

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11088

研究課題名(和文)食品成分は脂肪組織および膵細胞の低酸素による機能障害を軽減できるか

研究課題名(英文)Effect of food ingredients on functional impairment in hypoxia-exposed adipose and pancreatic beta-cells.

研究代表者

松永 哲郎 (Matsunaga, Tetsuro)

武庫川女子大学・食物栄養科学部・准教授

研究者番号：10452286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、各種食品成分(ビタミンE、piceatannol、resveratrol、quercetinなどのポリフェノール)が脂肪細胞(3T3-L1)や膵細胞(INS1-E)の低酸素による炎症やインスリン分泌低下を抑制しうるか検討した結果、脂肪細胞では、炎症応答の多くが、piceatannolの添加により有意に抑制された。ビタミンEについては、種類や添加濃度によってその作用が異なっていた。また、膵細胞では、resveratrol、piceatannol、 $\gamma$ -tocotrienol、quercetinにおいて、低酸素暴露によるインスリン分泌量低下の回復または回復傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満による代謝異常の背景に、脂肪組織の低酸素があり、また、糖尿病の膵細胞においても慢性的な低酸素がインスリン分泌能の低下をもたらしている。低酸素状態(または低酸素で誘導される各因子)の解消によって、その病態は改善されることが予想されるが、低酸素を標的とした食品成分の有効性を調べた研究はほとんど報告がなかった。本研究では、これら細胞の低酸素による機能低下の軽減効果のある食品成分の探索と機序の解明を目指し、一部の食品成分においてその有効性が確認された。今後、動物実験による生体での評価を実施し、効果の確認と投与量の最適化を検証し、糖尿病や肥満への予防効果の高い食品成分の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether various food ingredients (vitamin E, piceatannol, resveratrol, curcumin, and quercetin) have an inhibitory effect on inflammation and decreased insulin secretion of adipocytes (3T3-L1) or pancreatic  $\beta$  cells (INS1-E) due to hypoxia exposure. As a result, in adipocytes, most of the inflammatory response was significantly suppressed by piceatannol. On the other hand, the effects of vitamin E differed depending on the analogs and their concentrations. In pancreatic  $\beta$  cells, resveratrol, piceatannol,  $\gamma$ -tocotrienol, and quercetin showed a recovery or recovery tendency of decreased insulin secretion, insulin and PDX-1 mRNA expressions due to hypoxic exposure.

研究分野：分子栄養学、健康科学

キーワード：低酸素 脂肪細胞 膵細胞 レスベラトロール ピセアタンノール ビタミンE ケルセチン ナリンゲニン

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肥満者の脂肪組織では、血流減少と脂肪細胞の肥大化による酸素拡散不足により低酸素状態にあり、これが肥満によるインスリン抵抗性と密接に関連する。機序として、低酸素により誘導される低酸素誘導因子 (HIF) や HIF により転写制御される低酸素関連因子を主軸としたプロセスにより、炎症性サイトカインの分泌亢進、M1 マクロファージの浸潤促進等を介して低酸素性の炎症が起こり、アディポネクチン分泌低下と相まってインスリン抵抗性を惹起する。

一方、膵細胞では、糖尿病罹患患者では高血糖の持続により糖毒性を呈しており、このことが膵細胞の酸素需要を増大させ、細胞内の低酸素状態を惹起し、先述の HIF (または HIF 非依存性) を介した一連の低酸素応答遺伝子群の発現上昇により、インスリン分泌の低下をもたらす。肥満と糖尿病の双方において、関連組織の低酸素とそれに由来する低酸素ストレスがその病態の基軸にあることが、ここ数年の精力的な研究により明らかとなっている。よって、この低酸素ストレスを軽減することができれば、その病態の改善が見込めるはずである。本研究では、この「低酸素」による機能障害を標的として、それを軽減することのできる食品成分はあるのか、探索と解析を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞・膵細胞における低酸素ストレスを軽減する食品成分を探索し、その機序を明らかにすることを目的とする。

- (1) 脂肪細胞・膵細胞を低酸素環境に暴露し、低酸素ストレスを誘導する。食品成分の事前または同時添加により、低酸素ストレスに由来する機能低下 (アディポネクチン分泌やインスリン分泌の低下など) が軽減するか検討する。
- (2) 軽減効果の認められた食品成分について、その機序を含めた機能解析を実施し、作用点を明らかにする。
- (3) (1) (2) にて効果の期待された成分について、肥満モデル動物・糖尿病モデル動物に経口投与し、低酸素状態の軽減効果を確認する。

