

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00883

研究課題名(和文) 脂溶性食品成分によるミトコンドリア機能覚醒と抗肥満効果の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mitochondrial function awakening and anti-obesity effect by lipophilic ingredients

研究代表者

海野 雄加 (Unno, Yuka)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30433212

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)：肥満は国民の健康において深刻な問題だが、エネルギー収支を基準とした個人の生活習慣の改善に委ねられており、抗肥満活性の統一基準は十分に確立されていない。そこで、代表者は培養細胞の評価システムを個体レベルでの肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げることで、抗肥満活性の統一基準の確立を目指している。

クリルオイルは南極オキアミから抽出された $\omega$ -3脂肪酸を豊富に含むオイル成分であり、ヒト臨床試験により抗肥満効果が報告されている。我々は、クリルオイルより、褐色脂肪細胞への転換(ブラウニング)に寄与することにより、3T3-L1細胞に蓄積する中性脂肪量を減少させる脂溶性成分を見出し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子細胞生物学の発展により、脂肪細胞は余剰エネルギーを貯蔵するだけの細胞という理解から、様々な生理活性物質を分泌し、脂肪組織外の組織とも連携して生体の恒常性に貢献することがわかった。しかし、現状の抗肥満薬としては薬効が脂肪組織・脂肪細胞の脂肪蓄積に直接関わっていない食欲抑制や消化吸収抑制などで、分子細胞生物学的手法を用いた肥満研究が抗肥満薬の創出を通じて肥満人口の減少に貢献しているとは言い難い。培養細胞システムによる抗肥満活性評価・解析システムが構築され、個体レベルで肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げる事ができれば、培養細胞は安価で取り扱いも簡単であるため、その波及効果は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：Our research aims to establish a unified standard of measuring anti-obesity activity by refining a cultured cell evaluation system into a system that can predict elimination of obesity at the individual level.

In this research project, we are screening for lipophilic ingredients that may have anti-obesity effects from Krill oil, which has long been used as an oil to protect the health of people who consume a meat-centered diet with few vegetables, such as those living in Antarctica. We have successfully discovered several functional ingredients. The components from krill oil that promote adipogenesis of 3T3-L1 cells were screened to reveal palmitoyl lactic acid (PLA) as a promoter of adipogenesis. The PLA-induced adipocytes contained large number of small lipid droplets.

研究分野：食生活学

キーワード：肥満 脂肪細胞 脂質 機能性食品 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

肥満人口は増加の一途を辿っている。肥満からより深刻な動脈硬化症や糖尿病などの疾患に繋がる事が多く、肥満人口の減少は医療費増加を抑制する重要な国家的課題として認識されるようになってきた。また、肥満は自分を律することのできない怠惰な生活の証と見なされるため、健康面だけでなく精神面でも「痩せること」が望まれるが、個人の努力では往々にして解消されない。そこで、肥満を改善するのに効果的な機能性食品や抗肥満薬の創出が期待されている。近年の分子細胞生物学の発展により、脂肪組織の理解が進んできている。脂肪細胞は余剰エネルギーを貯蔵するだけの細胞という理解から、様々な生理活性物質を分泌し、脂肪組織外の組織とも連携して生体の恒常性に貢献することがわかった。肥満モデルマウスの肥満の原因が脂肪細胞由来タンパク質の異常であるというエポックメイキングな研究報告(1994年)の後、肥満研究を行う研究者人口が一段と増加した。しかしながら、現状の抗肥満薬としては薬効が脂肪組織・脂肪細胞の脂肪蓄積に直接関わっていない食欲抑制や消化吸収抑制などで、分子細胞生物学的手法を用いた肥満研究が抗肥満薬の創出を通じて肥満人口の減少に貢献しているとは言い難い。その原因として、個体における肥満という現象と分子細胞生物学研究で使用される培養細胞レベルでの隔たりがあり、機能性食品創出や創薬の現場で抗肥満成分の探索手法が確立されていないことが挙げられる。そこで研究代表者は、細胞イメージング技術により抗肥満活性評価・解析システムを構築し、個体レベルでの肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げることを目指している。

