

平成30年 5月25日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00813

研究課題名(和文) ブロッコリースプラウト抽出物による炎症制御及びエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of inflammation and energy metabolism by broccoli sprout extract

研究代表者

長田 直人 (Nagata, Naoto)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：70456408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブロッコリースプラウトに含まれる機能性因子グルコラファニンを含めた高脂肪食を与えたマウスは体重増加率が約15%抑えられ、内臓脂肪量が約20%減少し、脂肪肝と血糖値の上昇が抑えられた。その作用機序として、グルコラファニンが、脱共役タンパク質1(UCP-1)を増加させ、エネルギー消費の増加と脂肪燃焼をもたらすBrowningを促進した。また、グルコラファニンは、内毒素(LPS)を過剰産生するデスルフォビブリオ科の腸内細菌の増殖を抑制しており、血液中の内毒素を低下させ、代謝性エンドトキシン血症を改善するという作用を発見した。さらに、グルコラファニンの標的分子として転写因子Nrf2が重要であった。

研究成果の概要(英文)：Glucoraphanin, a phytochemical in broccoli sprouts, attenuated weight gain, decreased hepatic steatosis, and improved glucose tolerance and insulin sensitivity in high fat diet (HFD)-fed wild-type mice but not in HFD-fed Nrf2 knockout mice. Glucoraphanin increased uncoupling protein-1 (Ucp-1) protein levels in subcutaneous adipose depots, thereby increased energy expenditure. In addition, glucoraphanin suppressed Desulfovibrionaceae in gut microbiomes of HFD-fed mice, and decreased plasma lipopolysaccharide levels. By promoting fat browning, limiting metabolic endotoxemia-related chronic inflammation, and modulating redox stress, glucoraphanin may mitigate obesity, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease.

研究分野：代謝学

キーワード：エネルギー代謝 肥満 機能性食品因子 腸内細菌叢 慢性炎症

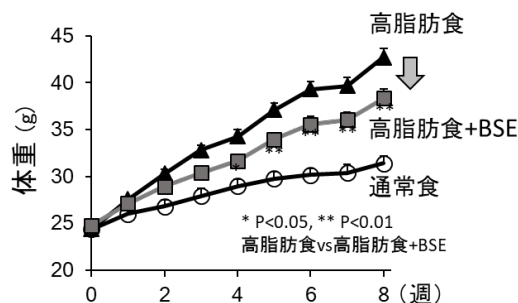
### 1. 研究開始当初の背景

近年、飽食や運動不足を背景として、全世界で肥満人口が爆発的に増加している。日本も例外でなく、現在成人の約5人に1人が肥満であり、深刻な社会問題となっている。以前に、申請者は肥満の抑制を目的として、数多くの食品機能性因子をスクリーニングし、ブロッコリースプラウト抽出物 (Broccoli Sprout Extract、以下 BSE) が摂食量や運動量を変化させることなく、高脂肪食によるマウスの肥満、及び糖代謝異常を改善することを新たに見出した。BSE に豊富に存在する機能性成分であるグルコラファニン (以下 GR) は、生体内で加水分解され活性体のスルフォラファンとなり、転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2) を活性化させる。Nrf2 は解毒化酵素や抗酸化酵素の発現を誘導することから、GR には解毒及び抗酸化能の亢進を介した発がん抑制効果が報告されている (Zhang Y, PNAS 1992 等)。しかし、マウス個体のエネルギー代謝、及び糖代謝に与える影響は未だ明らかでない。興味深いことに、申請書らのスクリーニングでは、代表的な抗酸化剤であるビタミン E やカロテノイド類は、肥満を抑制せず、血糖改善効果は BSE と比較して軽度であった。このことから、抗酸化能の亢進作用に加えてスルフォラファンが有する未知の機能性がエネルギー摂取と消費のバランスを消費優位へと大きく変化させ、肥満と糖代謝異常を予防・抑制する可能性がある。

