

学位論文の要旨

論文題目 Functional analysis of lemon myrtle extract, a novel functional food ingredient that
 activates skeletal muscle satellite cells
 (筋衛星細胞を活性化する新規機能性食品素材レモンマートル抽出物の機能解析)

 広島大学大学院統合生命科学研究科
 生物学プログラム
氏 名 山本 愛弓

緒言

サルコペニアは加齢に伴う骨格筋の萎縮により引き起こされる。サルコペニアを発症すると、転倒や骨折のリスクが増加し、日常生活動作や生活の質が低下することから、健康寿命を延伸するためには、サルコペニアの予防及び改善が重要である。サルコペニアに対する主要な介入法であるレジスタンス運動は、有効性が認められているものの、高負荷による一時的な血圧上昇や傷害のリスクを伴うことから、レジスタンス運動に代わる安全かつ有効な介入法が必要である。運動は、骨格筋に核を供給する「筋衛星細胞の活性化」と骨格筋を構成する「筋タンパク質の合成促進」の両方のメカニズムにより筋肥大を誘導する。一方、筋肥大を目的とした食品成分の探索例は、筋タンパク質の合成促進のみに着目したものが主体であり、筋衛星細胞の活性化を標榜した機能性食品素材についてはほとんど検討されていないのが現状であった。

著者の所属機関における先行研究では筋衛星細胞の活性化を介した筋肥大の可能性に着目し、筋衛星細胞を活性化する食品素材の候補としてレモンマートル (*Backhousia citriodora*) 葉の抽出物が見出されている。本研究では、筋肥大を目的とした新規機能性食品素材としてレモンマートル抽出物を製品化するために、当該抽出物の機能性を明らかにすることを目的とした。第一章では、レモンマートル抽出物の製法を検討すると共に、当該抽出物による筋衛星細胞の活性化能を評価した。第二章では、本抽出物の筋衛星細胞活性化効果を規定する活性本体の探索並びに作用機序の解析を試みた。

第一章 レモンマートル抽出物は *in vitro* 及び *in vivo* で筋衛星細胞を活性化する

様々な植物抽出物において、用いる抽出溶媒がポリフェノール含量やその生物活性に影響することが報告されている。そこで本章では、レモンマートル抽出物の製法の確立に向け、当該抽出物による筋衛星細胞活性化効果を最大化する抽出条件を検討した。抽出溶媒として食品製造に使用可能な水またはエタノールを用い、その混合比を検討した結果、抽出溶媒中のエタノール濃度が40%以下の場合、エタノール濃度の増加に伴う抽出物収量（抽出率）の増加が認められた一方、エタノール濃度が60%以上の場合には同濃度の増加に伴い抽出率が減少した。抽出物中の総ポリフェノール含量も同様の傾向を示し、抽出率と総ポリフェノール含量の間には正の相関を認めた。また、*in vitro* における筋衛星細胞活性化への影響を明らかにするため、ラットより単離した筋衛星細胞を各種レモンマートル抽出物で刺激し、その活性化能を核酸アナログ (BrdU) の取り込みを指標に評価した結果、レモンマートル水抽出物及び20%、40%、60%エタノール抽出物は有意に筋衛星細胞を活性化したが、80%及び100%エタノール抽出物は有意な変化を認めなかった。これらの結果から、抽出溶媒における水とエタノールの混合比は、水を40%以上とすることが必要であると結論付けた。次に、レモンマートル水抽出物または60%エタノール抽出物をラットに投与し、ラット骨格筋における筋衛星細胞活性化を評価した結果、いずれの抽出物も有意に筋衛星細胞を活性化した。*in vivo* における効果が両抽出物に確認され

たことから、以降の検討では、水溶性であるために多様な製品展開が可能な水抽出物を採用した。続いて、レモンマートル水抽出物による筋衛星細胞の増殖促進効果の細胞種特異性を明らかにするため、本細胞が筋線維に融合する過程で生成する筋芽細胞に対する影響を評価した。その結果、レモンマートル水抽出物は筋芽細胞を活性化しないことが明らかとなった。以上の結果から、レモンマートル水抽出物は筋衛星細胞に特異的に作用し、その活性化を誘導することが示唆された。