これまでの研究(若手研究(B))(新たな指標の導入を目指した抗肥満活性評価・解析システムの実現:15K16233)において、健康食品であるクリルオイルより、抗肥満効果が期待出来る成分を複数見出している。クリルオイルは南極オキアミから抽出され、南極付近などの野菜が少なく肉中心の食生活で過ごす人々の健康を守るオイルとして昔から重宝されてきた。クリルオイルは-3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を豊富に含み、これまでに、クリルオイルによる抗肥満効果がヒト臨床試験で報告されているが、その詳細な作用機序は解明されていない。

## 2. 研究の目的

我々は、培養細胞レベルにてクリルオイルの解析に取り組んだ。クリルオイルは、3T3-L1前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へと分化を誘導すること、そして、その脂肪細胞は通常の方法で分化させた脂肪細胞と比較して、脂肪滴が微小ながら数が多いなどのユニークな特徴を有することを見出した(若手研究:15K16233)。クリルオイルに豊富に含まれるEPAやDHA単独では脂肪分化は誘導されないため、クリルオイルにはEPAやDHA以外の未知の活性成分が含まれていると仮定をして、培養細胞の評価システムを用いて活性成分の探索を行った。クリルオイルからの成分の分画と構造決定は脇本敏幸教授(北海道大学)に依頼をした。

## 3. 研究の方法

### (1)脂肪細胞への分化誘導

繊維芽細胞であるマウス胎児由来3T3-L1前駆脂肪細胞は、トリプシン処理により剥離し、35mm細胞培養ディッシュに50,000個で播種した。コンフルエントの状態から培養培地にて2日間、さらにデキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンで構成される分化誘導培地にて2日間、インスリンで構成される分化進展培地にて2日間培養することで、細胞内に中性脂肪を貯める成熟脂肪細胞へと分化させた。細胞は分化誘導培地に置換後3日目で、細胞質中に中性脂肪を貯蔵するための脂肪滴が多数観察できた。その後、脂肪滴各々が大きく膨らんだ成熟脂肪細胞へと分化した。

### (2)脂溶性成分の分化誘導能解析

3T3-L1前駆脂肪細胞は、コンフルエントの状態から培養培地にて2日間培養し、次に各脂溶性成分を含む培養培地に置換し8日間培養した。この間、新たに調製した脂溶性成分を含む培養培地と2日おきに交換をし、形態学的変化は倒立顕微鏡を用い観察し記録した。

### (3)Oil-Red O染色

脂肪細胞の終末分化の指標である脂肪滴蓄積は、Oil-Red O染色法により評価した。

(4) リアルタイム PCR 解析

培養脂肪細胞から RNeasy(Qiagen)を用いて total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現変化を解析した。

4 . 研究成果

マウス胎児由来 3T3-L1 繊維芽細胞は、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンで構成される分化誘導培地にて 2 日間培養することで、脂肪滴を含む脂肪細胞へと形態変化を起こす。分化誘導培地以外にもチアゾリジン誘導體やインドメタシンなどは単剤で分化を誘導する。興味深いことに、クリルオイルは濃度依存的に 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化を誘導するが(図 1)、オリーブオイルや亜麻仁オイルなどの他のオイルは分化を誘導しなかった(図 2)。そこで、クリルオイルに特有な成分を探索するための指標として脂肪分化(脂肪滴蓄積と形態学的変化)が最適だと考えた。

