

令和元年6月18日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K09839

研究課題名(和文)動物脂肪依存の脳内分子機構と米ぬか由来機能成分 オリザノールの治療的意義の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of addiction to animal fat and therapeutic potential of brown rice-specific bioactive substance, gamma-oryzanol for animal fat preference

研究代表者

益崎 裕章 (Masuzaki, Hiroaki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00291899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：玄米機能成分、 γ -オリザノールによるゲノム修飾作用の分子機構を解析した結果、 γ -オリザノールがエピゲノム制御酵素である1型DNAメチルトランスフェラーゼの競合的阻害効果を有し、動物性脂肪食の長期間摂取によって亢進する脳内報酬系神経核(線条体)の2型ドパミン受容体遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化を有意に減少させ、動物性脂肪に対する嗜好性を軽減する行動変容をもたらす効果を分子レベルで明らかにした。この効果は骨髄異形成症候群に対して臨床応用されているDNAメチル基転移酵素阻害剤5-aza-デシタピンの効果に匹敵するものであり、 γ -オリザノールによる脳内報酬系のゲノム修飾作用が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類が長く食し、長期の安全性が担保されている天然食品に含有される機能成分を糖尿病や肥満症の予防・改善に活用する試み、特に脳機能の改善を目指す枠組みにおいては、長期の安全性と多機能性のバランスの良さを含め、化学合成された医薬では達成できない数々のアドバンテージを有している。本研究により、 γ -オリザノールが担う動物脂肪依存改善の中樞制御と包括的代謝改善の新規メカニズムが明らかになったことにより、未だ決定打を欠く肥満症や2型糖尿病などの生活習慣病の改善・予防に貢献できる、まったく新しい医学的アプローチが可能となり、その学術的・臨床的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：We explored the possibility that brown rice-specific bioactive substances, γ -oryzanol would modulate the function of brain reward system in mice. In striatum from mice fed high fat diet, expression of type 2 dopamine receptor (D2R) was decreased via the increase in DNA methylation of its promoter region. Co-administration of γ -oryzanol decreased the expression and activity of DNA methyltransferases (DNMTs), thereby restoring the expression of D2R in striatum. Pharmacological inhibition of DNMTs by 5-aza-2'-deoxycytidine also ameliorated preference for dietary fat. Consistent with these findings, enzymatic in vitro assays demonstrated that γ -oryzanol inhibited the activity of DNMTs. We demonstrated that γ -oryzanol ameliorates HFD-induced DNA hypermethylation of the promoter region of D2R in striatum in mice. Our experimental paradigm highlights γ -oryzanol as a promising anti-obesity as well as anti-diabetic substance with a distinct property of novel epigenetic modulator.

研究分野：内分泌代謝学 分子栄養学 脳科学

キーワード：肥満症 糖尿病 食行動変容 動物性脂肪依存 脳内報酬系 玄米 γ -オリザノール エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満症・糖尿病の予防や改善に必須である食事療法には効果の個体差が大きく科学的根拠に基づく実効性の高い食事療法の確立が急務である。研究代表者は米ぬかに特有かつ高濃度に含有される機能成分、 γ -オリザノールが脳に作用して動物性脂肪に対する嗜好性を緩和し健康的な食行動に回帰させることを世界で最初に見出し、その分子基盤として、動物性脂肪の過剰摂取が視床下部の小胞体ストレスを増加させて動物性脂肪に対する嗜好を強化する悪循環を形成すること、 γ -オリザノールが小胞体ストレスを抑制する分子シャペロンとして機能し、この悪循環を断ち切ることをマウス実験で証明した (Diabetes 2012)。さらに最近、 γ -オリザノールが膵細胞に直接的に作用し、グルコース応答性インスリン分泌促進や細胞保護、グルカゴン過剰分泌の緩和、膵島ドパミン受容体(D2)シグナルの制御を介する糖尿病の改善に寄与することをマウス単離膵島の実験から明らかにした (Endocrinology 2015; British J Pharmacol 2015)。JST A-STEP 産学官研究では γ -オリザノールを高含有する発酵飲料の開発に取り組み、クロスオーバー介入臨床試験を完了して本飲料が動物性脂肪に対する欲求を緩和し、肥満症の改善効果を発揮することを実証した (農水省フードアクション・ニッポンアワード 2015 研究開発・新技術部門 優秀賞受賞)。しかし、動物脂肪依存の脳内分子機構、 γ -オリザノールが担う動物脂肪依存の改善機構には未だ不明点が多い。動物脂肪依存の脳内分子機構の解明は肥満症の制御のみならず、アルコールやニコチン、麻薬などの依存症、さらには、インターネットやゲーム、ギャンブルの依存症に関わる新規のメカニズム解明につながる可能性も期待され、現代社会の要請に応える極めて重要な解決課題と言える。

