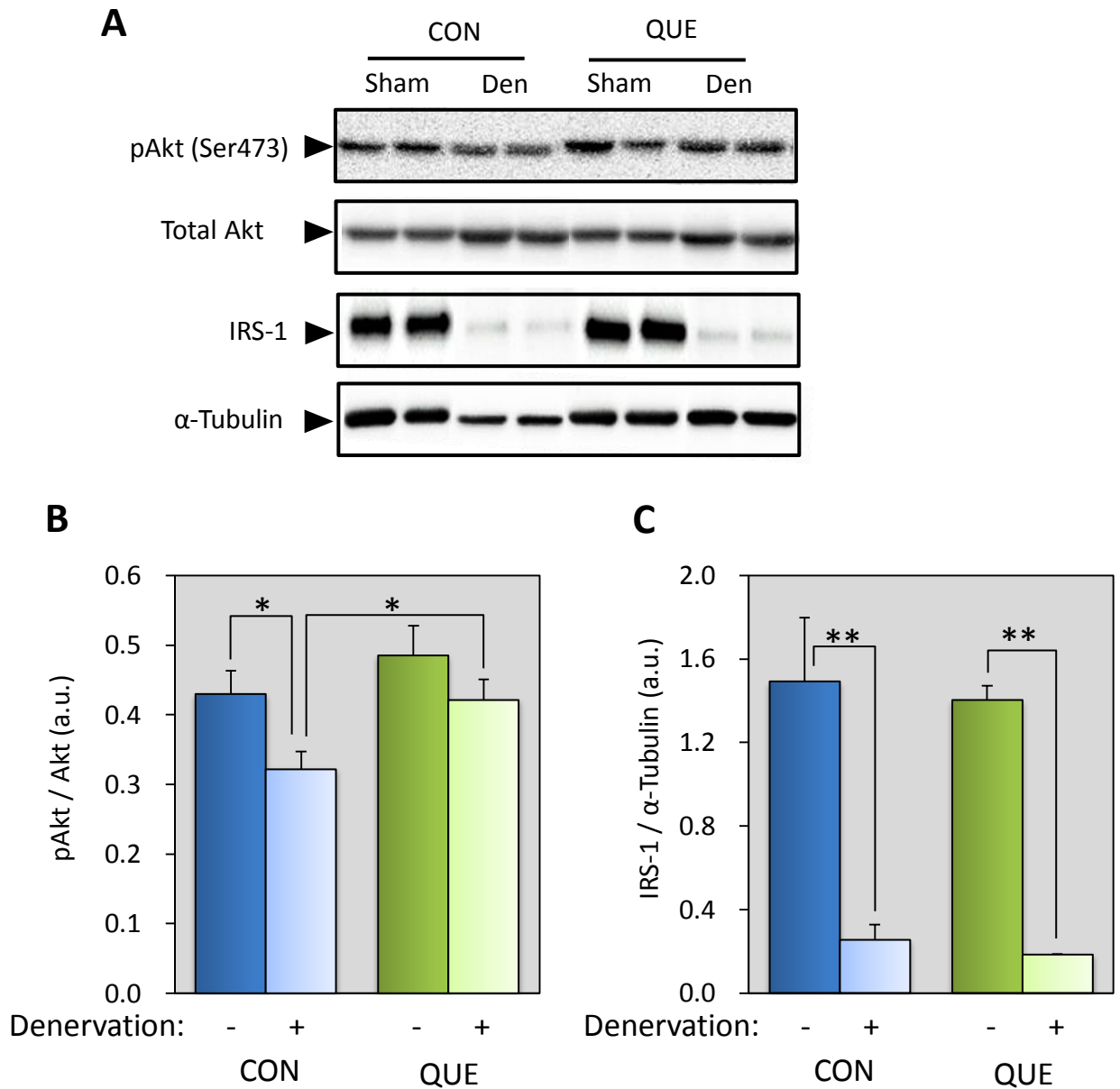


Fig. 2-2-2-10 Aktのリン酸化レベルおよびIRS-1タンパク質量に及ぼすケルセチンの影響(ヒラメ筋)

A: ウェスタンブロットにおけるバンド

B: Aktのリン酸化レベル

C: IRS-1タンパク質量

グラフの値は平均 \pm S.E.を示す。p-Akt/Akt: n=8, IRS-1: n=3-4

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA, Tukey)

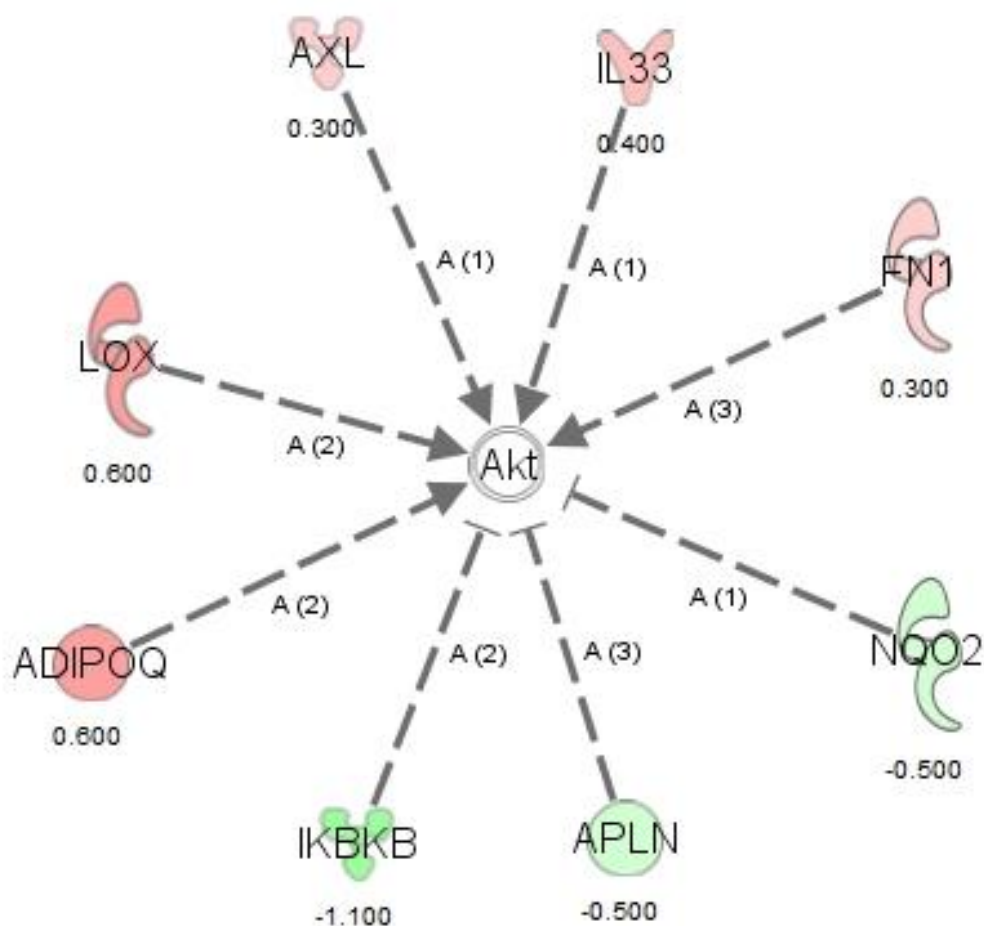


Fig. 2-2-2-11 ケルセチン摂取により変動したAkt制御遺伝子群
Aktを発現増加により活性化または発現減少により不活性化する遺伝子群。分子の下の数字は発現倍率(log ratio)を示す。

赤色:発現増加 緑色:発現減少

→ 活性化 --| 不活性化

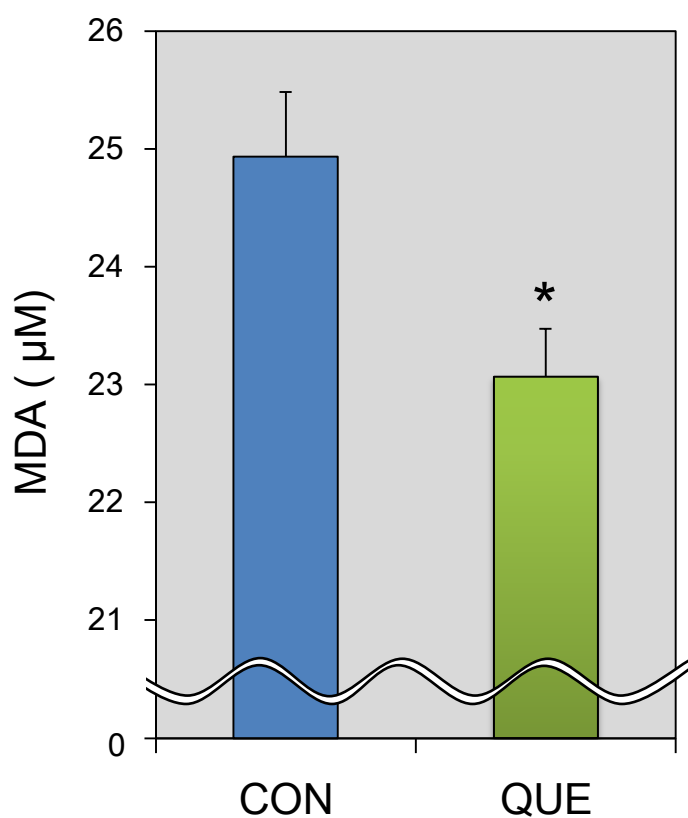


Fig. 2-2-2-12 血漿TBARS濃度

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (TTEST)

第三章

ゲニステイン摂取による

廃用性筋萎縮予防効果の作用機構の解析

緒言

エストロゲン受容体 (ER) はエストロゲン等のリガンドの結合により活性化する核内受容体の一つであり、ER α (Green *et al.*, 1986)と ER β (Kuiper *et al.*, 1996)が存在する。ER の構造は A~F 領域と呼ばれる、核内受容体共通の一次構造を持つ (Fig 3-0-1)。これは中央 C 領域に存在する DNA 結合領域を挟んで N 末端側の A/B 領域および C 末端側の E/F 領域で構成される。ER は 2 つの転写促進能を持ち、A/B 領域の恒常的転写促進能は AF-1、E/F 領域のリガンド誘導性転写促進能は AF-2 と呼ばれている。E/F 領域はリガンド結合領域であり、エストロゲン等の結合により転写活性が誘導される。また、中央 C 領域の DNA 結合領域は、エストロゲン受容体応答配列 (ERE) に結合する。このような構造を持つことから、ER はプロモーター中に ERE を含む標的遺伝子の転写を直接制御することが分かっている(Mangelsdorf *et al.*, 1995)。

エストロゲンは子宮・乳腺の発育を促進し女性生殖機能を司る一方で、血清コレステロール低下作用、骨吸収抑制作用も有しており、これらに ER が関与していることがわかっている。また、各 ER アイソフォームの役割を明らかにするため Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) を用いた研究が行われている。合成エストロゲンリガンドであるタモキシフェン・ラロキシフェンはその開発過程で、エストロゲン標的組織のうち骨組織・心血管系へのアゴニスト作用を保持する一方で、乳腺および子宮に対してはアンタゴニストとして作用することが判明し、生体で実際に標的組織ごとに異なるエストロゲン制御機構が存在することが示されている(McDonnell, 1999)。本研究で用いているゲニステインは ER α および ER β に結合することが分かっているが、その結合能は ER β が圧倒的に強いことが報告されており、しばしば ER β アゴニストとして使用されている。また、ノックアウトマウスを用いた研究にて各 ER アイソフォームの作用も明らかとされており、ER α ノックアウトマウスは女性生殖器 (卵巣・子宮・乳腺)、骨量、性行動の異常が報告されている(Korach, 1994; Lubahn *et al.*, 1993; Rissman *et al.*, 1997)。一方、ER β ノックアウトマウスは卵巣からの排卵の低下以外明瞭な表現型は得られていない(Krege *et al.*, 1998)。

第二章の結果において、ゲニステインの摂取は萎縮筋において ER の標的遺伝子を多数変動させた。筋萎縮および筋肥大における ER の役割についてはわずかしき明らかになっていないものの、骨格筋にて ER の発現が確認されていることから(Wiik *et al.*, 2009)、その生理作用に注目が集まっている。以下に筋萎縮および筋肥大におけるエストロゲンおよび ER の役割について、明らかになっているものについて述べる。

エストロゲンの作用

McClung *et al.*は後肢懸垂誘導性筋萎縮ラットを再び重力負荷下で飼育して、その萎縮筋の回復を評価した際、エストロゲン投与によりそれが早まることを明らかにしており、エストロゲンによる筋萎縮回復促進作用があることを報告している(McClung *et al.*, 2006)。また、Svensson *et al.*は雄マウスを去勢することにより筋萎縮を誘導させ、エストロゲンの投与によりその筋萎縮を抑制したことを報告している(Svensson *et al.*, 2010)。

ER α を介した作用

エストロゲンによる骨格筋 ER α を介した作用に関する報告のほとんどが筋分化制御についてであり、Galluzzo *et al.*はラット L6 筋管細胞を用いてエストロゲンによる分化促進作用を報告している(Galluzzo *et al.*, 2009)。一方、Ogawa *et al.*はエストロゲンによる ER α を介した筋分化抑制作用を報告しており(Ogawa *et al.*, 2011)、相反する報告がなされている。また、ER α ノックアウトマウスは体重当たりのヒラメ筋重量の低下を示し、前脛骨筋、腓腹筋に関しては筋収縮能の低下が観察されている(Brown *et al.*, 2009)。

ER β を介した作用

エストロゲンやSERMによる骨格筋 ER β を介した作用に関しては筋繊維構成タンパク質量の変動や筋分化制御について報告されている。Velders *et al.*はエストロゲンおよびゲニステインが卵巣摘出による Myosin Heavy Chain I の低下を抑制することを報告している(Velders *et al.*, 2010)。また、選択的 ER β アゴニストの投与により myotoxin による筋障害を押せることを報告しており、ER β ノックアウトマウスを用いてその作用が ER β を介していることを報告している(Velders *et al.*, 2012)。

このように、骨格筋における ER の役割は分化作用や筋タンパク合成に影響することが明らかとなっており、筋タンパク質分解に対する ER の役割については明らかとなっていない。そこで、本研究ではゲニステインの筋萎縮抑制作用への ER の関与を明らかにするため、以下 2 点について検討を行った。

1. ER アンタゴニスト投与による

ゲニステインの筋萎縮抑制作用の有無について

2. ER α および ER β アゴニスト投与が筋萎縮に及ぼす影響について

これらを検討することにより、「ゲニステインの筋萎縮抑制作用が ER を介しているのか」、また「その作用が ER α および ER β どちらを介した作用であるか」明らかにすることができる。

第一節

ゲニステインの廃用性筋萎縮予防作用における エストロゲン受容体の関与について

3-1-1 方法

飼育条件

9 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー）を 1 週間予備飼育した。飼育期間中の食餌と水は自由摂取とし、飼育室は明期（8:00～20:00）、暗期（20:00～8:00）の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育後、マウスを以下の 4 群に分けて実験を開始した。すべての群に実験開始 3 日前に浸透圧ミニポンプ（alzet osmotic pump, ALZET）をマウスに皮下包埋し、エストロゲン受容体アンタゴニストを投与した。浸透圧ミニポンプの使用方法については薬剤の投与の項で述べる。Vehicle（Veh）群には溶媒を投与し、エストロゲン受容体拮抗薬投与（ICI）群にはエストロゲン受容体アンタゴニストである ICI182,780（Sigma）を投与した。3 日後、飼料を試験食に切り替え、ゲニステイン（GEN）群には 0.05% のゲニステイン食を摂取させた。マウスは個別飼育を行い、体重及び摂食量については、1 日 1 回測定した。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

- | | |
|--------------|-------------------------------|
| 1) Veh-CON 群 | 溶媒投与+AIN-93G 食給餌群 |
| 2) Veh-GEN 群 | 溶媒投与+0.05%ゲニステイン添加食給餌群 |
| 3) ICI-CON 群 | ICI 182,780+AIN-93G 食給餌群 |
| 4) ICI-GEN 群 | ICI 182,780+0.05%ゲニステイン添加食給餌群 |

14 日目に「第二章 第一節 2-1-1 坐骨神経の切除」と同様の方法を用い、片肢の坐骨神経を切除し、筋萎縮を誘導した。その後、坐骨神経切除 10 日目に解剖を行った。解剖時には絶食等は行わず、午前 8 時（明期）より解剖を行った。マウスにイソフルラン（MERCK Animal Health）で麻酔後、頸動脈より採血を行い、臓器を摘出した。摘出後、組織切片用の組織以外は、直ちに液体窒素中で凍結し、凍結した組織は後の分析に供するまで - 80℃で保存した。組織切片用のサンプルについては以下に述べる。血液は室温で凝固後、遠心分離（9,000 rpm, 10 min, 4℃）し、血清を得た。得られた血清は後の解析まで - 80℃で保存した。