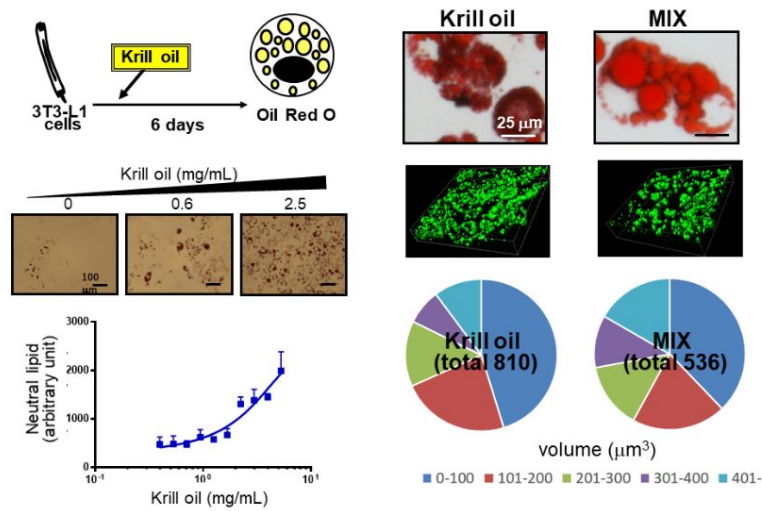


図 1 クリルオイルは濃度依存的に 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化を誘導する

3T3-L1 前駆脂肪細胞は、クリルオイルを含む培養培地にて 6 日間 (Krill oil) または、分化誘導培地にて 2 日間とインスリンで構成される分化進展培地にて 2 日間 (MIX) 培養することで、細胞内に中性脂肪を貯める成熟脂肪細胞へと分化させた。脂肪細胞の終末分化の指標である脂肪滴蓄積は、Oil-Red O または Neutral Lipid 染色法により評価した。脂肪滴の体積は共焦点顕微鏡で得た画像を高精細 3D/4D 画像解析ソフトウェア IMARIS を用い解析した。

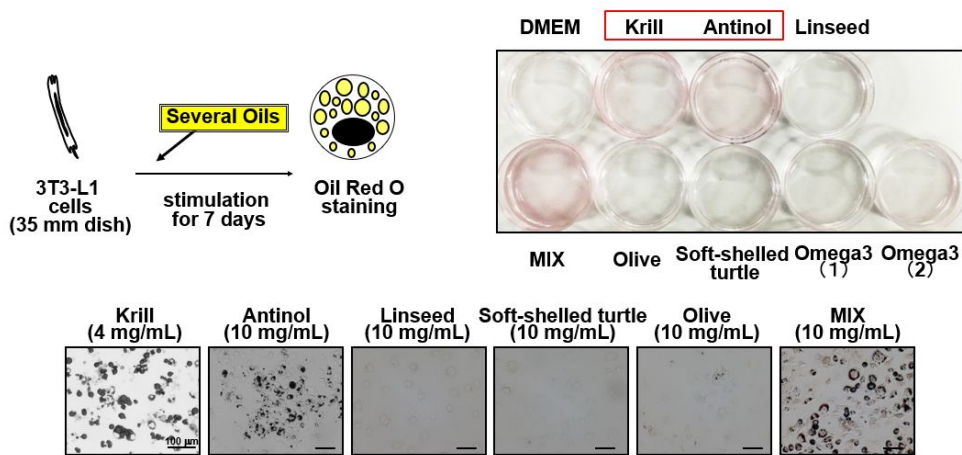


図 2 オリーブオイルや亜麻仁オイルなどの他のオイルは分化を誘導しない

3T3-L1 前駆脂肪細胞は、クリルオイル (Krill) 分化誘導培地 (MIX) アンチノール® (Antinol) 亜麻仁オイル (Linseed) すっぽんオイル (Soft-shelled turtle) オリーブオイル (Olive) をそれぞれ含む培養培地にて 6 日間培養することで、細胞内に中性脂肪を貯める成熟脂肪細胞へと分化させた。脂肪滴蓄積は、Oil-Red O 染色法により評価した。

北海道大学との共同研究でクリルオイルに含まれる脂溶性成分を分画し、そのクリルオイル由来の活性成分を用いた探索により、脂肪分化誘導を認める成分を 3 種類見出し、その構造を全

て決定した。脂溶性成分を構成する脂肪酸に関しては複数の脂肪酸が想定できるために、まずは最も安定な飽和脂肪酸であるパルミチン酸で合成し、抗肥満効果が再現できるのかを確認した。合成した複数の成分の1つ、Palmitoyl lactic acid (PLA) は、脂肪形成に対する2つの主要制御因子 PPAR と C/EBP を核に集積させ、3T3-L1 細胞の脂肪分化を誘導した。さらに、PLA は脂肪分化を誘導すると共に、褐色脂肪への転換（ブラウニング）に寄与することで3T3-L1 脂肪細胞に含まれる中性脂肪の大きさを有意に減少させた（図3）。この成果は雑誌 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids に原著論文として報告した。