### 2. 研究の目的

申請者は、BSE がマウスにおいて抗肥満・抗糖尿病効果を示すことを新たに発見した (図 1)。本研究の目的は、BSE によるエネルギー代謝調節メカニズムと生活習慣病の基本病態である炎症への作用メカニズムを明らかにし、新規の機能性食品の開発につながる研究基盤を確立することである。本研究は、BSE が生体内のどの臓器・組織に作用し、過栄養によって破綻したエネルギー摂取と消費のバランスをどのように消費優位へと変化させるのかを明らかにする。さらに、脂肪の過剰摂取による炎症の起点として腸内細菌叢に着目し、BSE による腸内細菌叢組成の是正がもたらす抗炎症作用が肥満と糖代謝異常の発症抑制に寄与するかを検証することである。

(図 1) BSE による体重増加の抑制



### 3. 研究の方法

BSE によるマウス個体レベルでのエネルギー代謝調節の解明

マウス個体レベルでのエネルギー摂取量と消費量の両面をそれぞれ測定し、BSE の影響を検討した。エネルギー摂取量は、摂食した飼料のカロリーと糞便に残存するカロリーの差として求めた。また、BSE が脂肪の吸収効率を変化させる可能性を考慮し、糞便に残存する脂肪量を測定した。エネルギー消費量は、間接熱量計 (Columbus 社 Oxymax) を用いて酸素消費量、呼吸商、及び運動量から算出した。

腸内細菌叢の組成と血中 LPS 濃度の解析

高脂肪食による腸内細菌叢組成の異常が、食物からのエネルギー摂取の増加、及び全身での慢性的な炎症の惹起を介して肥満や糖代謝異常の発症に密接に関わることがヒト及びマウスにおいて共通して報告された (Turnbaugh PJ, Nature 2006 等)。本研究では、細菌叢組成の異常と全身の炎症をつなぐメディエーターとして想定している LPS の血中濃度を測定し、次項において検討する臓器の炎症病態、並びに糖代謝異常と関連付けて解析した。細菌叢の組成は、盲腸内容物から DNA を抽出し、PCR で増幅した細菌特異的な 16SrDNA の領域に対する次世代シーケンサーを用いた配列解析により決定した。

マクロファージの機能制御と炎症病態に関する解析

以前に申請者は、高脂肪食や LPS が臓器へのマクロファージ浸潤を促すと共に M1 マクロファージ増加・M2 マクロファージ減少をもたらす、炎症の慢性化とインスリンへの感受性の低下、ひいては肥満や糖代謝異常の形成に深く関与することを示した (Kitade H, Diabetes 2012)。本研究では、脂肪組織、及び肝臓のマクロファージの「量」(浸潤) 及び「質」(M1/M2 比) をフローサイトメトリーを使って定量化した。炎症・ストレス応答のシグナル伝達 (NF- $\kappa$ B、MAP キナーゼ、小胞体ストレスをウエスタンブロット法により検討した。また、インスリン感受性と糖代謝能 (糖・インスリン負荷試験) 血清脂質、酸化ストレスマーカー、及び脂肪・肝臓・骨格筋におけるインスリンのシグナル伝達をウエスタンブロット法により検討した。

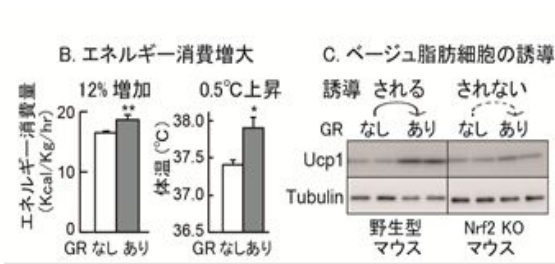
### 4. 研究成果

マウス個体レベルの代謝表現型に対する GR の影響

BSE (主成分は GR) 摂取マウスは体温が約 0.5 上昇しており、熱産生の亢進によるエネルギー消費量の増大を示唆していた (図 2 左)。その作用機序として、GR がミトコンドリアに局在し、熱産生を担う Ucp1