薬剤の投与

エストロゲン受容体アンタゴニストの投与には浸透圧ミニポンプを用いて行った。浸透圧ミニポンプとはある一定量を随時投与し続けるカプセルであり、薬剤や化合物等の慢性的かつ持続的な投与が可能である。エストロゲン受容体のアンタゴニストにはICI 182,780を用い、1.04 $\mu\text{g/hr.}$ で投与できる濃度に50% DMSO (Sigma) / ポリエチレングリコール 600 (Wako) 液に溶解し、溶媒または試験液を浸透圧ミニポンプに充填した。本試験で用いたICI 182,780の濃度は1 mg/kg b.w./dayと同等の投与量であり、この投与量は卵巢摘出メスラットへのエストロゲン投与による子宮重量の増加をほぼ完全に抑える効果が確認されている濃度である(Wakeling *et al.*, 1991)。試験液を充填した浸透圧ミニポンプは、マウスの背部にイソフルラン麻酔下で皮下包埋した。

筋横断切片の作成および横断面積の測定

凍結ブロックの作製

摘出した骨格筋は氷冷した生理食塩水に入れ、結合組織等を取り除いた。その後、コルク板の上に垂直に立ててトラガントゴム（ナカライテクス）で固定した。固定した骨格筋は液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結させ、凍結組織をドライアイス上でイソペンタンを蒸発させた後、 -80°C で保存した。

凍結薄切切片標本の作製および組織染色

上述した方法により採取した凍結筋肉を用いてHE染色を行った。HE染色は次の手順で行った。まず、クライオスタットを用いて凍結切片を薄切し(15 μm)、スライドガラスに貼り付けた。次に10%ホルマリン溶液に3分間浸し組織を固定後、蒸留水で3回洗浄した。マイヤーヘマトキシリン溶液(MERCK)に10秒間浸し、蒸留水で3回洗浄後、蒸留水に15分間浸した。更に1%エオジン溶液(Wako)に30秒間浸し、その後70%エタノール、95%エタノール、100%エタノール(1分間×3回)、キシレン(3回)の順で脱水を行った。脱水後、Mount-Quick(大道産業)にて封入した。筋繊維横断面積は、顕微鏡下で取り込んだ画像をImage Jで解析した。ある一定視野内(筋中央部：個体間で差が出ないように固定した)の約100繊維の面積を求め、繊維数で割ることにより求め、その値を筋横断面積とした。

RNA抽出

凍結保存したヒラメ筋をSKミル(Tokken, Inc.)で凍結粉碎を行い、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(QuiaGen)でRNA抽出を行った。抽出方法については添付のプロトコルに従った。

real time RT-PCR

「第二章 2-2-1 方法」と同様の方法で行った。用いたプライマーは以下に示

した。

Atrogin1

F GAGACTCTGCCAGTACCACTTCT
R AATCCAGCTGCCCTTTGTC

Murf1

F ATGAGGAAGAGGGCGTGA
R TCCAGAGCGTGTCTCACTCA

Foxo1

F GTGGGGCAACCTGTCGTA
R TTCTCGGCTGAGCTCTCG

Gapdh

F GGTGAAGGTCGGTGTGAACG
R CTCGCTCCTGGAAGATGGTG

統計解析

測定値は平均値±標準誤差（S.E.）で示した。二元配置分散分析後、Tukey法により群間比較を行った。

3-1-2 結果

体重推移および摂食量

Veh-GEN 群の体重は Veh-CON 群に比べ、低く推移した（Fig. 3-1-1-1A）。一方、ICI 投与群は V-CON 群に比べ低く推移する傾向にあったが、ICI-CON 群と ICI-GEN 群の間に差は認められなかった。摂食量は坐骨神経切除の前後で全群間で有意な差は認められず、同程度であった（Fig. 3-1-1-1B, C）。

解剖時の筋重量及び Sham 肢に対する筋重量比

腓腹筋重量および前脛骨筋重量、その Sham 肢に対する筋重量比は全ての群で同程度であった（Fig. 3-1-1-2A, C, D, F）。坐骨神経切除肢のヒラメ筋重量は Veh-CON 群に比べ、Veh-GEN 群でわずかに高値を示す傾向にあったが、ICI 投与群では CON 群と GEN 群の間に差は認められなかった（Fig. 3-1-1-2B）。ヒラメ筋の Sham 肢に対する筋重量比は Veh-CON 群に比べ Veh-GEN 群において増加し、このゲニステイン摂取による増加は ICI 投与群では見られなかった（Fig. 3-1-1-2E）。

筋横断面積（繊維当たりの面積）

ヒラメ筋の筋横断面積は坐骨神経切除により低下した（Fig. 3-1-1-3B）。Veh-GEN 群ではこの低下を抑え、Veh-CON 群に比べ Veh-GEN 群で有意に増

加した。一方、ICI 投与群の坐骨神経切除肢の筋横断面積は V-CON 群に比べ、増加する傾向がみられたが、ゲニステイン摂取による影響は認められなかった。

Atrogin1、Murf1 および Foxo1 mRNA の発現量

ヒラメ筋での *Atrogin1*、*Murf1* および *Foxo1* mRNA 発現量は坐骨神経切除により増加した。Veh 群において切除肢の *Atrogin1* の発現量は CON 群に比べ GEN 群で低い傾向にあり、ICI 群においては CON 群と GEN 群の間に差は認められなかった (Fig. 3-1-1-4A)。 *Murf1* の発現量は *Atrogin1* と同様の傾向が認められ、Veh 群では CON 群に比べ GEN 群で坐骨神経切除による *Murf1* の発現増加を有意に抑制したが、ICI 群では坐骨神経切除による *Murf1* の発現増加をゲニステインは抑制しなかった。 *Foxo1* の発現量は全ての群において坐骨神経切除により有意な発現増加を示した (Fig. 3-1-1-4C)。 Veh 群において切除肢の *Foxo1* の発現量は CON 群に比べ GEN 群で有意に低下し、ICI 群においては CON 群と GEN 群の間に差は認められなかった。

第二節

廃用性筋萎縮予防作用に関わる

エストロゲン受容体アイソフォームについて

3-2-1 方法

飼育条件

9 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールズリバー) を 1 週間予備飼育し、明期 (8:00~20:00)、暗期 (20:00~8:00) の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育後、マウスを以下の 4 群に分けて実験を開始した。すべての群に実験開始 3 日前に浸透圧ミニポンプ (alzet osmotic pump, ALZET) を皮下に包埋し、試験物質を投与した。Vehicle 群 (Veh 群) には溶媒を、PPT 群には ER α アゴニスト (ER α) として 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT; Tocris) を、DPN 群には ER β アゴニストとして 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN; Tocris) を、ゲニステイン投与群 (GEN 群) にはゲニステイン (LC laboratories) を投与した。3 日後、片足の坐骨神経を切除し、筋萎縮を誘導した。坐骨神経切除 10 日目に解剖を行い、下肢骨格筋 (腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋) を摘出し、重量測定後、液体窒素で凍結し解析まで -80°C で保存した。マウスは個別飼育を行い、飼料は AIN-93G (コーン油を使用) を用いた。体重及び摂食量については、1 日 1 回測定を行った。また、予備試験の結果より、ER α アゴニストの投与により摂食量の低下が認められた。したがって、

本試験では ER α 群に合わせて全ての群で *pair feeding* を行った。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。

- 1) Veh 群 溶媒投与群
- 2) PPT 群 1 mg/kg b.w./day ER α agonist 投与群
- 3) DPN 群 1 mg/kg b.w./day ER β agonist 投与群
- 4) GEN 群 1 mg/kg b.w./day ゲニステイン投与群

薬剤投与

エストロゲン受容体アゴニスト及びゲニステインの投与には浸透圧ミニポンプを用いて行った。各投与物質については、1.04 $\mu\text{g/hr}$. で投与できるように 50%DMSO (Sigma) / 生理食塩水 (大塚生食注) に溶解し、浸透圧ミニポンプに充填した。本試験で用いた各物質の濃度は 1 mg/kg b.w./day と同等の投与量であり、卵巢摘出ラットの子宮重量増加作用や心筋保護作用が報告されている濃度である (Cheng and de Groat, 2013; Nikolic *et al.*, 2007)。試験液を充填した浸透圧ミニポンプは、マウスの背部にイソフルラン麻酔下で皮下包埋した。

RNA 抽出

3-1-1 の RNA 抽出と同様の方法で行った。

real time RT-PCR

3-1-1 の real time RT-PCR と同様の方法で行った。

統計解析

測定値は平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。統計解析は一元配置の場合は Dunnett 法を用いて行った。二元配置の場合は二元配置分散分析後、Tukey 法を用いて行った。

3-2-2 結果

体重および摂食量

飼育期間中の体重推移に差は認められなかった (Fig. 3-2-1-1A)。摂食量は *pair feeding* 下で飼育したので、全ての群で同程度の値を示した。また、PPT 群において ER α agonist 投与による摂食抑制作用は体重減少を引き起こす程度

ではなく、他の群においても体重減少は認められなかった。

下肢骨格筋重量と Sham 肢に対する筋重量比

腓腹筋重量および前脛骨筋重量は神経切除により減少したが、群間に差は認められなかった (Fig. 3-2-1-2A, C)。また、腓腹筋および前脛骨筋の Sham 肢に対する筋重量比は全ての群で差は認められなかった (Fig 3-2-1-2D, F)。ヒラメ筋では PPT 群において神経切除による筋重量減少が抑制された (Fig. 3-2-1-2B)。DPN 群では Veh 群と同程度であった。また GEN 群における神経切除肢筋重量は、Veh 群の神経切除肢の筋重量に比べ高値を示す傾向にあった。Sham 肢に対する筋重量比は Veh 群と比べ PPT 群で有意に増加したが、DPN 群では Veh 群と同程度であった (Fig. 3-2-1-2E)。GEN 群の筋重量比は Veh 群に比べ増加する傾向にあった。

ヒラメ筋における *Atrogin1*、*Murf1* および *Foxo1* mRNA の発現量

ヒラメ筋における *Atrogin1* の発現量は、神経切除により約 2 倍に増加したが (Veh 群、DPN 群、GEN 群)、PPT 群ではその発現増加は認められなかった (Fig. 3-2-1-3A)。また、*Murf1* の発現量は神経切除により増加を示さなかったが (Veh 群、DPN 群)、PPT 群および GEN 群の *Murf1* 発現量は神経切除により有意に低下した (Fig. 3-2-1-3B)。Veh 群の *Foxo1* 発現量は神経切除により増加したが、PPT 群では Veh 群のそれよりも有意に低下した (Fig. 3-2-1-3C)。DPN 群においては Veh 群と同程度であった。また、GEN 群の神経切除肢における *Foxo1* 発現量は、Veh 群のそれに比べ、減少する傾向がみられた。

第三節 考察

エストロゲン受容体 (ER) は生殖組織だけでなく、その他の組織でもエストロゲン作用を仲介していることが分かっている。骨格筋も例外ではなく、ER α と ER β が存在することが報告されており (Wiik *et al.*, 2009)、骨格筋における ER の役割がいくつか報告されている (Barros and Gustafsson, 2011)。第 2 章の結果より、坐骨神経切除により ER α の発現は増加し、ER β の発現は減少すること、またゲニステイン摂取はエストロゲン受容体の標的遺伝子の発現を多く制御することが明らかとなった。これらの結果より、ゲニステイン摂取は骨格筋 ER を介して、種々の生理応答を引き起こすことが示唆された。そこで、本章ではゲニステインによる筋萎縮抑制作用への ER の関与について、各種 Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) を用いて検証した。

坐骨神経切除による筋萎縮に対する ER の関与

最初に ER アンタゴニスト投与下で、ゲニステインによる筋萎縮抑制作用の有無について検証した。ゲニステイン摂取はヒラメ筋の神経切除肢による筋重量比および筋横断面積の減少を有意に抑制し、筋萎縮抑制作用が認められた。一方、この作用は腓腹筋および前脛骨筋においては認められなかった。この結果は第二章の Wistar ラットを用いた実験と同様であり、ラットおよびマウスの両系統においてゲニステインの作用が認められた。この筋萎縮抑制作用は ER アンタゴニスト存在下では認められず、ゲニステインによる筋萎縮抑制作用に ER が関与していることが明らかとなった。次に、PPT (ER α アゴニスト) および DPN (ER β アゴニスト) を用いて、筋萎縮抑制作用に関与する ER アイソフォームを検討した。その結果、ER α アゴニストの投与は坐骨神経切除によるヒラメ筋の萎縮を抑制したが、ER β アゴニストの投与は筋萎縮を抑制しなかった。したがって、ER α の活性化は筋萎縮を抑制することが明らかとなり、これら 2 つの実験結果をまとめると、ゲニステインによる筋萎縮抑制作用は ER α を介した作用であることが示唆された。骨格筋 ER α の活性化は筋分化抑制作用による筋重量の低下を示すことが報告されており (Ogawa *et al.*, 2011)、筋重量に関して本実験の結果と相反する作用が認められた。しかし、投与物質がエストロゲンであることや筋萎縮を誘導していないことなど、本実験と作用物質および実験条件が異なるためこのような作用の違いが現れた可能性が考えられる。実際に、構造の異なるリガンドの結合により ER α リガンド結合領域の立体構造が変化することで異なった作用を示すという、構造生物学的な裏付けもなされていることから (Shiau *et al.*, 1998)、エストロゲンとゲニステインという作用物質の違いが異なる作用を示したと考えられた。一方、Brown *et al.* は雌性 ER α ノックアウトマウスが体重当たりのヒラメ筋重量の低下、腓腹筋および前脛骨筋での筋収縮機能の低下を示すことを報告しており (Brown *et al.*, 2009)、本実験の ER α 活性化に伴うヒラメ筋萎縮抑制作用の結果を支持している。したがって、坐骨神経切除モデルにおいては、ゲニステインによる筋萎縮抑制作用は ER α を介した作用であると考えられ、今後、ゲニステインによる ER を介した筋萎縮抑制作用が坐骨神経切除モデル以外のモデル (例; 後肢懸垂やギプス固定等) でも認められるか検討する必要があると考えられる。

筋萎縮関連遺伝子 (*Atrogin1*, *Murf1*, *Foxo1*) 発現に対する ER の関与

ゲニステイン摂取による *Atrogin1*, *Murf1* および *Foxo1* の発現誘導抑制作用は ER アンタゴニスト存在下では認められなかった。さらに、ER α アゴニストの投与は *Atrogin1*, *Murf1* および *Foxo1* の発現誘導を抑制した。これらの結果から、ゲニステインの摂取は ER α を介して *Atrogin1* や *Murf1*, *Foxo1* といっ

た筋萎縮誘導遺伝子の発現を制御することにより筋萎縮抑制作用を示すことが示唆された。ERは核内受容体であり、エストロゲン等の結合により活性化する。活性化したERはDNAのER応答エレメント(ERE)に結合し、遺伝子発現を制御することが分かっている。このことから、本実験におけるゲニステインやアゴニスト投与による遺伝子発現変動がEREを介した作用であることが考えられた。しかし、ER α によるEREを介した*Atrogin1*、*Murf1*および*Foxo1*の発現制御に関する報告はされていない。一方、Schuur *et al.*はER α とFoxo1が結合することを報告しており(Schuur *et al.*, 2001)、Foulds *et al.*はER α とFoxo1の結合は、リガンド依存性であり、これら複合体はEREに結合することも報告されている(Foulds *et al.*, 2013)。また、*Foxo1*の遺伝子発現が自身によりFoxo-binding siteを介して誘導されることを踏まえると(Essaghir *et al.*, 2009)、ER α の活性化はFoxo1をER α にリクルートすることにより、*Foxo1*の転写活性を抑制することが考えられる。今後、ER α を介したこれら遺伝子の発現制御機構について検討を行う必要がある。

以上の結果より、ゲニステイン摂取はER α を介して筋萎縮抑制作用を示していることが示唆された。また、その作用は坐骨神経切除による*Atrogin1*、*Murf1*および*Foxo1*発現誘導の抑制を介した作用であることが示唆された。