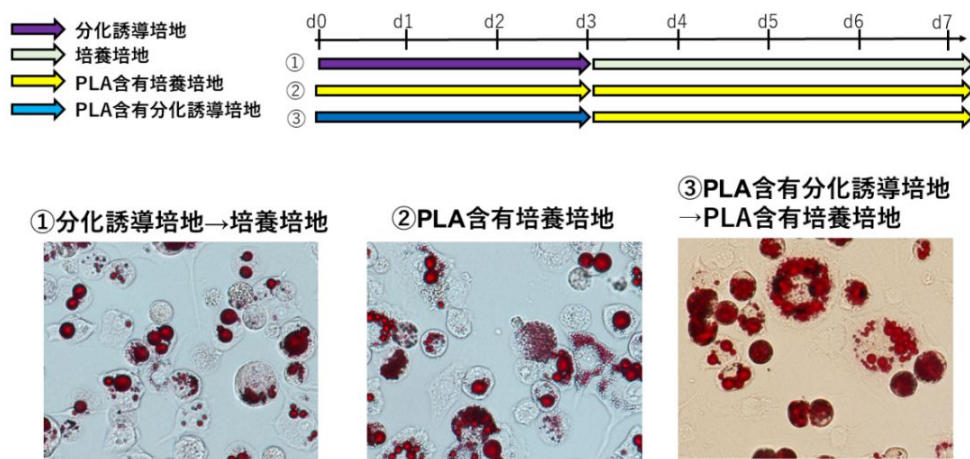


図3 PLA は 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制する

3T3-L1 細胞は ~ の 3 種類の方法で分化誘導を行い、細胞に含まれる脂肪滴の数と大きさを比較した。デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンで構成される分化誘導培地で3日間処理した後に培養培地で4日間処理した。PLAを含む培養培地にて7日間培養した。PLAを含む分化誘導培地で3日間処理した後にPLAを含む培養培地で4日間処理した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato Yoshinori, Unno Yuka, Miyazaki Chizuru, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> resists reactive oxygen species and survives in macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53846-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kamoshida Go, Akaji Takuya, Takemoto Norihiko, Suzuki Yusuke, Sato Yoshinori, Kai Daichi, Hibino Taishi, Yamaguchi Daiki, Kikuchi-Ueda Takane, Nishida Satoshi, Unno Yuka, Tansho-Nagakawa Shigeru, Ubagai Tsuneyuki, Miyoshi-Akiyama Tohru, Oda Masataka, Ono Yasuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-Deficient <i>Acinetobacter baumannii</i> Due to Colistin Resistance Is Killed by Neutrophil-Produced Lysozyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.00573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Unno Yuka, Yamamoto Hirona, Takatsuki Shuto, Sato Yoshinori, Kuranaga Takefumi, Yazawa Kazunaga, Ono Yasuo, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 1863
2. 論文標題 Palmitoyl lactic acid induces adipogenesis and a brown fat-like phenotype in 3T3-L1 preadipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 772 - 782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbalip.2018.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Unno Yuka, Sato Yoshinori, Fukuda Hayato, Ishimura Kohei, Ikeda Hiroyuki, Watanabe Mizuki, Tansho-Nagakawa Shigeru, Ubagai Tsuneyuki, Shuto Satoshi, Ono Yasuo	4. 巻 592
2. 論文標題 Resolvin E1, but not resolvins E2 and E3, promotes fMLF-induced ROS generation in human neutrophils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2706 - 2715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 海野 雄加	4. 巻 54
2. 論文標題 ヒト微生物叢が産生するGPCRのアゴニスト	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 579 - 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.54.6_579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshinori, Unno Yuka, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote <i>Acinetobacter baumannii</i> biofilm formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0194556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Unno Yuka, Sato Yoshinori, Nishida Satoshi, Nakano Akiyo, Nakano Ryuichi, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 2017
2. 論文標題 <i>Acinetobacter baumannii</i> Lipopolysaccharide Influences Adipokine Expression in 3T3-L1 Adipocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1 - 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/9039302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata Takuya, Unno Yuka, Fukuda Mitsunori, Utsunomiya-Tate Naoko.	4. 巻 23