2. 研究の目的

γ -オリザノールによる GABA 神経入力からのドパミン回路修飾の可能性の検討、 γ -オリザノールによる脳内報酬系のゲノム修飾作用の分子機序の全容解明、腸内フローラ改善効果と食行動修飾をつなぐ新たな脳内分子機構の解明の3点を主な研究目的とした。

近年の研究から動物性脂肪に対する依存性はニコチンやアルコールなど既知の依存性物質よりも強力かつ長く持続することが示されている (Nat Neurosci 13:529-531, 2010)。また、既知の依存性物質による依存症の形成と動物性脂肪による依存症の形成との異同に関しても殆ど解明されていない。

先行研究から、依存症の形成には "GABA ニューロンが存在し、ドパミンを産生する腹側被蓋野"、"ドパミンをメデイエーターとして報酬シグナルが伝達される側坐核" を中心に、線条体や扁桃体などの神経核、前頭前野・海馬などの認知・判断領域が複合的に関与することが判明しており、既知の依存性物質に関しては腹側被蓋野の GABA ニューロン・ドパミン産生ニューロンと側坐核のドパミン受容ニューロン連関における個々の作用点が同定されている。そこで本研究では動物性脂肪食による肥満マウスの腹側被蓋野における GABA 伝達の変化と側坐核におけるドパミン作用を神経解剖学的に解析し、動物性脂肪依存の状態における GABA・ドパミン神経伝達・神経回路の変調を定量的に評価する。

肥満者では脳内報酬系の中核、線条体における 2 型ドパミン受容体 (D2R) の活動が低下し、摂食に伴う満足が得られにくくなっている (hyposensitivity 仮説) (Neuron 69:664-679, 2011)。研究代表者の最近の研究から動物脂肪食肥満マウスの側坐核や線条体では D2R の蛋白・mRNA 発現が低下しており、 γ -オリザノールの共投与により改善することが明らかになっており、 γ -オリザノールの動物性脂肪依存改善効果における新たなメカニズムとして D2R 遺伝子ゲノム修飾作用の可能性を検証し、動物脂肪依存に対する γ -オリザノールの治療的意義を解明する。マウス報酬系神経諸核からジェノム DNA・蛋白を抽出、次世代シーケンサーにより D2R プロモーター領域の DNA メチル化の程度を評価する。報酬系の陰性対照として視床下部を用い、 γ -オリザノールの効果判定に対する陽性対照として DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-aza-デシタピンを用いる。

3. 研究の方法

(1) γ -オリザノールによる GABA 神経入力からのドパミン回路修飾の可能性の検討

依存症の形成には、GABA ニューロンが存在し、ドパミンを産生する腹側被蓋野の機能破綻が深く関与することから食餌性肥満マウスの腹側被蓋野における GABA 伝達の変化と側坐核におけるドパミン作用を神経解剖学的に解析し、動物性脂肪依存における GABA・ドパミン神経伝達・神経回路の変調を定量評価する。このような研究は国内外でまったくなされていない。マウスから腹側被蓋野を採取し、プレシナプスレベルで GABA 終末 (シナプス) の密度、ポストシナプスレベルで GABA_A 受容体や GABA の作用を抑制するカリウム・クロール共輸送体 KCC2 の蛋白発現の変動を免疫組織化学やウエスタンブロット法で評価する。さらに、側坐核においてはドパミンニューロン終末の密度、ドパミン D2 受容体 (D2R) 及び DAT 蛋白、mRNA 発現の定量解析、GABA ニューロン数の変化率を神経解剖学的に評価する。