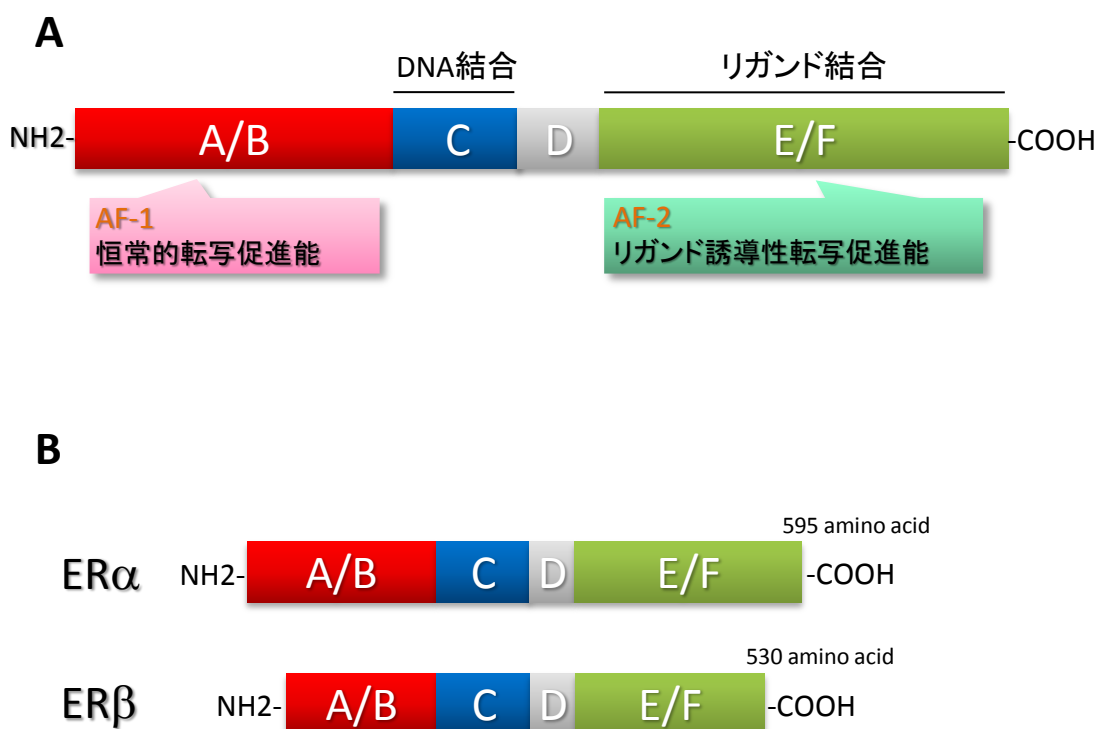


Fig. 3-0-1 核内ステロイド受容体の一次構造の模式図

A: AF-1/AF-2を介する転写調節

核内ステロイド受容体は中央のDNA結合領域をはさみ、N末端側A/B領域に恒常的転写促進能AF-1、C末端側E/F領域にリガンド誘導性転写促進能AF-2を持ち、其々が組織特異的な活性制御を受け、受容体全体の転写活性が決定する。

B: ERαおよびERβの一次構造の模式図

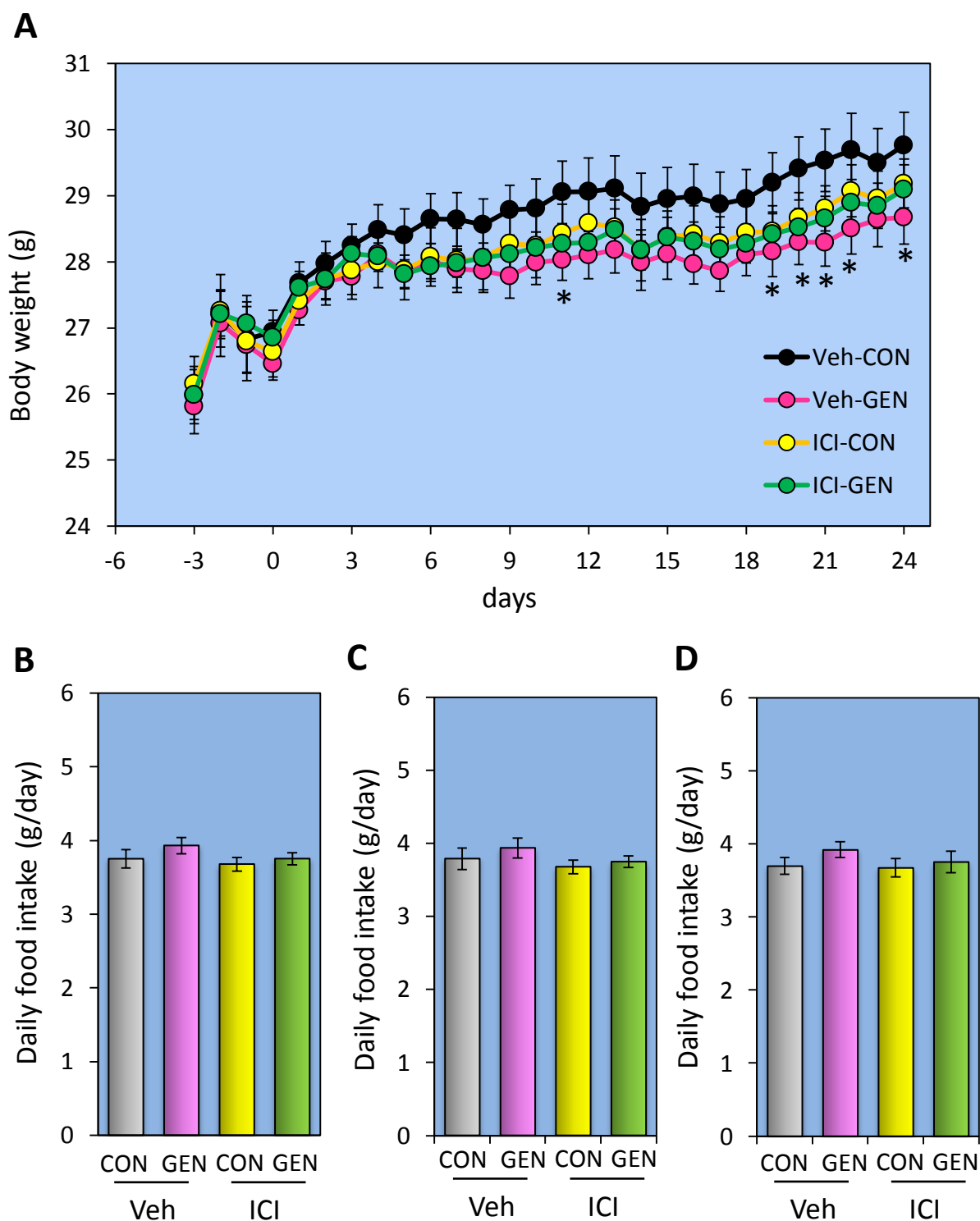


Fig. 3-1-1-1 飼育期間中の体重および摂食量

A: 飼育期間中の体重推移

B: 飼育期間中の一日当たりの摂食量

C: 飼育14日目までの一日当たりの摂食量(坐骨神経切除前)

D: 飼育14～24日目までの一日当たりの摂食量(坐骨神経切除後)

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=12, *: $p < 0.05$ (vs. V-CON)

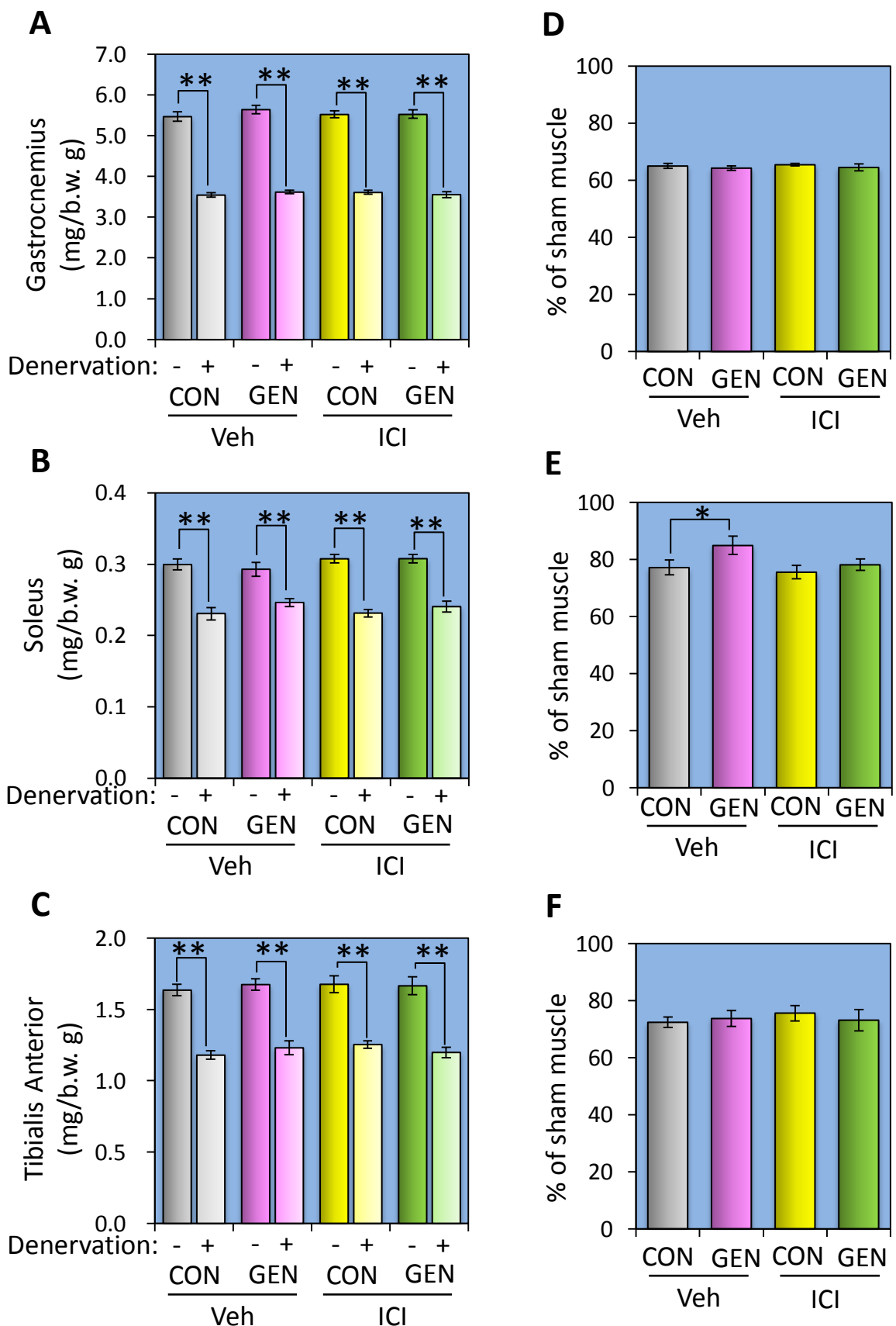


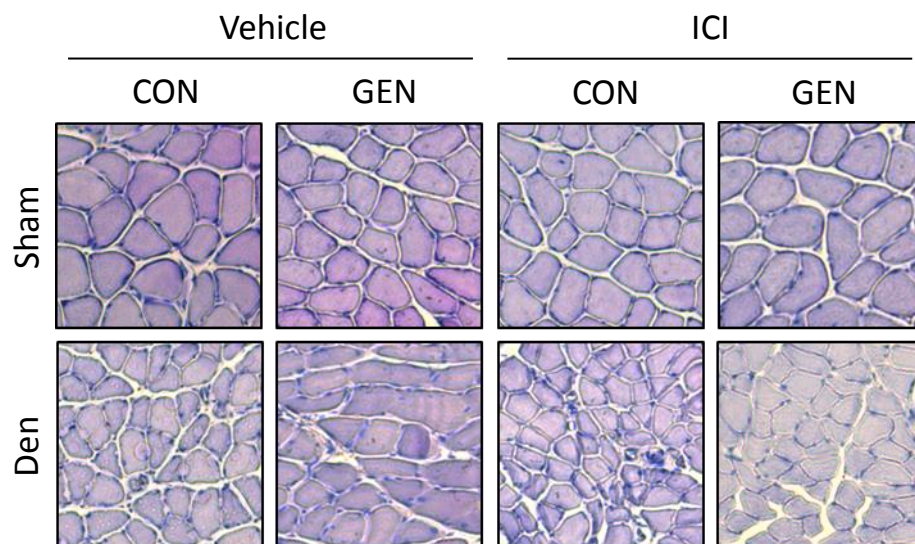
Fig. 3-1-1-2 解剖時の筋重量およびSham肢に対する筋重量比率

A: 腓腹筋重量
B: ヒラメ筋重量
C: 前脛骨筋重量

D: Sham肢に対する腓腹筋重量比
E: Sham肢に対するヒラメ筋重量比
F: Sham肢に対する前脛骨筋重量比

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=12, *: $p < 0.05$

A



B

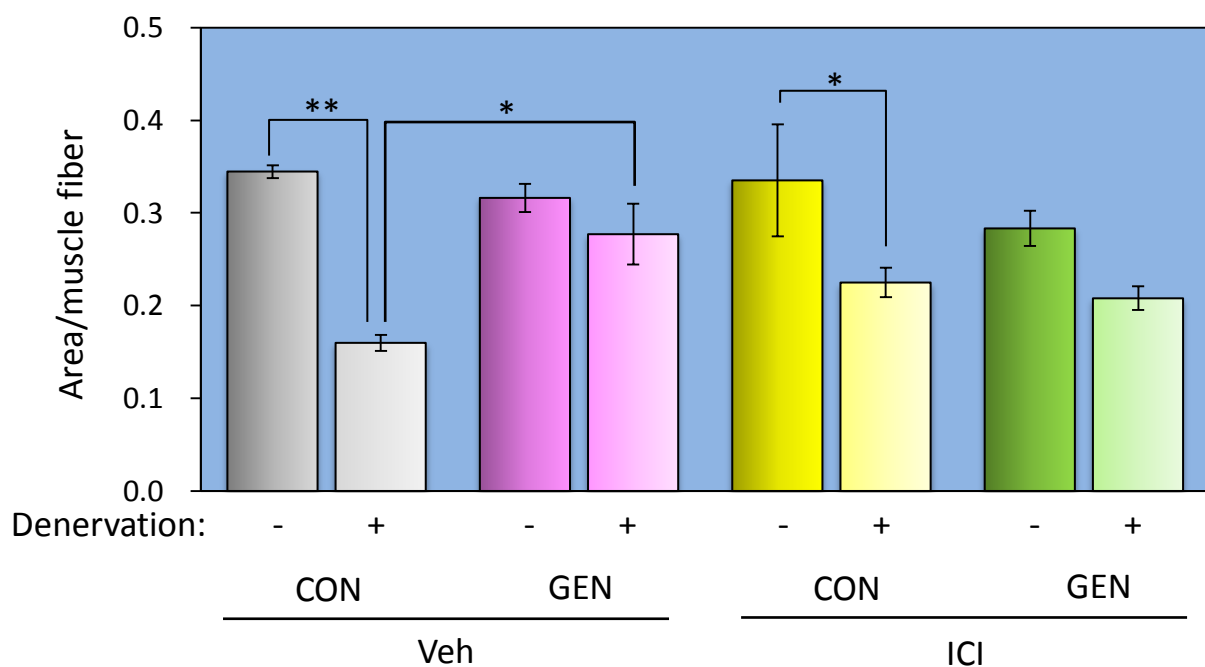


Fig. 3-1-1-3 筋横断面積

A: ヒラメ筋横断切片画像

B: 繊維当たりの平均面積

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=3, *: $p<0.05$

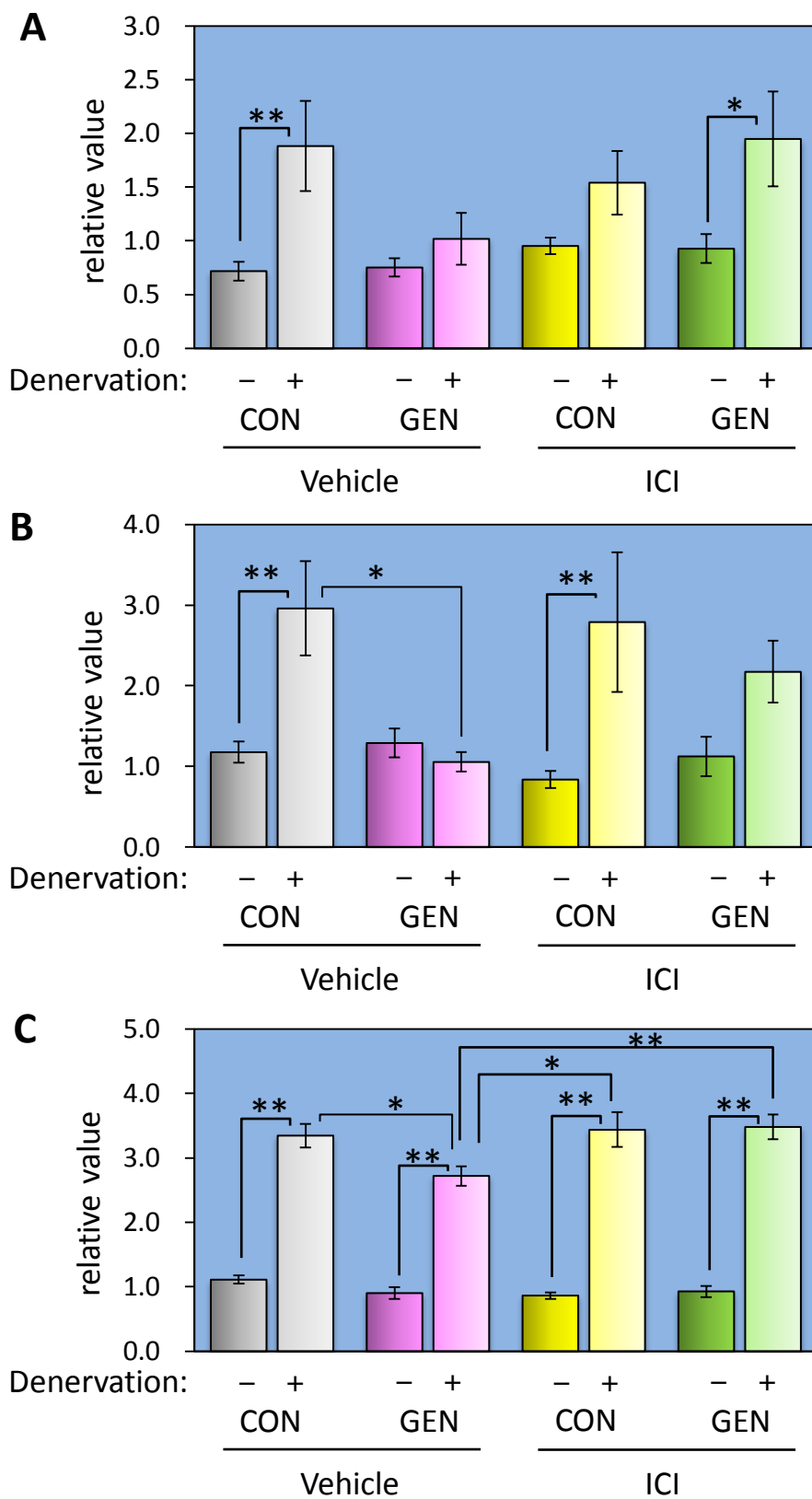


Fig. 3-1-1-4 *Atrogin1*、*Murf1*および*Foxo1* mRNA発現量(ヒラメ筋)