2. 論文標題 The dynamic structure of Rab35 is stabilized in the presence of GTP under physiological conditions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 23:100776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ubagai Tsuneyuki, Sato Yoshinori, Kamoshida Go, Unno Yuka, Ono Yasuo	4. 巻 129
2. 論文標題 Immunomodulatory gene expression analysis in LPS-stimulated human polymorphonuclear leukocytes treated with antibiotics commonly used for multidrug-resistant strains.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 39 - 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2020.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鴨志田剛, 赤路卓哉, 竹本訓彦, 鈴木雄介, 上田たかね, 西田智, 佐藤義則, 海野雄加, 永川茂, 祖母井庸之, 秋山徹, 小田真隆, 斧康雄
2. 発表標題 コリスチン耐性によりリポ多糖を欠損したAcinetobacter baumanniiは好中球が産生するリゾチームにより殺菌される
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤義則, 海野雄加, 西田智, 上田たかね, 永川茂, 祖母井庸之, 斧康雄
2. 発表標題 マクロファージの殺菌に対するAcinetobacter baumannii の抵抗性評価
3. 学会等名 第68回 日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤義則, 永川茂, 海野雄加, 鴨志田剛, 西田智, 上田たかね, 祖母井庸之, 斧康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii 感染klothoマウスにおける免疫応答の解析
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永川茂，祖母井庸之，上田たかね，佐藤義則，海野雄加，西田智，斧康雄
2. 発表標題 Galectin-8 のヒト好中球機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回 日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永川茂，祖母井庸之，上田たかね，鴨志田剛，佐藤義則，海野雄加，西田智，斧康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii 臨床分離株の肺感染モデルを用いた病原性解析
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野雄加，佐藤義則，永川茂，鴨志田剛，西田智，上田たかね，祖母井庸之，斧康雄
2. 発表標題 レゾルビンE1はfMLFが誘導するヒト好中球の活性酸素産生を増強する
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野雄加，佐藤義則，永川茂，鴨志田剛，西田智，上田たかね，祖母井庸之，斧康雄
2. 発表標題 レゾルビンによる好中球活性化のプライミング反応
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第65回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 海野雄加, 佐藤義則, 宮崎千鶴, 永川茂, 鴨志田剛, 西田智, 上田たかね, 祖母井庸之, 斧康雄
2. 発表標題 レゾルビンE1によるヒト好中球の活性酸素産生活性化機構の解明
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野雄加
2. 発表標題 脂肪酸による好中球機能変化の解析
3. 学会等名 第7回 あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高槻修人, 海野雄加, 戸田直希, 倉永健史, 斧康雄, 脇本敏幸
2. 発表標題 フラン脂肪酸の合成と抗炎症作用解析
3. 学会等名 食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 海野雄加, 山本宙奈, 矢澤一良, 脇本敏幸, 斧康雄
2. 発表標題 クルリオイルに含まれる抗肥満成分の探索と作用機序解析
3. 学会等名 第38回日本肥満学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 海野雄加, 佐藤義則, 永川茂, 鴨志田剛, 西田智, 上田たかね, 祖母井庸之, 斧康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii由来リポ多糖による脂肪細胞の機能変化
3. 学会等名 日本感染症学会東日本地方会学術集会・日本化学療法学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本宙奈, 高槻修人, 海野雄加, 倉永健史, 斧康雄, 脇本敏幸
2. 発表標題 クルルオイル中の脂肪細胞分化促進成分の探索
3. 学会等名 第64回北海道薬学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 海野雄加, 村田拓哉, 楯直子、
2. 発表標題 D-アミノ酸異性化がタウ微小管結合領域R4の シート構造 転移および線維形成に及ぼす効果の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------