を白色脂肪組織において誘導することを見出した(図2右)。

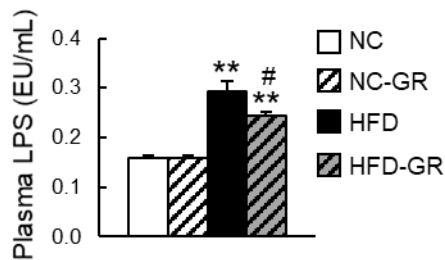
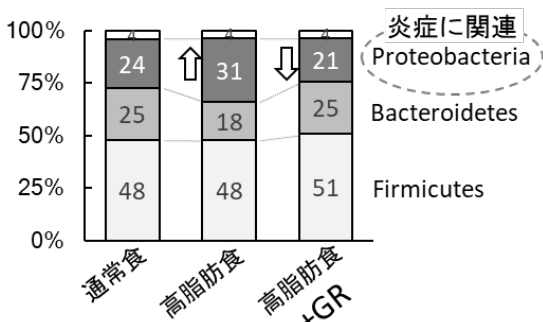
(図2) GRの抗肥満効果



GRの腸内細菌叢への効果

高脂肪食に反応して増加するProteobacteriaが有するリポポリサッカライド(LPS, 内毒素)は、腸管腔内から血液中に移行して全身に炎症を惹起する。GR投与マウスでは高脂肪食によるProteobacteria(中でもデスルフォビブリオ科)の腸内細菌の増加を是正し(図3上)と血中LPS濃度の上昇が抑えられていた(図3下)。よって、GRは高脂肪食による代謝性エンドトキシン血症を予防することを見出した。

(図3) 腸内細菌叢の組成と血中LPS濃度

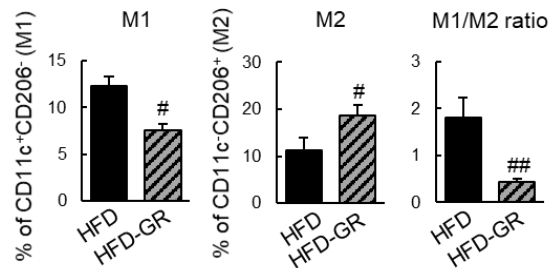
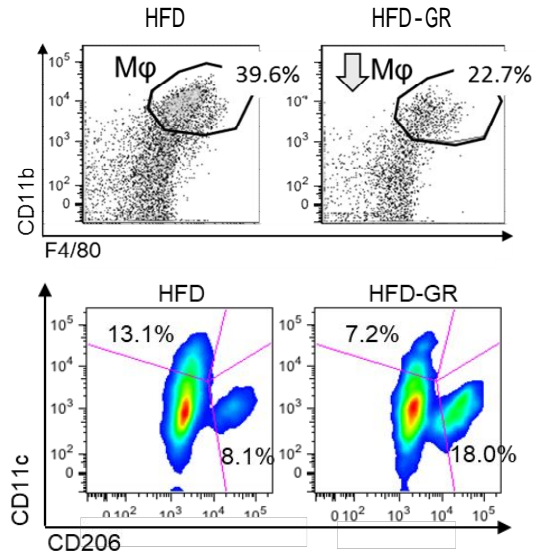


NC: 通常食  
 NC-GR: 通常食 + グルコラファン  
 HFD: 高脂肪食  
 HFD-GR: 高脂肪食 + グルコラファン

GRの炎症性マクロファージへの効果  
 さらに、GRは肝臓に浸潤するマクロファージ(F4/80+CD11b+)を著明に減少させた(図4上)。さらに、GRは高脂肪食がもたらす炎症性M1マクロファージが優位な状態を是正し、抗炎症M2マクロファージが優位な

状態とした(図4中・下)。よって、GRは、マクロファージによる臓器局所での炎症を改善する可能性がある。

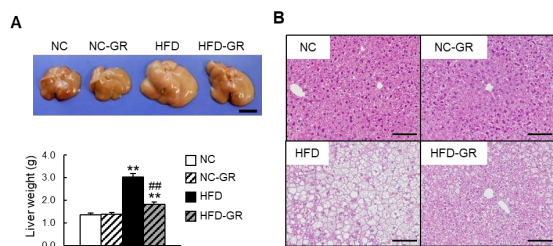
(図4) フローサイトメトリーによる肝臓中マクロファージの解析



GRの肝臓における効果

GR投与マウスでは、高脂肪食による肝臓の肥大が抑制されており(図5A)、脂肪の蓄積が軽減されていた(図5B)。

(図5) GRの脂肪肝抑制作用



これらの結果と一致して、肝機能マーカーAST、およびALT、肝臓の炎症性サイトカイン遺伝子(TNF- $\alpha$ , Ccl2等)発現、脂質過酸化がGR投与によって軽減されており、炎症性細胞内シグナルJNK, Erk経路が抑制されていた。以上より、GRは高脂肪食による肝臓へのダメージを軽減することが明らかとなった。上記のGRの代謝改善効果(図1~5)はGRの分子標的である転写因子Nrf2を欠損したマウスでは認められなかったこと

から、GR の作用標的として Nrf2 が重要であることを見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Xu L, Nagata N, Ota T: Glucoraphanin: A broccoli sprout extract that ameliorates obesity and metabolic endotoxemia.