A: ヒラメ筋での*Atrogin1* 発現量

B: ヒラメ筋での*Murf1* 発現量

C: ヒラメ筋での*Foxo1*発現量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=4, *: $p < 0.05$

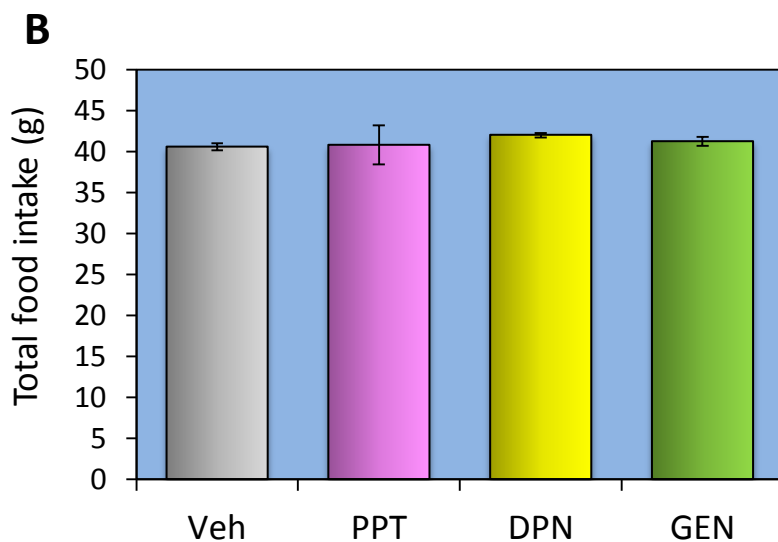
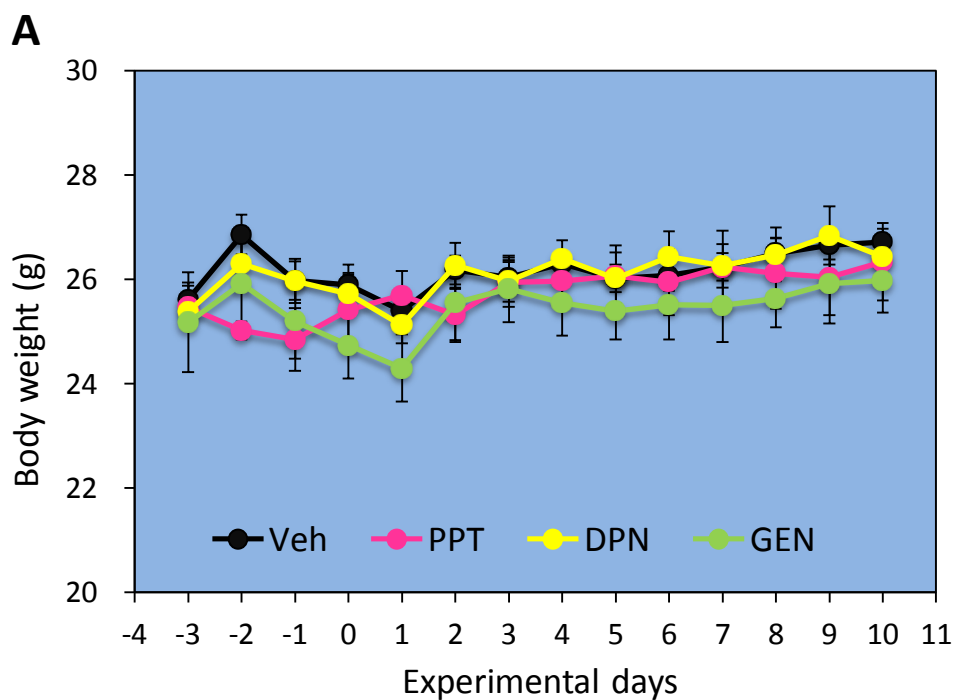


Fig. 3-2-1-1 飼育期間中の体重および総摂食量

A: 飼育期間中の体重推移

B: 飼育期間中の総摂食量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5

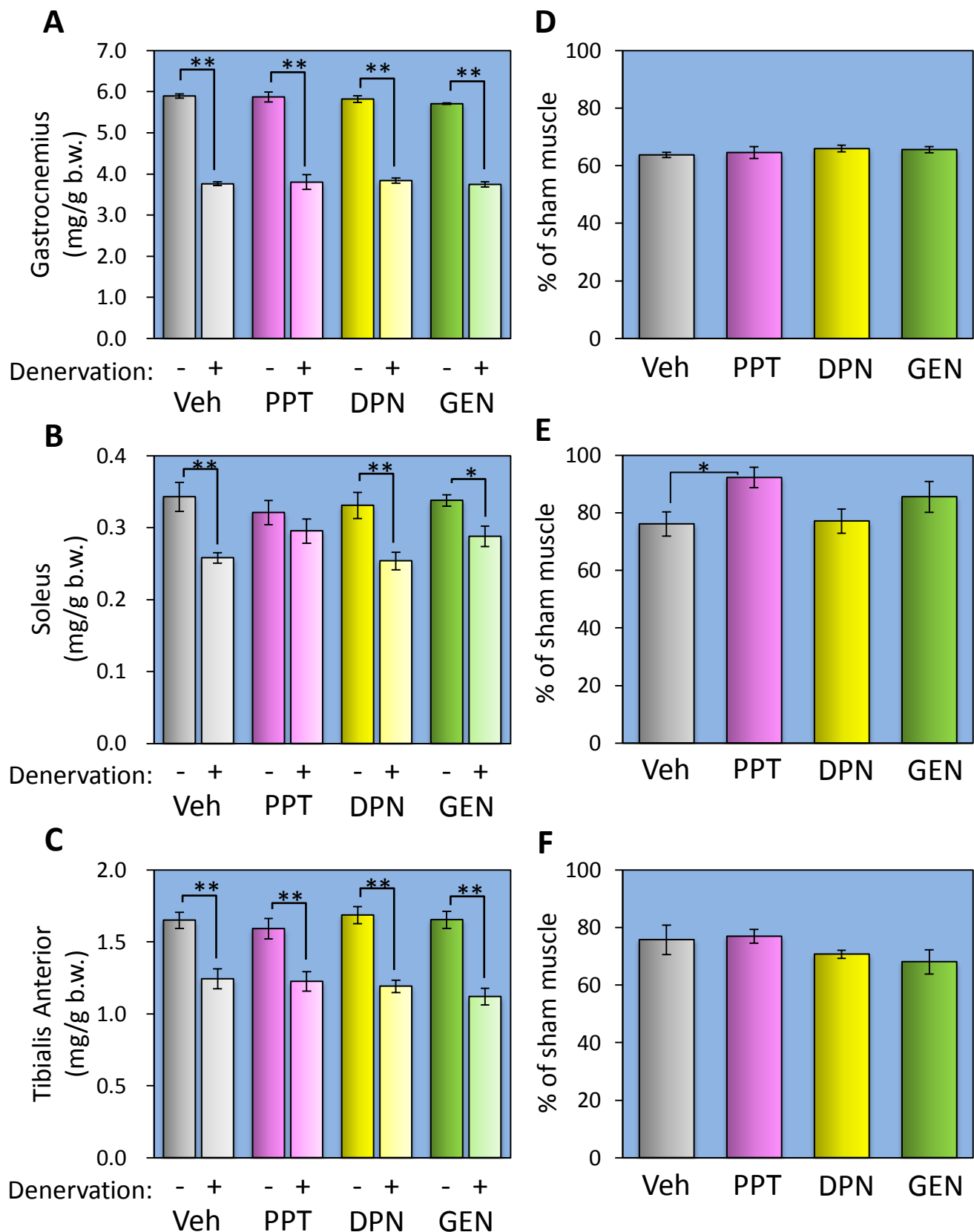


Fig. 3-2-1-2 体重当たりの下肢骨格筋重量とSham肢に対する筋重量比

A: 腓腹筋重量

B: ヒラメ筋重量

C: 前脛骨筋重量

D: Sham肢に対する腓腹筋重量比

E: Sham肢に対するヒラメ筋重量比

F: Sham肢に対する前脛骨筋重量比

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

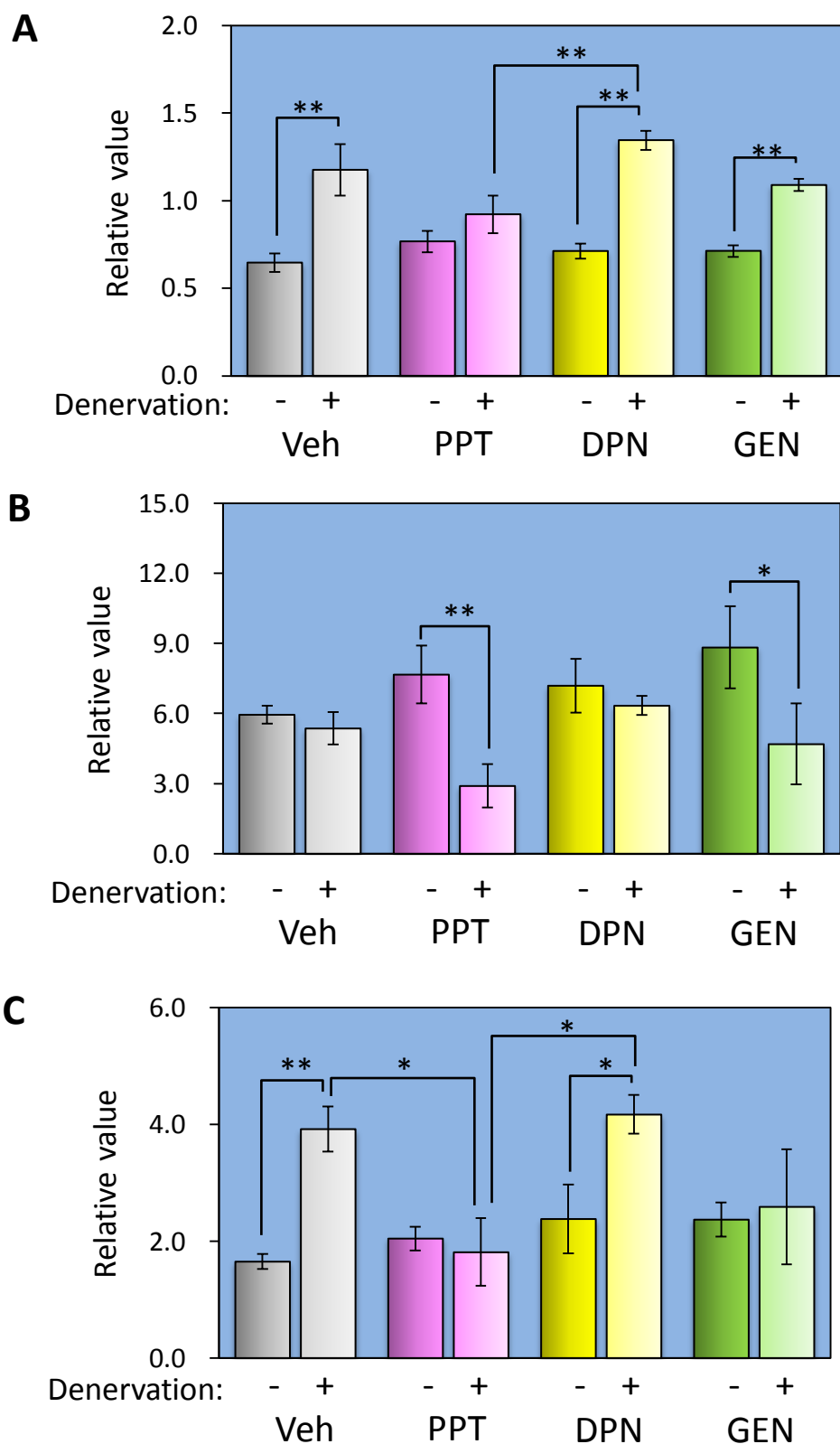


Fig. 3-2-1-3 *Atrogin1*, *Murf1*, *Foxo1* mRNA発現量(ヒラメ筋)

A: *Atrogin1* mRNA 発現量

B: *Murf1* mRNA 発現量

C: *Foxo1* mRNA 発現量

グラフの値は平均±S.E.を示す。n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

総合討論

総合討論

フラボノイドの多様な生理作用は、種々の疾病予防効果を示すことが明らかとなっている。そこで、本研究ではフラボノイド摂取による生体内での詳細な生理応答を捉え、その作用機構を明らかにすることを目的に、高齢者の健康維持の観点から、以下の2点について検討を行った。

- 1) 食餌誘導性生活習慣病モデルマウスに対するフラボノイド摂取の影響
- 2) 筋萎縮モデル動物に対するフラボノイド摂取の影響とその作用機構解析

1) 生活習慣病に対するフラボノイド摂取の影響について

肥満や糖尿病、脂質異常症といった生活習慣病に対するフラボノイドの作用は明らかになりつつある。しかし、その作用機構に関してはほとんど明らかになっておらず、フラボノイドの多様な生理作用の作用範囲や作用点についても明らかとなっていなかった。第一章では食餌誘導性の糖・脂質代謝異常に対するフラボノイドの詳細な生理応答をオミクス解析を用いて検討し、以下の結論を得た。

- ゲニステイン、ダイゼインおよびケルセチンの摂取は高脂肪食摂取による酸化ストレスの増加に対して抑制作用を示したが、糖・脂質代謝異常に関する作用は穏やかであった。
- ケルセチン摂取は、西洋型食摂取による糖代謝異常（耐糖能異常、糖新生亢進）を改善し、これは解糖系律速酵素（*Pfkfb3*）の発現増加や糖新生律速酵素（*Pck2*）の発現減少を介していることが考えられた。
- ケルセチン摂取と西洋型食摂取は p53 関連遺伝子群（*Nme1* や Estrogen-mediated S-phase entry pathway）の発現を逆向きに変動させ、西洋型食による p53 の活性化をケルセチンが抑えることが示唆されたことから、ケルセチン摂取による糖代謝改善作用に p53 活性制御が関与している可能性が考えられた。
- ケルセチン摂取はグルタチオン代謝に関わる遺伝子群の発現や代謝物量を変動させ、ケルセチンによる糖代謝異常改善作用に抗酸化作用が関与することが示唆された。

ケルセチンの投与量について

ここでは今回効果の見られたケルセチンの投与量が人に換算した場合と、ヒトにおける効果の可能性について考察する。Murota *et al.*はケルセチン 150 mg 当量のタマネギを単回摂取させた際のヒト血漿中ケルセチン濃度が摂取 1.5 時間後に $1.031 \pm 0.180 \mu\text{M}$ であることを報告しており (Murota *et al.*, 2007)、ヒト

の場合、摂取したケルセチンは 1.5 時間程度で血漿中最高濃度に到達し、その後急速に減少すると考えられている。また、長期摂取を続けた場合の定常状態濃度に関する報告は少なく、Moon *J et al.* は一日に 200~300 g のタマネギ（ケルセチンは 67.6~93.6 mg）を調理せずにそのまま 7 日間摂取させたヒト血漿中ケルセチン濃度は $0.69 \pm 0.72 \mu\text{M}$ ($0.08 \sim 1.88 \mu\text{M}$) であることを報告しており (Moon *et al.*, 2000)、血中濃度にかかなりの個人差が出ることが明らかとなっている。一方、本研究と同一投与量である 0.1%ケルセチン添加食を 11 週間摂取させたラットの血漿中のケルセチン濃度は $23.4 \mu\text{M}$ であることが報告されており (de Boer *et al.*, 2005)、効果の確認されたケルセチンの血漿濃度はヒトでの血漿濃度に比べかなり高い濃度である。日本人の一日のケルセチン平均摂取量は $9.3 \pm 7.4 \text{ mg}$ であると報告されていることから (Arai *et al.*, 2000)、ヒトにおいて健康効果が認められるには、サプリメント等を用いての積極的な摂取が必要であると思われる。