第二章 カスアリニンはレモンマートル抽出物による筋衛星細胞活性化の活性本体である

本章では、レモンマートル抽出物による筋衛星細胞活性化機序を明らかにするため、当該抽出物による筋衛星細胞活性化に関与する活性本体の同定と構造活性相関解析、並びに筋衛星細胞活性化の分子標的を検討した。まず、LC-MS/MS 分析、HPLC 分析、NMR 分析により、当該抽出物中の主要含有化合物として、没食子酸、カスアリニン、ミリシトリン、ヒペリン、ケルシトリンの5化合物を同定した。続いて、当該5化合物による筋衛星細胞活性化への影響を *in vitro* で評価した結果、カスアリニンのみが有意に筋衛星細胞を活性化し、その効果濃度はレモンマートル抽出物の効果濃度に含まれるカスアリニンの濃度と一致したことから、カスアリニンはレモンマートル抽出物中の主要な活性本体であると結論付けた。

上記評価において、カスアリニンの部分構造体である没食子酸が筋衛星細胞を活性化しなかったことから、カスアリニンの分子構造（鎖状グルコースに2つのヘキサヒドロキシジフェノイル（HHDP）基と1つの galloyl 基が結合）に着目し、カスアリニンの類似構造化合物が筋衛星細胞を活性化するかどうかを検証した。その結果、カスアリニンの主要な部分構造体であるエラグ酸、カスアリニンの構造異性体であるカスアリクチン、及びカスアリニンの2,3-HHDP 基と5-galloyl 基が結合した構造を有するカスターラジンは、いずれも筋衛星細胞を活性化しなかったことから、カスアリニンによる筋衛星細胞の活性化には本分子の分子構造全体が重要であることが示唆された。

次に、レモンマートル抽出物による筋衛星細胞活性化の分子メカニズムを検討するため、筋衛星細胞の活性化と増殖に重要な分子である IL-6 の mRNA 発現を定量 PCR にて評価した。その結果、筋衛星細胞活性化効果を認めたレモンマートル抽出物及びカスアリニンは、筋衛星細胞の IL-6 mRNA 発現を有意に上昇させたが、筋衛星細胞活性化効果を認めなかったヒペリン及びケルシトリンは当該作用を認めなかった。これらの結果から、レモンマートル抽出物とカスアリニンによる筋衛星細胞の活性化は、同機能性発現に重要な IL-6 の上方制御を伴うことが示唆された。最後に、カスアリニンをラットに投与し、骨格筋における筋衛星細胞活性化を評価した結果、カスアリニン投与はレモンマートル抽出物投与と同様に筋衛星細胞を有意に活性化し、その効果用量はレモンマートル抽出物の効果用量に含まれるカスアリニンの量と一致したことから、本分子がレモンマートル抽出物の当該 *in vivo* 機能性を規定する活性本体であると結論付けた。

総括

本研究では、レモンマートル抽出物の製法と機能性、及び筋衛星細胞活性化メカニズムを検討した。第一章では、レモンマートル抽出物の抽出溶媒による筋衛星細胞活性化への影響を明らかにし、水抽出による抽出方法を選択した。また、本水抽出物は筋衛星細胞を特異的に活性化することが示唆された。第二章では、レモンマートル抽出物の活性本体としてカスアリニンを同定するとともに、本分子の全体構造が筋衛星細胞の活性化発現に必要であること、また、当該機能性発現の作用点として IL-6 発現誘導との関連が示唆された。本研究により得られた一連の成果は、レモンマートル抽出物の製法及び製品規格の確立のみならず、本抽出物の機能性及び作用機序の全容解明への足がかりともなる学術的根拠を提供した。本研究を端緒として、レモンマートル抽出物の製品化が加速し、将来的に本機能性食品を基調としたサルコペニアに対する新たな介入法の確立に繋がることが期待される。

参考論文

Ayumi Yamamoto, Shinichi Honda, Mineko Ogura, Masanori Kato, Ryuichi Tanigawa, Hidemi Fujino, and Seiji Kawamoto. Lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) extract and its active compound, casuarinin, activate skeletal muscle satellite cells *in vitro* and *in vivo*. *Nutrients*, 14(5), 1078 (2022).