Adipocyte, 印刷中  
査読有

Nagata N, Xu L, Kohno S, Ushida Y, Aoki Y, Umeda R, Fuke N, Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Takahashi C, Suganuma H, Kaneko S, Ota T: Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice.

Diabetes, 66:1222-1236, 2017

査読有

DOI: 10.2337/db16-0662

Chen G, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T: Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

Int J Mol Sci 17: E1379, 2016

査読有

DOI: 10.3390/ijms17091379

[学会発表](計 8 件)

長田 直人, 太田 嗣人, 安藤 仁: スルフォラファンによる転写因子 Nrf2 活性化を介した肥満及び脂肪肝抑制機構の検討 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)(神戸/口頭発表) 2017

長田 直人, 牛田 悠介, 菅沼 大行, Xu Liang, Zhuge Fen, 金子 周一, 太田 嗣人: スルフォラファンによる転写因子 Nrf2 活性化を介した肥満・NAFLD 抑制機構の検討. 第 28 回分子糖尿病学シンポジウム(富山、シンポジウム/口頭発表) 2016

長田 直人, 牛田 悠介, 菅沼 大行, Xu Liang, Zhuge Fen, 金子 周一, 太田 嗣人: スルフォラファンによる転写因子 Nrf2 活性化を介した肥満及び代謝異常抑制機構の検討. 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会(金沢/口頭発表) 2016

N. Nagata, Y. Ushida, Y. Aoki, L. Xu, F. Zhuge, H. Suganuma, S. Kaneko, T. Ota: Nrf2 activation improves high fat diet-induced inflammation and insulin

resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status in liver. ADA76th Scientific Session (アメリカ合衆国・ニューオリンズ/オーディオガイドポスター) 2016

長田 直人, 牛田 悠介, 菅沼 大行, Xu Liang, Zhuge Fen, 太田 嗣人: スルフォラファンによる転写因子 Nrf2 活性化を介した肥満及び代謝異常抑制機構の解析. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会(京都/口頭発表) 2016

T Ota, N Nagata, Y Ushida, Y Aoki, L Xu, F Zhuge, H Suganuma, S Kaneko: Nrf2 activation by glucoraphanin alleviates obesity and insulin resistance through increased energy expenditure and alternative activation of macrophage. Keystone Symposia Conference G1: New Therapeutics for Diabetes and Obesity (アメリカ合衆国・ラホーヤ/ポスター発表) 2016

Ota T, Ushida Y, Aoki Y, Xu L, Zhuge F, Suganuma H, Kaneko S, Nagata N: Glucoraphanin-mediated Nrf2 activation reduces obesity and insulin resistance by increasing energy expenditure and limiting endotoxemia-related chronic inflammation. EASD2016 (ドイツ・ミュンヘン/ポスター発表) 2016

N. Nagata, Y. Ushida, Y. Aoki, R. Umeda, S. Sunabori, L. Xu, F. Zhuge, Y. Sakai, H. Suganuma, T. Ota: Broccoli sprouts improve high fat diet-induced inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status in liver. ACN2015 (第 12 回 Asian Congress of Nutrition、横浜/口頭発表) 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: LPS 産生抑制剤、及び LPS 産生抑制用の食品組成物

発明者: 太田 嗣人、長田 直人、牛田 悠介、青木 雄大、梅田 涼平

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-065168

出願年月日: 平成 28 年 3 月 29 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/43969>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 直人 (NAGATA, Naoto)  
金沢大学・医学系・講師  
研究者番号：70456408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

飯田 宗穂 (Iida, Noriho)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：40705604

(4) 研究協力者

なし