西洋型食およびケルセチン摂取による p53 制御について

p53 は癌抑制遺伝子として機能していることが明らかとなっており、その他の機能についてもいくつか報告されている。癌細胞は正常細胞に比べ、解糖系が亢進しており、グルコースを栄養源として優先的に消費することが明らかとなっている。この癌細胞による解糖系の亢進には p53 の関与が明らかとなっており、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGM)、TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)、Glucose transporter (GLUT1 と GLUT4)、Phosphofructokinase (PFKP) が p53 の解糖系制御因子として報告されている (Bensaad *et al.*, 2006; Kondoh *et al.*, 2005; Schwartzenberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004)。PGM や TIGAR、PFKP は解糖系を直接制御する因子であり、p53 の活性化は PGM や TIGAR の発現を変動させることで、解糖系を抑制することがわかっている (Fig. 4-1)。本研究においても *Tigar* の発現減少や *Pfkfb3* の発現増加作用が認められ、ケルセチンによる糖代謝改善作用に p53 を介した解糖系制御が関与している可能性が考えられた。

p53 は癌抑制遺伝子であり、p53 ノックアウトマウスは癌の発症を高める特徴を持つことから (Donehower *et al.*, 1992)、その不活性化は癌化の誘導を引き起こすと考えられる。今回ケルセチン摂取による p53 標的遺伝子の発現は西洋型食群と比較すると p53 不活化の方向に顕著に変動しているが、その発現レベルは通常食群と同程度であり、癌の発症を高めているとは考えにくい。反対に p53 の恒常活性型マウスは寿命が短いことが明らかとなっており (Tyner *et al.*, 2002)、正常細胞においては寿命や代謝等の制御に関与していることが明らかとなっている (Minamino *et al.*, 2009)。

今後の展望

第一章では、西洋型食摂取による糖代謝異常に対してケルセチン摂取が改善作用を示し、その作用機構として解糖系律速酵素の発現増加および糖新生律速酵素の発現減少が考えられた。また、網羅的遺伝子発現解析の結果より、ケルセチンの摂取は p53 の活性抑制を介して多くの遺伝子発現を制御している可能性が示された。しかし、今回得られた結果はケルセチン摂取時の生体応答のみであり、西洋型食摂取およびケルセチン摂取による p53 活性の変動についても調べられていない。また、ケルセチン摂取により確認された糖代謝改善作用に p53 が関与しているかについても明らかとなっていない。現在、西洋型食やケルセチン摂取時の肝臓での p53 活性制御に関与する p53 のリン酸化についてウェスタンブロッティングにて確認を行っているところであり、今後は p53 をノックダウンまたはノックアウトした培養細胞やノックアウトマウス等を用いて、ケルセチンによる糖代謝改善作用への p53 の関与を明らかにしていきたい。

Kunkel S *et al.*は疾病患者の生体サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果をもとに、培養細胞へ多くの化合物を添加した時の網羅的遺伝子発現プロファイルと蓄積されたデータベースとの比較により、疾病予防効果を示す化合物を発見したことを報告しており (Kunkel *et al.*, 2011)、遺伝子発現パターンから機能を予測することが可能となっている。本研究において *Nme1* や **Estrogen-mediated S-phase entry pathway** 関連遺伝子群の発現はケルセチンにより著しく変動していた。*Nme1*は癌転移抑制遺伝子として報告されており、**Estrogen-mediated S-phase entry pathway** については細胞周期を制御している経路である。これらケルセチン摂取により顕著に変動した遺伝子から、ケルセチンの生理作用を予測し、新たな機能性を明らかにしていくことが可能である。

また、メタボローム解析の結果、代謝物の量はケルセチン摂取により顕著な変動を示さなかった。代謝物は恒常性を保つため、ある一定濃度にコントロールされている。特に、今回採取した肝臓は 2 時間絶食後に得られたサンプルであることから、代謝変動が活発であるとは考えにくい。今後、これら代謝物による検討を行う際には摂取直後の影響を捉える必要があると思われる。

最後に、ケルセチン摂取により認められた作用として CPT 活性の低下が挙げられた。これは通常食群と西洋型食摂取群との間に差が認められなかったことから、ケルセチンの直接的な作用と考えられる。CPT 活性の低下は生体内にとって筋疲労や血清遊離脂肪酸増加等の悪影響が報告されており、CPT はケルセチン摂取の安全性の観点から検討を行っていく必要があると思われる。

2) 筋萎縮に対するフラボノイド摂取の影響について

高齢者の QOL を維持する上で、運動器疾患の予防は非常に重要であり、超高齢化社会を迎えた日本においてその対策は最重要課題である。運動器疾患のうち筋萎縮に関しては、治療効果が立証されている運動療法では寝たきり患者や高齢者では十分な運動が行えないことや、その他の治療法に関する知見は少なく、日常的に摂取できる機能性食品に期待が寄せられている。第二章では坐骨神経切除による筋萎縮に対するゲニステインおよびケルセチン摂取の影響について、第三章ではゲニステインによる筋萎縮抑制作用へのエストロゲン受容体 (ER) の関与について検討を行い、以下の結論を得た。

- ゲニステインの摂取は坐骨神経切除によるヒラメ筋萎縮を抑制し、その作用機構として ER α を介したタンパク質分解経路因子の発現制御による可能性が考えられた。
- ケルセチンの摂取は坐骨神経切除によるヒラメ筋萎縮を抑制し、その作用機構として抗酸化作用および Akt のリン酸化を介したタンパク質分解経路の抑制が考えられた。

ゲニステインおよびケルセチンの投与量およびその代謝物について

健常人（日本人）の血清ゲニステイン濃度は男性で 493.0 ± 604.4 nM、女性で 502.0 ± 717.6 nM であることが報告されている (Pumford *et al.*, 2002)。また、閉経期の女性の血清ゲニステイン濃度は 413.9 ± 643.9 nM であり (Nagata *et al.*, 2002)、閉経後も同程度であることがわかっており (Wu *et al.*, 2006)、一般的な日本人はある程度のイソフラボンを食事から摂取していることがわかっている。また、ヒトはラットよりもイソフラボンの代謝が遅いため、体重当たり同程度のイソフラボンを摂取しても摂取後の血清イソフラボン濃度はかなり高くなることがわかっており、ヒトの血漿ゲニステイン濃度はラットと比べ約 11 倍であることが報告されている (Gu *et al.*, 2006)。これらも考慮し、食品安全委員会および厚生労働省の通知において特定保健用食品およびサプリメントとして摂取するイソフラボンの量は、一日 30 mg 未満と定められている。また、大豆ミルクを摂取する乳幼児の血液中イソフラボン濃度は $2 \sim 7$ μ M であり、これは 0.025 \sim 0.125% イソフラボン食を摂取したラットの血液中イソフラボン濃度 ($1.3 \sim 5.3$ μ M) と同程度であり (Holder *et al.*, 1999)、本研究で用いた 0.05% ゲニステイン添加食の摂取は十分にヒトでも摂取可能な量であると考えられる。ケルセチンの血中濃度に関しては前述したためここでの記載は省略する。

序論でも述べたように、ゲニステインおよびケルセチンは生体内で代謝され

ることがわかっており、筋萎縮抑制作用がアグリコンまたは代謝物による作用なのか、また骨格筋に直接的に作用したかは明らかでない。特に、骨格筋は肝臓や腎臓に比べ、フラボノイドの蓄積量が低いことが明らかとなっており (de Boer *et al.*, 2005)、骨格筋等の末梢組織へ蓄積されたフラボノイドはかなり少ないことが考えられる。また、グルクロン酸抱合を受けたゲニステインは生理活性を持たないと考えられているが (Munro *et al.*, 2003)、Shimoi K *et al.* は、炎症反応が惹起している組織では β グルクロニダーゼ活性が増加することを報告しており (Shimoi *et al.*, 2001)、フラボノイドの脱抱合が選択的に引き起こされると考えられている。坐骨神経切除肢は炎症反応が誘導されることから、ゲニステインやケルセチンの脱抱合作用が骨格筋で選択的に誘導されることが考えられる。また、ゲニステインの筋萎縮抑制作用はエストロゲン受容体を介していることが明らかとなった。Fuse H *et al.* は核内ステロイド受容体の発現量の変化はその転写活性をリガンド依存的に増加させることを報告している (Fuse *et al.*, 2007)。本研究にて ER α のタンパク質量の増加が神経切除肢にて観察されたことから、ゲニステインの神経切除肢における bioavailability を増加させていることが考えられた。

骨格筋におけるゲニステインによる ER を介した遺伝子発現制御について

本研究においてゲニステインの摂取は ER α を介して筋萎縮関連遺伝子の発現を制御し、筋萎縮を抑制していると考えられた。しかし、ER α が直接 *Foxo1* や *Atrogin1*、*Murf1* といった筋萎縮関連因子の転写制御を行っているかについては明らかではない。ER 等の核内受容体の遺伝子発現制御には、リガンド、受容体、転写共役因子の 3 要素で行われると考えられており (Katzenellenbogen *et al.*, 1996)、リガンド - 受容体複合体の 2 因子のみでは説明できない核内受容体の多様性を転写共役因子の介在により説明できるという概念である (Fig. 4-2)。転写共役因子はプロモーター DNA には直接結合せず ER に結合してその転写活性を仲介する核内タンパク質群であり、転写の制御に関与する多数の共役因子が報告されている (Hermanson *et al.*, 2002; Robyr *et al.*, 2000)。これら転写共役因子の機能解析により、ER の転写制御機構については、1) SWI/SNF、ISWI などの ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体によるヌクレオソーム構造変化 (Narlikar *et al.*, 2002)、2) histone acetyltransferase (HAT) 活性を有する p160, CBP/p300 複合体などによるヒストン修飾 (Xu *et al.*, 1999) によるクロマチンの解きほぐしを経て、3) 最終的に DRIP/TRAP 複合体による基本転写因子への橋渡しが行われる (Lee *et al.*, 2000)、という基本的な枠組みが構築されている (Fig. 4-3)。一方、Nakajima Y *et al.* は前立腺癌細胞へのエストロゲンの投与は ER β -WWP1 複合体を形成し *Foxo1* の転写因子である KLF5 を分解する

ことで *Foxo1* 遺伝子の転写活性を阻害することを報告しており (Nakajima *et al.*, 2011)、ER β による ERE 非依存的な転写抑制作用も明らかとなっている。ER α もまた、リガンド依存的に多数のタンパク質と結合することが報告されていることから (Foulds *et al.*, 2013)、ERE 依存的な転写活性制御も考えられる。今後、萎縮筋におけるゲニステインによる ER α を介した標的遺伝子の探索、また、ゲニステインにより ER α と結合する転写共役因子の同定等を行い、ゲニステインによる ER α を介した筋萎縮抑制作用をより詳細に検討していきたい。

ケルセチンの Akt のリン酸化を介した筋萎縮抑制作用について

ケルセチン摂取による筋萎縮抑制作用には抗酸化作用および Akt のリン酸化が関与していることが考えられた。しかし、Akt より上流の因子については検討しておらず、その作用点については明らかとなっていない。特に Akt は様々なシグナルのハブ因子となっており、Akt のリン酸化を制御する上流経路および Akt のシグナルを伝達する下流経路が多数存在する (Ingley, 2012; Song *et al.*, 2005)。Akt のリン酸化を制御する上流因子はインスリン受容体や IGF 受容体、Integrin 受容体、G-protein coupled 受容体 (GPCR) や Cytokine 受容体による PI3K、PDK-1 を介した経路等が知られている (Emamian, 2012)。一方で、筋肉量に關与する Akt の下流因子は Foxo を介した *Atrogin1* や *Murf1* の転写制御だけでなく、mTOR や S6K、GSK3 を介したタンパク質合成経路がある (Glass, 2010)。ケルセチンはゲニステインよりも筋萎縮を抑制する作用が強い傾向がみられ、これは Akt のリン酸化によるタンパク質合成促進作用によるものかもしれない。今回はケルセチンがタンパク質合成経路に及ぼす作用については検討できていないが、Akt のリン酸化亢進作用が認められていることから、今後検討していきたい。

まとめ

本研究では、高齢者の健康維持の観点から、生活習慣病および筋萎縮に対するフラボノイドの影響とその作用機構の解析を行った。

生活習慣病に関しては、西洋型食摂取による糖代謝異常をケルセチン摂取により改善し、その作用として解糖系および糖新生律速酵素の発現変動が考えられた。また、ケルセチン摂取による広範かつ詳細な生理応答を明らかにするため、網羅的解析をおこなったところ、p53 の標的遺伝子の発現変動やグルタチオン代謝に関わる遺伝子、代謝物の変動が認められた (Fig. 4-4)。

筋萎縮に関しては、ゲニステインおよびケルセチンの摂取は坐骨神経切除による筋萎縮や *Atrogin1* および *Murf1* といった筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ

の遺伝子発現誘導を抑制した。ゲニステインはその作用機構として $ER\alpha$ を介していることが考えられた。一方、ケルセチンの効果においては *Atrogin1* および *Murf1* の上流因子である Akt のリン酸化亢進作用や抗酸化作用が関与していることが示唆された (Fig. 4-5)。

高齢者の健康維持を考える上で、生活習慣病および運動器の疾患の発症を抑えることは極めて重要であり、フラボノイドを用いた高齢者の健康管理の可能性を示せたのではないかと思われる。特に、近年注目されているサルコペニア肥満のように、肥満と筋萎縮が合併状態は単独発症よりも病態悪化に拍車がかかる可能性が示されていることから、生活習慣病および筋萎縮ともに改善作用が認められたフラボノイドの生理作用およびその作用機構に関して今後ますます注目が集まることが期待される。

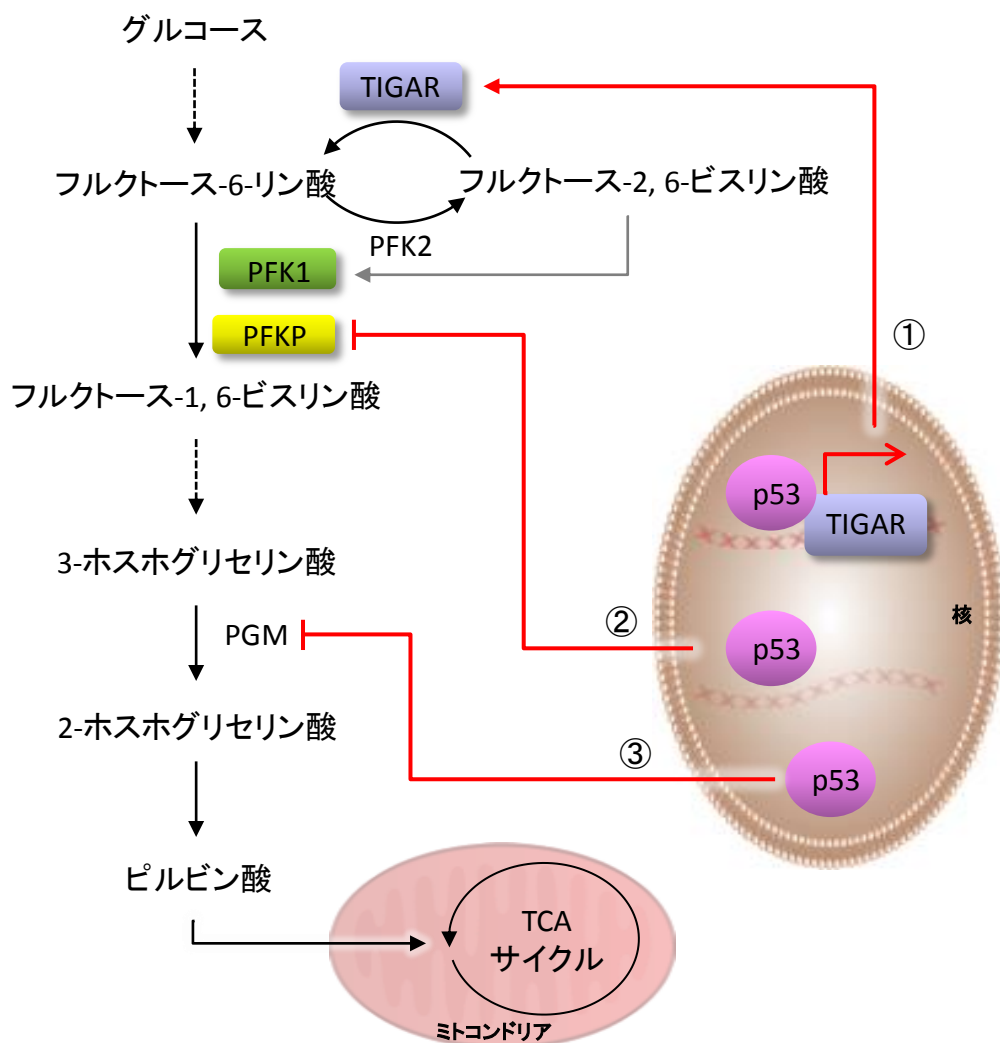


Fig. 4-1 p53による解糖系の調節について

1. p53の活性化はTIGARの転写を促進し、フルクトース-2, 6-ビスリン酸量を減少させる。この減少はフルクトース-2, 6-ビスリン酸によりアロステリックに制御されるPFK1活性を低下させる。
2. p53の活性化はPFKPの発現を抑制する。
3. p53はPGMタンパク質量を転写後制御し、減少させる。