(2) γ -オリザノールによる脳内報酬系のゲノム修飾作用の分子機序解明

研究代表者らは動物脂肪肥満マウスの側坐核や線条体においては D2R の蛋白・mRNA 発現が著明に低下し、 γ -オリザノールの共投与により回復することを明らかにした。そこで γ -オリザノールによる D2R 遺伝子のゲノム修飾作用の可能性を検証し、動物脂肪依存に対する γ -オリザノールの治療的意義を解明する。マウス報酬系神経核からジェノム DNA・蛋白を抽出し、次世代シーケンサーを用いて D2R プロモーター領域の DNA メチル化をバイサルファイトシーケンシングで評

価する。脳内報酬系の陰性対照としては視床下部組織を用い、 γ -オリザノールの効果判定における陽性対照としては DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-aza-デシタピンを用い、これを投与したマウスの脳組織を並行して解析する。

(3) *in vitro* アッセイを用いた γ -オリザノールのゲノム修飾作用に関する分子機序解明

γ -オリザノールが DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)の活性を阻害する可能性を検証する。特に、DNMT1 に対する阻害活性を持つカフェイン酸・クロロゲン酸と γ -オリザノールとの構造類似性に注目し、メチル化供与体 s-adenosyl-L-homocysteine による DNA シトシンから 5-メチルシトシンへの変換を γ -オリザノールが阻害する活性強度を超高感度 ELISA によって評価する。DNMT には 1 型(既存の DNA メチル化維持) 3a 型(新たな DNA メチル化促進) 3b 型の isoform が存在するため各 isoform に対する阻害効果を ELISA で評価し、Michaelis-Menten equation, Eadie-Hofstee diagram 解析によって競合的阻害/アロステリック阻害等の活性阻害様式を明らかにする。更に、 γ -オリザノールが DNMT 自体の転写調節に作用する可能性を検証する。研究代表者らの予備検討から動物脂肪肥満マウス線条体における DNMT1, 3a の蛋白発現が γ -オリザノール共投与によって有意に減少することが判明しており、DNMTs の転写調節に関わる核内転写因子群の中で γ -オリザノールが作用する可能性のある分子群を reporter gene assay によって探索する。

4. 研究成果

高動物脂肪食肥満モデルマウスや培養神経細胞を用い、肥満症の病態基盤として注目される“動物性脂肪依存”の脳内分子機構の解明と新規の治療法開発に向けた学術基盤の構築を目指し、当初の研究計画を概ね達成できた。

玄米由来機能成分である γ -オリザノールによる GABA 神経入力からのドパミン受容体シグナル修飾の可能性を検討した結果、腹側被蓋野(VTA)から投射する神経回路には報酬と嫌悪の相反する 2 経路が存在し、側坐核(Nac)投射経路は報酬・好みを制御し、前頭前皮質(PFC)投射経路は忌避・嫌悪を制御するが、90%以上が GABA ニューロンで構成される Nac においては、神経終末に局在し GABA 分泌に寄与する GAD65 の発現が mRNA、蛋白ともに γ -オリザノール摂取により顕著に減少した。一方、PFC の GAD65 発現は mRNA、蛋白ともに γ -オリザノール摂取により上昇した。GAD67 の発現も GAD65 同様、 γ -オリザノール摂取により Nac で減少、PFC で上昇した。以上の結果から γ -オリザノールによる GABA 神経入力からのドパミン受容体シグナル修飾が動物性脂肪に対する依存的嗜好の緩和につながる可能性が示唆された。