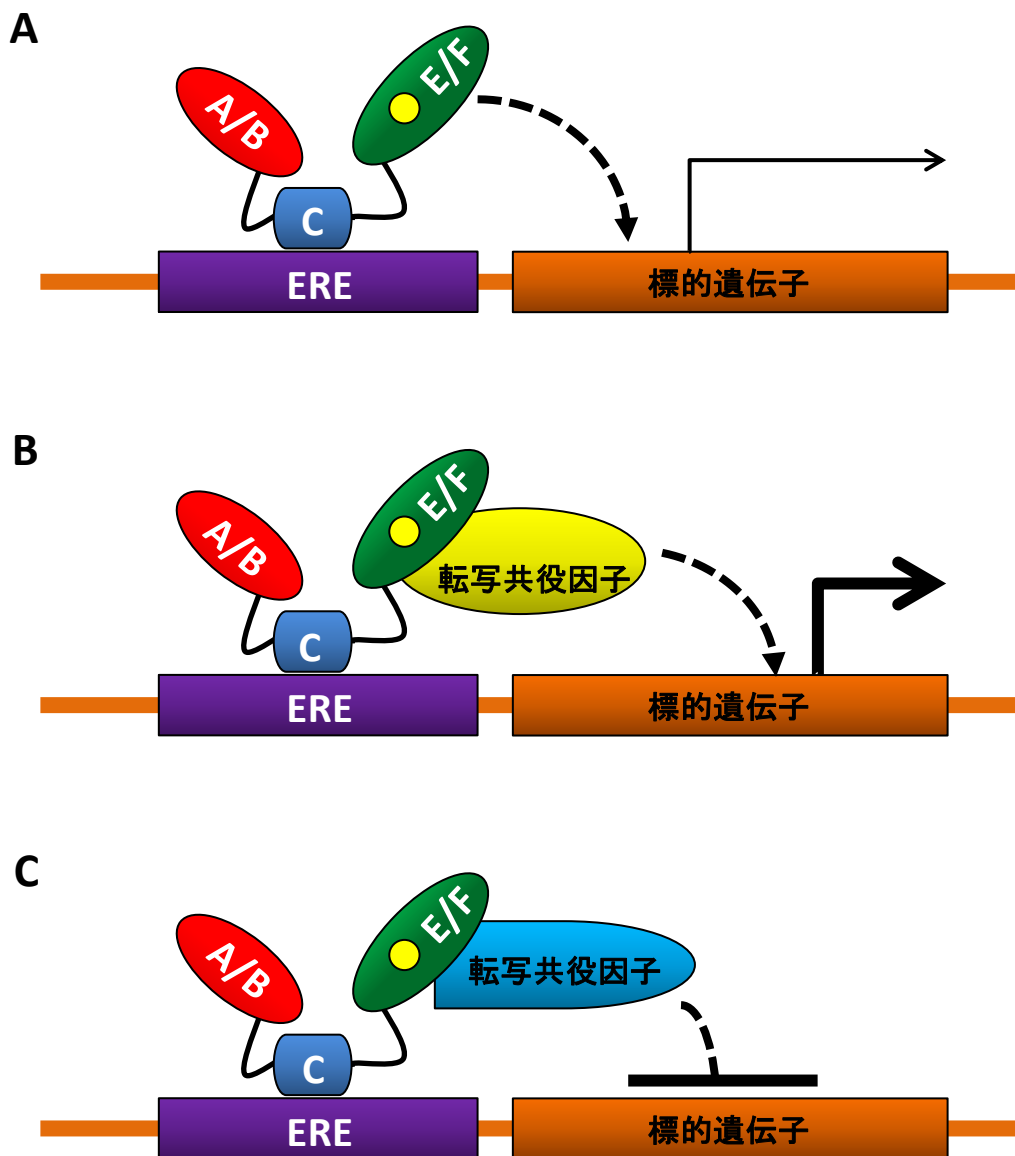


Fig. 4-2 転写共役因子を介したERの転写制御の概念図

転写共役因子の存在により、転写活性の多様性が説明できると考えられている

A: リガンド ● と核内受容体による転写制御

B: リガンド、受容体と転写共役因子による転写活性化

C: リガンド、受容体と転写共役因子による転写抑制

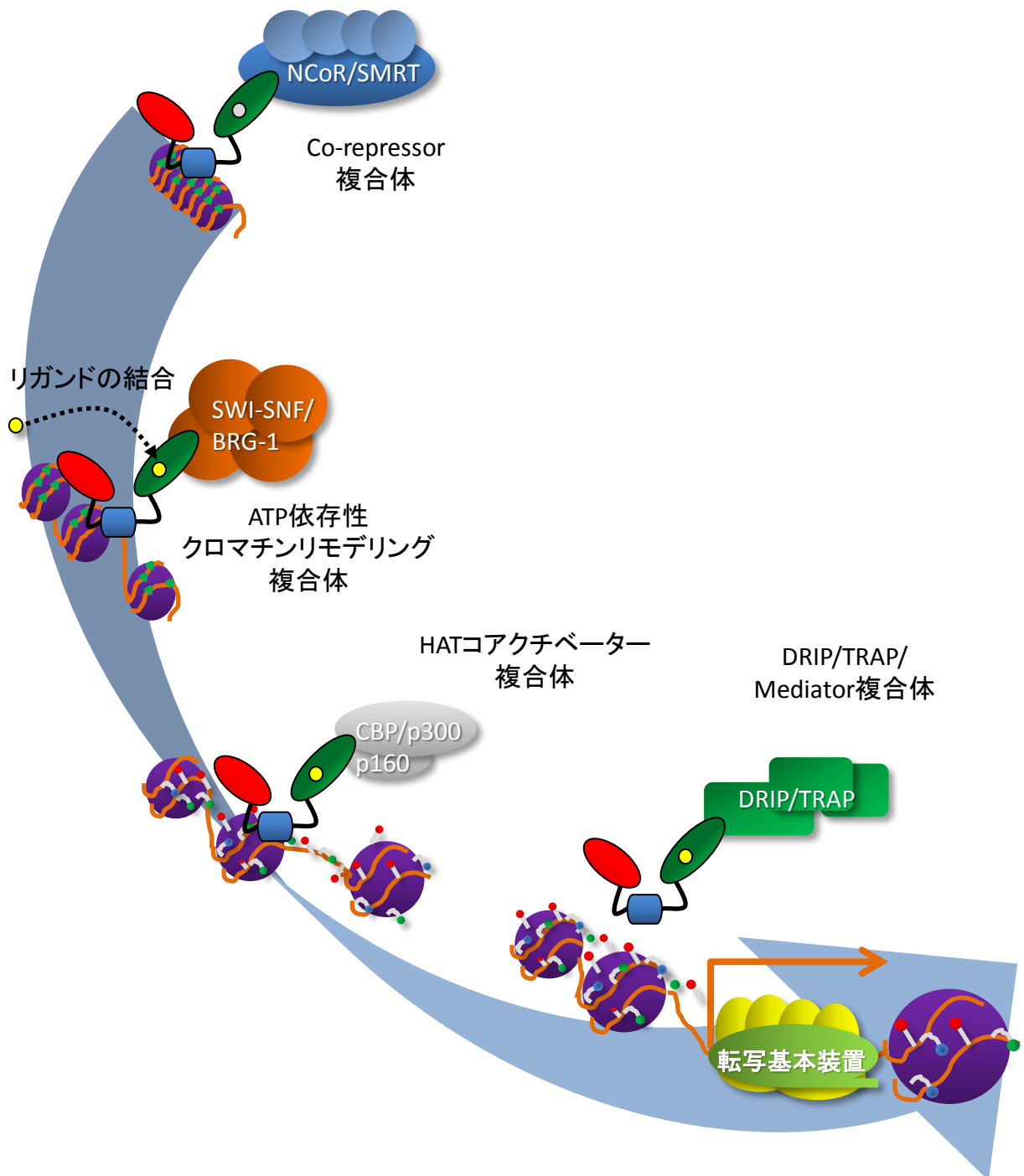


Fig. 4-3 クロマチン構造変化を介したERの転写制御

ERを介する遺伝子転写活性は、動員される転写共役因子群によるクロマチン構造変化によってもたらされる。

HDAC活性によりCo-repressor複合体はクロマチン構造が閉じられている。リガンドが結合することにより、ATP依存性クロマチンリモデリング複合体が動員され、クロマチン構造が緩まる。さらにCBP/p300およびp160ファミリーを含むHATコアクチベーター複合体がヒストンを化学修飾してDNAを解き、DNA上にDRIP/TRAP/Mediator複合体が基本転写装置をリクルートし転写が開始する(布施 宏昭, 2005一部改編)。

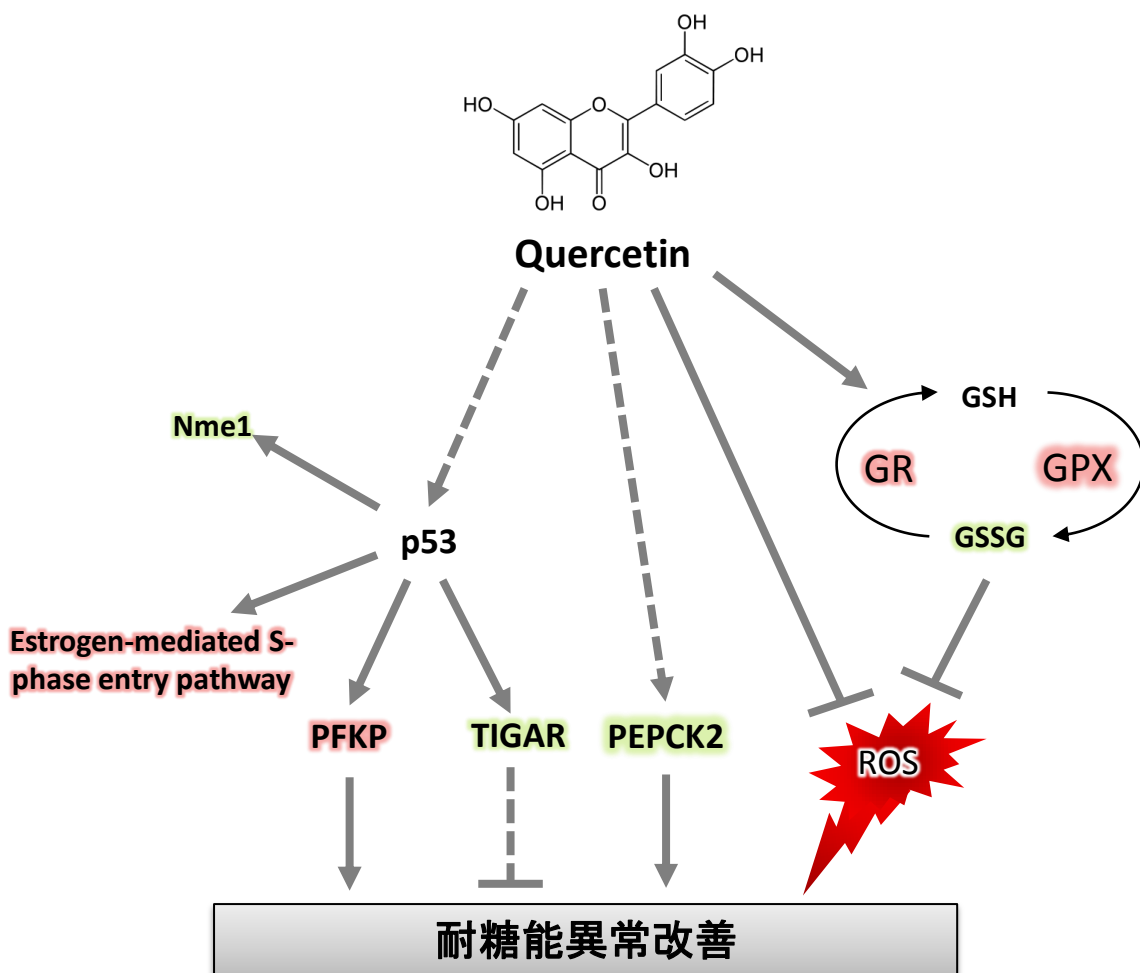


Fig. 4-4 ケルセチンの糖代謝改善効果の作用機構予想図
赤字は増加、緑字は減少を示す。

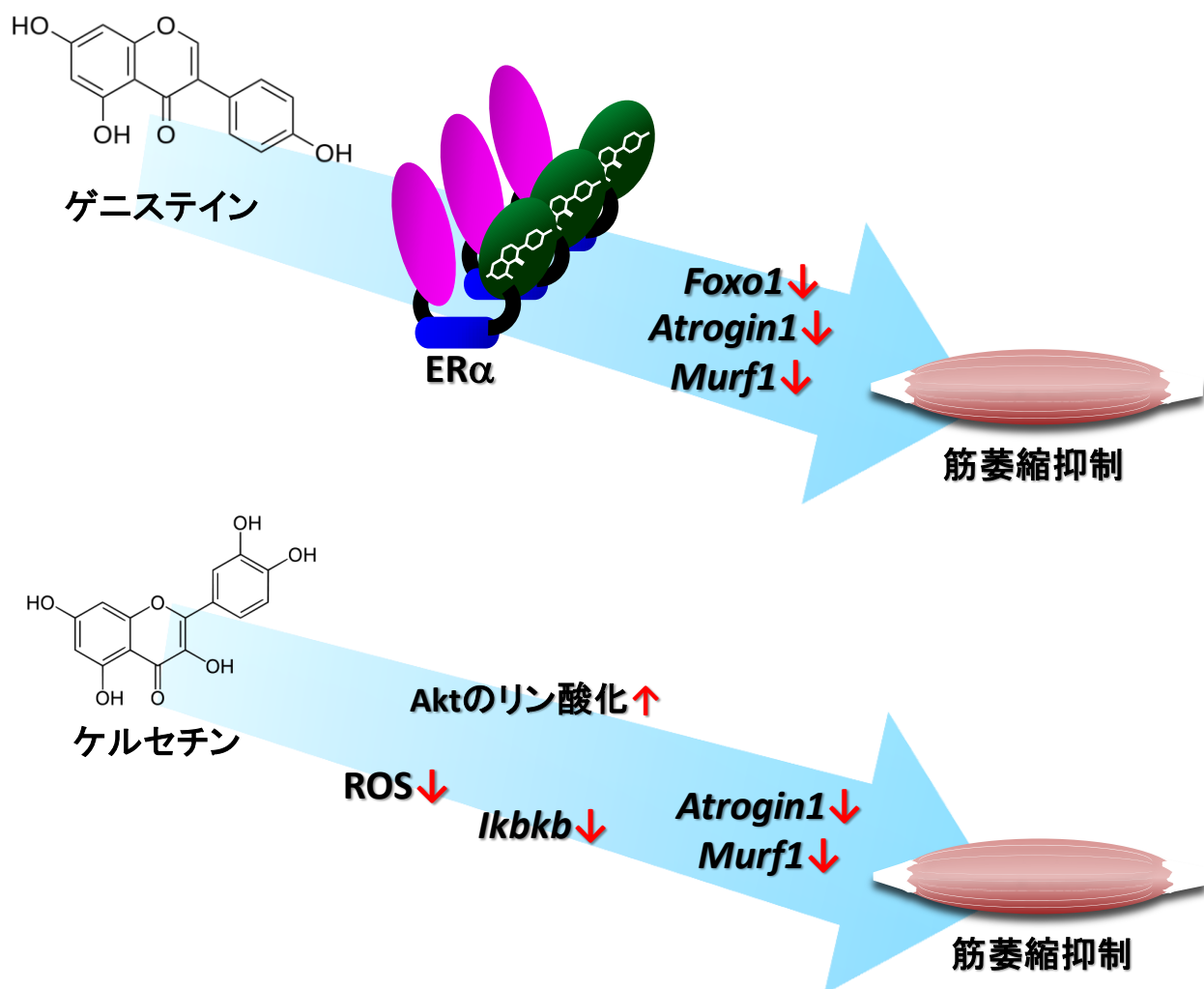


Fig. 4-5 ゲニステインおよびケルセチンの抗筋萎縮効果の作用機構予想図

- Abel, D. (2004). Evaluation of Mitochondrial Function. Animal Models of Diabetic COMplications Consortium *Version 1*.
- Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., and Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *The American journal of clinical nutrition* *54*, 1093-1100.
- Ae Park, S., Choi, M.S., Cho, S.Y., Seo, J.S., Jung, U.J., Kim, M.J., Sung, M.K., Park, Y.B., and Lee, M.K. (2006). Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life sciences* *79*, 1207-1213.
- Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J., and Ha, T. (2008). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* *373*, 545-549.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., and Williams, J.K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition* *68*, 1390S-1393S.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., and Kinae, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of nutrition* *130*, 2243-2250.
- Aviram, M., and Fuhrman, B. (2002). Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* *957*, 146-161.
- Balkan, J., Kanbagli, O., Hatipoglu, A., Kucuk, M., Cevikbas, U., Aykac-Toker, G., and Uysal, M. (2002). Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* *66*, 1755-1758.
- Barros, R.P., and Gustafsson, J.A. (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell metabolism* *14*, 289-299.
- Barton, E.R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H.L. (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *The Journal of cell biology* *157*, 137-148.
- Beale, E., Andreone, T., Koch, S., Granner, M., and Granner, D. (1984). Insulin and glucagon regulate cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA in rat liver. *Diabetes* *33*, 328-332.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* *126*, 107-120.
- Bentsath, A., Rusznyak, S., and Gyorgyi, A.S. (1936). Vitamin nature of flavones. *Nature* *138*, 798-798.
- Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* *2*, 624-627.
- Birkenkamp, K.U., and Coffey, P.J. (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochemical Society transactions* *31*, 292-297.
- Bloch-Damti, A., and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* *7*, 1553-1567.

- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., *et al.* (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* *294*, 1704-1708.
- Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., and Bastin, J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular aspects of medicine* *25*, 495-520.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology* *186*, 343-355.
- Bosanac, I., Phu, L., Pan, B., Zilberleyb, I., Maurer, B., Dixit, V.M., Hymowitz, S.G., and Kirkpatrick, D.S. (2011). Modulation of K11-linkage formation by variable loop residues within UbcH5A. *Journal of molecular biology* *408*, 420-431.
- Brocca, L., Pellegrino, M.A., Desaphy, J.F., Pierno, S., Camerino, D.C., and Bottinelli, R. (2010). Is oxidative stress a cause or consequence of disuse muscle atrophy in mice? A proteomic approach in hindlimb-unloaded mice. *Experimental physiology* *95*, 331-350.
- Brown, M., Ning, J., Ferreira, J.A., Bogener, J.L., and Lubahn, D.B. (2009). Estrogen receptor- α and - β and aromatase knockout effects on lower limb muscle mass and contractile function in female mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *296*, E854-861.
- Brown, M.D., Cotter, M.A., Hudlicka, O., and Vrbova, G. (1976). The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *361*, 241-250.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Jr., Melendez, P.A., Oh, B.C., Lidov, H.G., Hasselgren, P.O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., *et al.* (2004). IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* *119*, 285-298.
- Chen, S.L., Wu, Y.S., Shieh, H.Y., Yen, C.C., Shen, J.J., and Lin, K.H. (2003). P53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. *Molecular carcinogenesis* *36*, 204-214.
- Cheng, C.L., and de Groat, W.C. (2013). Effects of agonists for estrogen receptor α and β on ovariectomy-induced lower urinary tract dysfunction in the rat. *American journal of physiology Renal physiology*.
- Chirumbolo, S. (2010). The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflammation & allergy drug targets* *9*, 263-285.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., and Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS letters* *468*, 166-170.
- de Boer, V.C., Dihal, A.A., van der Woude, H., Arts, I.C., Wolffram, S., Alink, G.M., Rietjens, I.M., Keijer, J., and Hollman, P.C. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of nutrition* *135*, 1718-1725.
- DehORITY, W., Halloran, B.P., Bikle, D.D., Curren, T., Kostenuik, P.J., Wronski, T.J., Shen, Y., Rabkin, B., Bouraoui, A., and Morey-Holton, E. (1999). Bone and hormonal changes induced by skeletal unloading in the mature male rat. *The American journal of physiology* *276*, E62-69.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215-221.
- Duarte, J., Perez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M.A., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., and

- Tamargo, J. (2001). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology* *133*, 117-124.
- Emamian, E.S. (2012). AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience* *5*, 33.
 - Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C.Y., Coffey, P.J., and Demoulin, J.B. (2009). The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *The Journal of biological chemistry* *284*, 10334-10342.
 - Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* *226*, 497-509.
 - Foulds, C.E., Feng, Q., Ding, C., Bailey, S., Hunsaker, T.L., Malovannaya, A., Hamilton, R.A., Gates, L.A., Zhang, Z., Li, C., *et al.* (2013). Proteomic analysis of coregulators bound to ERalpha on DNA and nucleosomes reveals coregulator dynamics. *Molecular cell* *51*, 185-199.
 - Fuse, H., Korenaga, S., Sakari, M., Hiyaama, T., Ito, T., Kimura, K., and Kato, S. (2007). Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression. *The Prostate* *67*, 630-637.
 - Galati, G., and O'Brien, P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free radical biology & medicine* *37*, 287-303.
 - Galleano, M., Calabro, V., Prince, P.D., Litterio, M.C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M.A., Miatello, R.M., Oteiza, P.I., and Fraga, C.G. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1259*, 87-94.
 - Galluzzo, P., Rastelli, C., Bulzomi, P., Acconcia, F., Pallottini, V., and Marino, M. (2009). 17beta-Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER-alpha-mediated signals. *American journal of physiology Cell physiology* *297*, C1249-1262.
 - Glass, D.J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in molecular medicine* *9*, 344-350.
 - Glass, D.J. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* *346*, 267-278.
 - Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., and Goldberg, A.L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 14440-14445.
 - Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrase, G., Waterfield, M., and Chambon, P. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *Journal of steroid biochemistry* *24*, 77-83.
 - Gu, L., House, S.E., Prior, R.L., Fang, N., Ronis, M.J., Clarkson, T.B., Wilson, M.E., and Badger, T.M. (2006). Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women. *The Journal of nutrition* *136*, 1215-1221.
 - Ha, B.G., Nagaoka, M., Yonezawa, T., Tanabe, R., Woo, J.T., Kato, H., Chung, U.I., and Yagasaki, K. (2012). Regulatory mechanism for the stimulatory action of genistein on glucose uptake in vitro and in vivo. *The Journal of nutritional biochemistry* *23*, 501-509.
 - Hemdan, D.I., Hirasaka, K., Nakao, R., Kohno, S., Kagawa, S., Abe, T., Harada-Sukeno, A., Okumura, Y., Nakaya, Y., Terao, J., *et al.* (2009). Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes. *The journal of medical*

investigation : JMI 56, 26-32.

- Hermanson, O., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 13, 55-60.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutrition and cancer 20, 21-29.
- Holder, C.L., Churchwell, M.I., and Doerge, D.R. (1999). Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. Journal of agricultural and food chemistry 47, 3764-3770.
- Hollman, P.C., and Katan, M.B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. Archives of toxicology Supplement = Archiv fur Toxikologie Supplement 20, 237-248.
- Ingley, E. (2012). Integrating novel signaling pathways involved in erythropoiesis. IUBMB life 64, 402-410.
- Ishimi, Y., Arai, N., Wang, X., Wu, J., Umegaki, K., Miyaura, C., Takeda, A., and Ikegami, S. (2000). Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochemical and biophysical research communications 274, 697-701.
- Ito, N., Ruegg, U.T., Kudo, A., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2013). Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. Nature medicine 19, 101-106.
- Izzotti, A., Cartiglia, C., Longobardi, M., Bagnasco, M., Merello, A., You, M., Lubet, R.A., and De Flora, S. (2004). Gene expression in the lung of p53 mutant mice exposed to cigarette smoke. Cancer research 64, 8566-8572.
- Jackson, J.R., Ryan, M.J., and Alway, S.E. (2011). Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 66, 751-764.
- Jagoe, R.T., and Goldberg, A.L. (2001). What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 4, 183-190.
- Jalili, T., Carlstrom, J., Kim, S., Freeman, D., Jin, H., Wu, T.C., Litwin, S.E., and David Symons, J. (2006). Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. Journal of cardiovascular pharmacology 47, 531-541.
- Janke, R., Genzel, Y., Wahl, A., and Reichl, U. (2010). Measurement of key metabolic enzyme activities in mammalian cells using rapid and sensitive microplate-based assays. Biotechnology and bioengineering 107, 566-581.
- Jeong, S.M., Kang, M.J., Choi, H.N., Kim, J.H., and Kim, J.I. (2012). Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. Nutrition research and practice 6, 201-207.
- Jung, C.H., Cho, I., Ahn, J., Jeon, T.I., and Ha, T.Y. (2013). Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. Phytotherapy research : PTR 27, 139-143.
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., et al. (2004). Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes,

- and impaired glycemic control. *The Journal of biological chemistry* *279*, 41114-41123.
- Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., and Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environmental health perspectives* *111*, 1530-1549.
 - Kappler, R., Bauer, R., Calzada-Wack, J., Rosemann, M., Hemmerlein, B., and Hahn, H. (2004). Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma. *Oncogene* *23*, 8785-8795.
 - Katzenellenbogen, J.A., O'Malley, B.W., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Molecular endocrinology* *10*, 119-131.
 - Keppens, S. (1995). Effect of genistein on both basal and glucagon-induced levels of cAMP in rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology* *50*, 1303-1304.
 - Knight, D.C., and Eden, J.A. (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstetrics and gynecology* *87*, 897-904.
 - Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., and Oike, H. (2011). Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Molecular nutrition & food research* *55*, 530-540.
 - Koh, A., Lee, M.N., Yang, Y.R., Jeong, H., Ghim, J., Noh, J., Kim, J., Ryu, D., Park, S., Song, P., *et al.* (2013). C1-Ten is a protein tyrosine phosphatase of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), regulating IRS-1 stability and muscle atrophy. *Molecular and cellular biology* *33*, 1608-1620.
 - Korach, K.S. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* *266*, 1524-1527.
 - Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15677-15682.
 - Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* *138*, 863-870.
 - Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 5925-5930.
 - Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* *139*, 4252-4263.
 - Kunkel, S.D., Suneja, M., Ebert, S.M., Bongers, K.S., Fox, D.K., Malmberg, S.E., Alipour, F., Shields, R.K., and Adams, C.M. (2011). mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell metabolism* *13*, 627-638.
 - Lawler, J.M., Song, W., and Demaree, S.R. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free radical biology & medicine* *35*, 9-16.
 - Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (1999). Muscle protein breakdown

- and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *The Journal of nutrition* *129*, 227S-237S.
- Lee, J.W., Cheong, J.H., Lee, Y.C., Na, S.Y., and Lee, S.K. (2000). Dissecting the molecular mechanism of nuclear receptor action: transcription coactivators and corepressors. *Experimental & molecular medicine* *32*, 53-60.
 - Lopes, J.P., Oliveira, S.M., and Soares Fortunato, J. (2008). [Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications]. *Acta medica portuguesa* *21*, 293-302.
 - Lu, M.P., Wang, R., Song, X., Chibbar, R., Wang, X., Wu, L., and Meng, Q.H. (2008). Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition research* *28*, 464-471.
 - Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 11162-11166.
 - MacLachlan, T.K., Somasundaram, K., Sgagias, M., Shifman, Y., Muschel, R.J., Cowan, K.H., and El-Deiry, W.S. (2000). BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *The Journal of biological chemistry* *275*, 2777-2785.
 - Malcovati, M., and Valentini, G. (1982). AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods in enzymology* *90 Pt E*, 170-179.
 - Mandel, S.A., Weinreb, O., Amit, T., and Youdim, M.B. (2012). Molecular mechanisms of the neuroprotective/neurorescue action of multi-target green tea polyphenols. *Frontiers in bioscience* *4*, 581-598.
 - Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., *et al.* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* *83*, 835-839.
 - Markham, Ø.M.A.a.K.R. (2005). FLAVONOIDS. *Chemistry, Biochemistry and Applications*.
 - Masotti, A., Da Sacco, L., Bottazzo, G.F., and Alisi, A. (2010). Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. *Critical reviews in food science and nutrition* *50*, 693-698.
 - McCarty, M.F. (2006). Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Medical hypotheses* *66*, 1093-1114.
 - McClung, J.M., Davis, J.M., Wilson, M.A., Goldsmith, E.C., and Carson, J.A. (2006). Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *Journal of applied physiology* *100*, 2012-2023.
 - McDonnell, D.P. (1999). The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *10*, 301-311.
 - Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickancaite, E., and Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free radical biology & medicine* *26*, 107-116.
 - Mezei, O., Banz, W.J., Steger, R.W., Peluso, M.R., Winters, T.A., and Shay, N. (2003). Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *The Journal of nutrition* *133*, 1238-1243.
 - Mezei, O., Li, Y., Mullen, E., Ross-Viola, J.S., and Shay, N.F. (2006). Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via PPARalpha-dependent and -independent

mechanisms. *Physiological genomics* 26, 8-14.

- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., *et al.* (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature medicine* 15, 1082-1087.
- Miodini, P., Fioravanti, L., Di Fronzo, G., and Cappelletti, V. (1999). The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *British journal of cancer* 80, 1150-1155.
- Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y., and Tomita, I. (1995). Effects of various natural antioxidants on the Cu(2+)-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biological & pharmaceutical bulletin* 18, 1-4.
- Moeller, L.C., Dumitrescu, A.M., and Refetoff, S. (2005). Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Molecular endocrinology* 19, 2955-2963.
- Moon, J., Do, H.J., Kim, O.Y., and Shin, M.J. (2013). Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 58, 347-354.
- Moon, J.H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T., and Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279, R461-467.
- Mukai, R., Horikawa, H., Fujikura, Y., Kawamura, T., Nemoto, H., Nikawa, T., and Terao, J. (2012). Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice. *PloS one* 7, e45048.
- Mukai, R., Nakao, R., Yamamoto, H., Nikawa, T., Takeda, E., and Terao, J. (2010). Quercetin Prevents Unloading-Derived Disused Muscle Atrophy by Attenuating the Induction of Ubiquitin Ligases in Tail-Suspension Mice. *Journal of natural products*.
- Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 293, R1159-1168.
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., and Adlercreutz, H. (2003). Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition reviews* 61, 1-33.
- Murakami, A., Ashida, H., and Terao, J. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer letters* 269, 315-325.
- Murota, K., Hotta, A., Ido, H., Kawai, Y., Moon, J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T., and Terao, J. (2007). Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *The journal of medical investigation : JMI* 54, 370-374.
- Murota, K., and Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* 417, 12-17.
- Murota, K., and Terao, J. (2005). Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS letters* 579, 5343-5346.
- Nagata, C., Shimizu, H., Takami, R., Hayashi, M., Takeda, N., and Yasuda, K. (2002). Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral

density in postmenopausal Japanese women. *Osteoporosis international* : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA *13*, 200-204.

- Naik, H.R., Lehr, J.E., and Pienta, K.J. (1994). An in vitro and in vivo study of antitumor effects of genistein on hormone refractory prostate cancer. *Anticancer research* *14*, 2617-2619.
- Nakajima, Y., Akaogi, K., Suzuki, T., Osakabe, A., Yamaguchi, C., Sunahara, N., Ishida, J., Kako, K., Ogawa, S., Fujimura, T., *et al.* (2011). Estrogen regulates tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factors ERbeta and KLF5. *Science signaling* *4*, ra22.
- Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K.M., *et al.* (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Molecular and cellular biology* *29*, 4798-4811.
- Nakasa, T., Okinaka, O., and Matsumoto, H. (1979). Effects of Dietary Vitamin B₆-deficiency on Rat Liver Enzymes Involved in Carbohydrate Metabolism and Fatty Acid Synthesis. *ビタミン* *53*, 447-454.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* *108*, 475-487.
- Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (1992). Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free radical biology & medicine* *12*, 101-106.
- Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., and Porter, J.W. (1975). Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods in enzymology* *35*, 37-44.
- Nguyen, B.T., Kararigas, G., Wuttke, W., and Jarry, H. (2012). Long-term treatment of ovariectomized mice with estradiol or phytoestrogens as a new model to study the role of estrogenic substances in the heart. *Planta medica* *78*, 6-11.
- Nikolic, I., Liu, D., Bell, J.A., Collins, J., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2007). Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. *Journal of molecular and cellular cardiology* *42*, 769-780.
- Nyman, L.R., Cox, K.B., Hoppel, C.L., Kerner, J., Barnoski, B.L., Hamm, D.A., Tian, L., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Molecular genetics and metabolism* *86*, 179-187.
- Ogawa, M., Kariya, Y., Kitakaze, T., Yamaji, R., Harada, N., Sakamoto, T., Hosotani, K., Nakano, Y., and Inui, H. (2013). The preventive effect of beta-carotene on denervation-induced soleus muscle atrophy in mice. *The British journal of nutrition* *109*, 1349-1358.
- Ogawa, M., Yamaji, R., Higashimura, Y., Harada, N., Ashida, H., Nakano, Y., and Inui, H. (2011). 17beta-estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor alpha. *The Journal of biological chemistry* *286*, 41455-41465.
- Perez, A., Ojeda, P., Ojeda, L., Salas, M., Rivas, C.I., Vera, J.C., and Reyes, A.M. (2011). Hexose transporter GLUT1 harbors several distinct regulatory binding sites for flavones and tyrphostins. *Biochemistry* *50*, 8834-8845.
- Peterson, G., and Barnes, S. (1991). Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochemical and biophysical research communications* *179*, 661-667.