γ -オリザノールによる脳内報酬系のゲノム修飾作用の分子機序を解析した結果、エピゲノム制御酵素の 1 型 DNA メチルトランスフェラーゼに対して競合的阻害効果を有し、動物性脂肪食の長期間摂取によって亢進する脳内報酬系神経核(線条体)のドパミン受容体遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を有意に減少させ、動物性脂肪に対する嗜好性を軽減することが判明した。この効果は、骨髄異形成症候群に対して既に臨床応用されている DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-aza-デシタピンを用いた場合の効果に匹敵するものであり、 γ -オリザノールによる脳内報酬系のゲノム修飾作用が明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Masuzaki H (senior and corresponding author), Kozuka C, Okamoto S, Yonamine M, Tanaka H, Shimabukuro M
Brown rice-specific γ -oryzanol as a promising prophylactic avenue to protect against diabetes mellitus and obesity in humans
J Diabetes Investig 10:18-25 2019 (査読有)
2. Kozuka C, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Kaku Nakano K, Morinaga H, Kinjo A, Fukuda K, Kamei A, Yasuoka A, Kondo T, Abe K, Egashira K, Masuzaki H (corresponding author).
Marked Augmentation of PLGA Nanoparticle-Induced Metabolically-Beneficial Impact of γ -Oryzanol on Fuel Dyshomeostasis in Genetically Obese-Diabetic *ob/ob* Mice
Drug Delivery 24:558-568, 2017 (査読有)
3. Kozuka C, Kaname T, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Tsutsui M, Matsushita M, Abe K, Masuzaki H (corresponding author).
Impact of Brown Rice-Specific γ -Oryzanol on Epigenetic Modulation of Dopamine D2 Receptor in Brain Striatum of High Fat Diet-Induced Obese Mice
Diabetologia 60:1502-1511, 2017 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

第 22 回 日本摂食障害学会 学術集会

特別講演：食行動をめぐるブレイン・サイエンスの進歩と生活習慣病予防の新たなアプローチ
平成 30 年 11 月 9 日(金)(万国津梁館 沖縄県 名護市)

益崎 裕章

第 39 回 日本肥満学会 合同シンポジウム 3
肥満症治療の最前線：どこまで進歩したのか？
脳科学から見た肥満症の分子病態と臨床応用
平成 30 年 10 月 8 日（月）（神戸国際会議場 兵庫県 神戸市）
益崎 裕章

第 23 回 日本フードファクター学会 学術集会
特別講演：食品機能性成分研究が契機となったエビジェネティック創薬の展開
平成 30 年 9 月 7 日（金）（メルパルク京都 京都府 京都市）
益崎 裕章

第 68 回 日本体質医学会 総会
シンポジウム：健康・長寿を目指す体質と生活を考える
シンポジウム講演：健康長寿社会に求められる食と行動の科学 ～沖縄の取り組みから～
平成 30 年 9 月 1 日（土）（関内 新井ホール 横浜市 中区）
益崎 裕章

第 61 回 日本糖尿病学会 年次学術集会
教育講演 4：中枢神経系におけるインスリン抵抗性と糖代謝制御
平成 30 年 5 月 24 日（木）（東京フォーラム 東京都 千代田区）
益崎 裕章

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 4 件）
名称：代謝改善剤
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-100549
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：血液がんの予防及び / 又は治療剤
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-177405
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：抗血液悪性腫瘍薬
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-211066
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：アルコール依存症の予防薬
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-231249
出願年：2018 年
国内外の別：国内

取得状況（計 6 件）

名称：Metabolic Oncology（がんの糖脂質代謝特性を活用する新規のがん予防・改善戦略）
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：商標登録

番号：第 6015034 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

名称：組成物及び飲食物（ナノ粒子技術を活用した オリザノール効能効果の著しい増強）
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：国際特許
番号：13F088-PCT-EP
取得年：2018 年
国内外の別：国外

名称：高脂肪食への嗜好性を軽減させるための医薬組成物、飲食品組成物または飲食品添加物
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：第 6281919 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

名称：組成物及び飲食物（ナノ粒子技術を活用した オリザノール効能効果の著しい増強）
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：第 6182540 号
取得年：2017 年
国内外の別：国内

名称：高脂肪食への嗜好性を軽減させるための医薬組成物、飲食品組成物または飲食品添加物
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：第 6143215 号
取得年：2017 年
国内外の別：国内

名称：-オリザノール含有機能性食品と糖尿病改善薬
発明者：益崎 裕章
権利者：同上
種類：特許
番号：第 6098973 号
取得年：2017 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<https://www.ryudai2nai.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高山 千利
ローマ字氏名：Takayama Chitoshi
所属研究機関名：琉球大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：60197217

研究分担者氏名：筒井 正人
ローマ字氏名：Tsutsui Masato
所属研究機関名：琉球大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：70309962

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。