- Philipp-Staheli, J., Kim, K.H., Liggitt, D., Gurley, K.E., Longton, G., and Kemp, C.J. (2004). Distinct roles for p53, p27Kip1, and p21Cip1 during tumor development. *Oncogene* *23*, 905-913.
- Pilkis, S.J. (1975). Glucokinase of rat liver. *Methods in enzymology* *42*, 31-39.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W., Jr. (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition* *68*, 1375S-1379S.
- Pratt, D.E., and Birac, P.M. (1979). Source of Antioxidant Activity of Soybeans and Soy Products. *J Food Sci* *44*, 1720-1722.
- Pumford, S.L., Morton, M.M., Turkes, A., and Griffiths, K. (2002). Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Annals of clinical biochemistry* *39*, 281-292.
- Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C. (2010). Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1alpha. *Biochemical and biophysical research communications* *403*, 473-478.
- Radewicz, T.A., 2nd, Edwards, J.L., and Katula, K.S. (2010). Effects of various polyphenolics on hydrogen peroxide-induced p53 activity in NIH3T3 cells. *Journal of medicinal food* *13*, 123-130.
- Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry* *18*, 427-442.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., and Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research* *22*, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology & medicine* *20*, 933-956.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Taylor, J.A., and Lubahn, D.B. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Hormones and behavior* *31*, 232-243.
- Robyr, D., Wolffe, A.P., and Wahli, W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Molecular endocrinology* *14*, 329-347.
- Rodrigo, R., Gil, D., Miranda-Merchak, A., and Kalantzis, G. (2012). Antihypertensive role of polyphenols. *Advances in clinical chemistry* *58*, 225-254.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G., and Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *The British journal of nutrition* *89 Suppl 1*, S45-58.
- Rufer, C.E., and Kulling, S.E. (2006). Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *Journal of agricultural and food chemistry* *54*, 2926-2931.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* *148*, 852-871.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* *117*, 399-412.
- Schuur, E.R., Loktev, A.V., Sharma, M., Sun, Z., Roth, R.A., and Weigel, R.J. (2001). Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead

- transcription factor family. *The Journal of biological chemistry* *276*, 33554-33560.
- Servais, S., Letexier, D., Favier, R., Duchamp, C., and Desplanches, D. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free radical biology & medicine* *42*, 627-635.
 - Severson, R.K., Nomura, A.M., Grove, J.S., and Stemmermann, G.N. (1989). A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer research* *49*, 1857-1860.
 - Sheen, J.H., and Dickson, R.B. (2002). Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Molecular and cellular biology* *22*, 1819-1833.
 - Shen, P., Liu, M.H., Ng, T.Y., Chan, Y.H., and Yong, E.L. (2006). Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro. *The Journal of nutrition* *136*, 899-905.
 - Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* *95*, 927-937.
 - Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ito, N., Maruyama, T., Suzuki, Y., Takeda, S., Nakae, J., Tagata, Y., Nishitani, S., Takehana, K., *et al.* (2011). Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell metabolism* *13*, 170-182.
 - Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T., and Kinane, N. (2001). Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *29*, 1521-1524.
 - Skottova, N., Kazdova, L., Oliynyk, O., Vecera, R., Sobolova, L., and Ulrichova, J. (2004). Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* *50*, 123-130.
 - Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* *9*, 59-71.
 - Svensson, J., Moverare-Skrtic, S., Windahl, S., Swanson, C., and Sjogren, K. (2010). Stimulation of both estrogen and androgen receptors maintains skeletal muscle mass in gonadectomized male mice but mainly via different pathways. *Journal of molecular endocrinology* *45*, 45-57.
 - Terao, J. (2009). Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum of nutrition* *61*, 87-94.
 - Terao, J., Kawai, Y., and Murota, K. (2008). Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* *17 Suppl 1*, 291-293.
 - Tintignac, L.A., Lagirand, J., Battonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* *280*, 2847-2856.
 - Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., *et al.* (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* *415*, 45-53.
 - Vandenburgh, H.H., Karlisch, P., Shansky, J., and Feldstein, R. (1991). Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *The American journal of physiology* *260*, C475-484.

- Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K.H., Zierau, O., and Diel, P. (2012). Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 1909-1920.
- Velders, M., Solzbacher, M., Schleipen, B., Laudénbach, U., Fritzemeier, K.H., and Diel, P. (2010). Estradiol and genistein antagonize the ovariectomy effects on skeletal muscle myosin heavy chain expression via ER-beta mediated pathways. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 120, 53-59.
- Veloso, D., and Veech, R.L. (1975). Enzymatic determination of long-chain fatty acyl-CoA. *Methods in enzymology* 35, 273-278.
- Vessal, M., Hemmati, M., and Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP* 135C, 357-364.
- Wakeling, A.E., Dukes, M., and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer research* 51, 3867-3873.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., and Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of nutrition* 135, 48-52.
- Wang, H., Zhou, C.L., Lei, H., and Wei, Q. (2010). Inhibition of calcineurin by quercetin in vitro and in Jurkat cells. *Journal of biochemistry* 147, 185-190.
- West, I.C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 17, 171-180.
- Wiik, A., Ekman, M., Johansson, O., Jansson, E., and Esbjornsson, M. (2009). Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochemistry and cell biology* 131, 181-189.
- Wilkinson, A.P., Gee, J.M., Dupont, M.S., Needs, P.W., Mellon, F.A., Williamson, G., and Johnson, I.T. (2003). Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro. *Xenobiotica: the fate of foreign compounds in biological systems* 33, 255-264.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* 36, 838-849.
- Wu, J., Oka, J., Tabata, I., Higuchi, M., Toda, T., Fuku, N., Ezaki, J., Sugiyama, F., Uchiyama, S., Yamada, K., *et al.* (2006). Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21, 780-789.
- Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development* 9, 140-147.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., *et al.* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.
- Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2004). Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free radical biology & medicine* 37, 1683-1693.

- Youdim, K.A., Spencer, J.P., Schroeter, H., and Rice-Evans, C. (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biological chemistry* 383, 503-519.
- Zawacka-Pankau, J., Grinkevich, V.V., Hunten, S., Nikulenkov, F., Gluch, A., Li, H., Enge, M., Kel, A., and Selivanova, G. (2011). Inhibition of glycolytic enzymes mediated by pharmacologically activated p53: targeting Warburg effect to fight cancer. *The Journal of biological chemistry* 286, 41600-41615.
- Zhou, M., Wang, S., Zhao, A., Wang, K., Fan, Z., Yang, H., Liao, W., Bao, S., Zhao, L., Zhang, Y., *et al.* (2012). Transcriptomic and metabonomic profiling reveal synergistic effects of quercetin and resveratrol supplementation in high fat diet fed mice. *Journal of proteome research* 11, 4961-4971.
- 末安, 俊. (2011). ゲニステインの糖尿病予防効果に関する研究. 平成23年度 修士論文.
- 布施, 宏. (2005). 核内ステロイド受容体の転写制御機構に関する研究. 平成17年度 博士論文.

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 23 年度博士課程 入学
氏 名 青山 晋也
指導教員名 加藤 久典

論文題目

生活習慣病と筋萎縮に対するフラボノイドの予防機能およびその作用機構に関する研究

近年の食生活の乱れや運動不足、高齢化に伴い、生活習慣病（メタボリックシンドローム）や運動器の障害（ロコモティブシンドローム）が急増している。これらは認知症とともに、「健康寿命の短縮」、「寝たきりや要介護状態」の三大要因であり、その予防・改善は超高齢化社会を迎えた我が国において最重要課題といえる。機能性食品は食物に含まれる有効成分を意識して摂取することにより健康増進を目指すものであり、高齢者の健康増進への期待は大きい。植物の二次代謝産物であるフラボノイドには生理活性を有するものが多く、生活習慣病に対する健康効果について数多く研究されている。しかし、その詳細かつ広範な生理応答および作用機構、また運動器の障害に対する効果については十分に解明されていない。そこで、本研究では特に高齢者の健康に着目し、フラボノイドの生活習慣病および運動器の障害のひとつとして筋萎縮に及ぼす影響とその作用機構を解析した。

第 1 章 フラボノイドが生活習慣病モデル動物に与える影響

高脂肪食モデルおよび西洋型食モデル（高脂肪・高コレステロール・高スクロースといった多因子により代謝異常を引き起こす餌）を用いて、フラボノイド摂取が生活習慣病モデル動物の代謝異常に及ぼす影響およびその生理応答について検討を行った。

フラボノイド摂取が高脂肪食誘導性代謝異常に及ぼす影響

8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに通常食（10% kcal fat）、高脂肪食（45% kcal fat）および高脂肪食に各種フラボノイド（0.05%ゲニステイン、0.05%ダイゼイン、0.1%ケルセチン）を添加したものをそれぞれ給餌し 20 週間飼育した。20 週間の高脂肪食摂取は、通常食に比べ肥満および耐糖能異常（糖負荷試験）、インスリン抵抗性（インスリン負荷試験）、高コレステロール血症、脂質過酸化（TBARS）を指標とした際の酸化ストレスの誘導等が認められた。フラボノイドを添加した高脂肪食摂取は、血清 TBARS を有意に減少させ、フラボノイドによる抗酸化作用が認められた。またケルセチンは、肝臓中 TBARS も有意に低下させた。高脂肪食摂取により誘導された酸化ストレスは炎症を引き起こし、代謝疾患を増悪化することが報告されているが、肥満や糖代謝・脂質代謝に関しては、フラボノイドによる顕著な効果は認められなかった。したがって、フラボノイドの摂取は高脂肪食摂取による酸化ストレスの増加に対して抑制作用を示すが、糖・脂質代謝異常に対する作用は弱いことが明らかとなった。

ケルセチン摂取が西洋型食誘導性代謝異常に及ぼす影響

8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに通常食（AIN-93G）、西洋型食（40% kcal fat、0.15%コレステロール、34%スクロース）およびケルセチンを 0.1%添加した西洋型食を給餌し、8 週間飼育した。ケルセチンの摂取は、西洋型食による糖負荷およびピルビン酸負荷後の血糖値上昇を有意に抑制し、耐糖能異常改善や糖新生亢進抑制作用を示した。DNA マイクロアレイによる肝臓での網羅的遺伝子発現解析により、ケルセチン摂取は解糖系律速酵素（*Pfkfb*）の発現を増加させ、糖新生律速酵素（*Pck2*）の発現を低下させることが明らかとなり、解糖系亢進および糖新生抑制作用が示唆された。Ingenuity Pathway Analysis を用いて、西洋型食およびケルセチン摂取により顕著に変動したパスウェイを抽出した結果、Estrogen-mediated S-phase entry pathway が挙げられた。このパスウェイに含まれる遺伝子群は西洋型食摂取により発現減少していたのに対し、ケルセチンの摂取によりほぼすべての発現が増加した。また、西洋型食摂取により最も発現増加を示した *Nme1* はケルセチン摂取により抑制されていた。これら遺伝子の発現は p53 により調節されていることが知られており、西洋型食摂取およびケルセチン摂取は p53 を介して多くの遺伝子発現を制御していることが考えられた。一方、メタボローム解析の結果より、ケルセチンの摂取はグ

グルタチオン代謝を活性化する傾向にあることが明らかとなった。グルタチオンは抗酸化ペプチドであり、耐糖能異常改善作用も報告されている。以上の結果より、ケルセチンの摂取は西洋型食による耐糖能異常や糖新生亢進を改善し、その作用機構として p53 の活性変動および抗酸化作用を介していることが考えられた。

第2章 フラボノイドが筋萎縮モデル動物に与える影響

ゲニステインおよびケルセチン摂取が筋萎縮に及ぼす影響について、坐骨神経切除による廃用性筋萎縮モデルを用いて検討を行った。

10 週齢雄性 Wistar ラットを通常食群、0.05%ゲニステイン添加食群および 0.1%ケルセチン添加食群に分け、24 日間飼育した。14 日目に片肢の坐骨神経を切除し、筋萎縮を誘導した。もう片方の肢には偽手術を施した。筋萎縮は偽手術肢に対する神経切除肢の筋重量比で評価した。ゲニステインおよびケルセチンの摂取は坐骨神経切除によるヒラメ筋の萎縮を有意に抑制した。また、筋萎縮時に誘導されるユビキチンリガーゼである *Atrogin1* や *Murf1* の遺伝子発現もゲニステインおよびケルセチン摂取により抑制された。これら 2 つの遺伝子発現誘導を制御する因子を萎縮ヒラメ筋での網羅的遺伝子発現解析により探索した結果、ゲニステインでは *Foxo1* が候補因子として挙げられた。また、ゲニステイン摂取によりエストロゲン受容体 (ER) の標的遺伝子が多数変動していた。筋萎縮の誘導によりエストロゲン受容体 α (ER α) は発現上昇を、ER β は発現減少を示すことが明らかとなり、萎縮筋においてゲニステインのエストロゲン受容体への結合能の変化が筋萎縮抑制作用に働いていることが示唆された。一方、ケルセチンの摂取により、*Atrogin1* および *Murf1* の制御因子である *Ikkbb* (IKK β) の発現抑制や Akt のリン酸化亢進がみられた。また、IKK β は酸化ストレスにより活性化され、筋萎縮の発症に関与することが明らかとなっているが、ケルセチンの摂取は血中 TBARS 濃度を減少させ、酸化ストレスの軽減が認められた。したがってケルセチン摂取は *Ikkbb* の発現抑制や Akt のリン酸化、抗酸化作用を介して筋萎縮抑制作用を示していることが示唆された。

第3章 ゲニステイン摂取による筋萎縮予防効果の作用機構解析

第2章の結果より、ゲニステイン摂取が萎縮筋でのエストロゲン受容体の標的遺伝子を多く変動させていることが明らかとなった。そこで、ゲニステインの筋萎縮抑制作用へのエストロゲン受容体の関与について、Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM) を用いて検討した。

最初に、ゲニステインの筋萎縮抑制作用がエストロゲン受容体アンタゴニスト (ICI 182, 780) 存在下で消失するかの検討を行った。10 週齢雄性 C57BL/6J マウスに ER アンタゴニスト (1 mg/kg b.w./day) を浸透圧ミニポンプにより皮下投与し、第 2 章と同様に 24 日間飼育した。アンタゴニスト存在下では坐骨神経切除によるヒラメ筋萎縮の抑制作用は消失し、*Atrogin1* や *Murf1* の発現誘導抑制作用も消失した。このことからゲニステインによる筋萎縮抑制作用にはエストロゲン受容体が関与していることが示された。次に、筋萎縮に関与しているエストロゲン受容体アイソフォームについて検討を行うため、10 週齢雄性 C57BL/6J マウスに SERM を浸透圧ミニポンプにより皮下投与した。3 日後、坐骨神経切除により 10 日間筋萎縮を誘導した。ER α アゴニスト (PPT; 1 mg/kg b.w./day) の投与は坐骨神経切除による筋萎縮を抑制し、*Atrogin1* や *Murf1*、*Foxo1* の遺伝子発現の誘導を抑制した。一方 ER β アゴニスト (DPN; 1 mg/kg b.w./day) の投与は筋萎縮を抑制しなかった。以上の結果より、ゲニステインは ER α を介して筋萎縮を予防していることが明らかになった。

総括

本研究では、高齢者の健康の主要な阻害因子である生活習慣病および運動器の障害に着目し、フラボノイドの予防効果、その作用機構の解析を行った。

生活習慣病に対する作用に関しては、ケルセチンは西洋型食摂取による糖代謝異常を改善し、解糖系および糖新生律速酵素の発現変動や抗酸化作用の関与が考えられた。一方、網羅的遺伝子発現解析により Estrogen-mediated S-phase entry pathway 関連因子や *Nme1* の遺伝子発現は西洋型食およびケルセチン摂取により著しく変動し、西洋型食による作用をケルセチンが強く打ち消した因子であった。今後、ケルセチン摂取によるこれらの因子の制御機構およびその生理作用への関与についての検討が期待される。

運動器の障害に関しては、フラボノイドの新たな機能として、ゲニステインおよびケルセチン摂取による廃用性筋萎縮抑制作用が明らかとなった。ゲニステインはその作用機構として ER α を介しており、ケルセチンは抗酸化作用が関与していることが示唆された。今後、ゲニステイン摂取によるエストロゲン受容体を介した制御機構、またケルセチン摂取により変動の認められた因子の筋萎縮抑制作用への関与を明らかにしていく必要がある。

謝辞

本研究は東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」にて行われたものである。私を当研究室に受け入れていただき、多くの御指導、御鞭撻を賜りました当研究室、加藤 久典特任教授に厚く御礼申し上げます。

「食と生命」の現室員および卒業生の皆様には、博士課程から入学した私を快く受け入れて下さり、生活面、研究面において多くの御協力をいただき、感謝致します。特に、DNA マイクロアレイを行うにあたり、多くの適切な助言、ご協力をいただきました中澤京子氏、研究遂行にあたり適切なご助言下さいました賈慧娟氏、斉藤憲司氏、大谷りら氏、解剖において数多くのご協力をいただきました山村淳貴氏、富田景子氏に深謝致します。そして研究室生活を送る上で生活面、精神面共に支えて頂いた当研究室秘書甲斐祐子氏、ロックマン祐紀氏、斉藤君江氏に御礼申し上げます。中澤京子氏、賈慧娟氏、斉藤憲司氏には、博士論文作成に当たりまして、細やかな添削とご助言いただきましたこと、心より感謝申し上げます。

フラボノイドの実験に関して、多くの御指導、御助言、御激励下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命科学専攻 食の安全・安心・健康領域 小林彰子准教授、お茶の水女子大学 寄付研究部門 食と健康 岸本良美准教授に御礼申し上げます。

最後に、支えてくれた家族に心より感謝申し上げます。

2013 年 12 月 青山晋也