以上のステップにより、脂肪組織や膵細胞の低酸素により機能低下を軽減することのできる食品成分が見出され、その機序の解明と生体での効果の有無、将来的な臨床応用への手がかりを提供するものと期待される。

## 3. 研究の方法

- (1) 低酸素に起因する脂肪細胞の adiponectin 分泌低下および炎症に対して抑制作用を有する食品成分の評価

マウス由来線維芽細胞株 3T3-L1 を用いて食品成分の有効性の評価を実施した。食品成分は、先行研究を参照し、ビタミン E (α-Tocopherol、γ-Tocotrienol、δ-Tocotrienol) とスチルベン化合物 (resveratrol・piceatannol) を対象とした。α-Tocopherol、γ-Tocotrienol または δ-Tocotrienol を最終濃度 0.2 μM~20 μM で培養液に添加し、Piceatannol または Resveratrol については最終濃度 3 μM~30 μM で培養液に添加し、低酸素チャンバー (37 °C, 1% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub>・94% N<sub>2</sub>) にて 24 時間、低酸素環境に暴露した。コントロールは、通常の酸素濃度 (37 °C, 21% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub>) にて 24 時間培養した。その後、培養上清を回収し、adiponectin の ELISA 法による測定に用いた。細胞は溶解して RNA を抽出し、mRNA 発現量の測定 (real-time RT-PCR 法) に用いた。mRNA 発現量は、adiponectin、NF-κB、PAI-1、TLR4、小胞体ストレス関連 (ATF4、ATF6、CHOP、XBP-1)、SIRT1 について調べた。

- (2) 膵細胞における低酸素暴露によるインスリン分泌低下に対する改善作用を有する食品成分の評価

ラット由来膵細胞株 INS-1E を用いて食品成分の有効性の評価を実施した。食品成分は、(1) と同様に先行研究を参照し、スチルベン化合物 (resveratrol・piceatannol)、ビタミン E (α-tocopherol、γ-tocotrienol)、curcumin、フラボノイド (naringenin、quercetin) を対象とした。低酸素は、低酸素チャンバー (37 °C、5% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub>・90% N<sub>2</sub>) にて 24 時間、目的の食品成分を添加して低酸素環境に暴露した。コントロールは、通常の酸素濃度 (37 °C、21% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub>) にて 24 時間培養した。resveratrol、piceatannol については最終濃度 10 μM で培養液に添加し、α-tocopherol、γ-tocotrienol、curcumin、naringenin、quercetin については最終濃度 20 μM で培養液に添加し、24 時間培養した。その後、resveratrol、piceatannol については培養上清を回収し、α-tocopherol、γ-tocotrienol、curcumin、naringenin、quercetin については、KRBH バッファーで置換後、16.8 mM のグルコース KRBH バッファーで 37 °C・90 分間インキュベートし、上清を回収した。各上清中のインスリン濃度は、ELISA 法により測定した。細胞は溶解して RNA を抽出し、mRNA 発現量の測定に用いた。mRNA 発現量は、insulin、PDX-1、

GLUT2、GLUT1 について調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 低酸素に起因する脂肪細胞の adiponectin 分泌低下および炎症に対して抑制作用を有する食品成分の評価

(1)- : piceatannol、resveratrol

本研究において、脂肪細胞(3T3-L1)における低酸素暴露によって、抗炎症性サイトカインである adiponectin の分泌量は減少し、炎症性サイトカインの1つである TNF- $\alpha$  の分泌量は増加していた。また、炎症性応答に関連する各種因子(NF- $\kappa$ B、TLR4、PAI-1)や小胞体ストレスに関連する各因子(ATF4、CHOP、XBP-1、ATF6)の mRNA 発現量においても、低酸素暴露により有意に増加していた。低酸素状態の脂肪細胞では、低酸素ストレスによって TLR4 の活性化やそれに続く NF- $\kappa$ B 活性の亢進、後述する小胞体ストレスが惹起されることで、TNF- $\alpha$  をはじめとする炎症性サイトカインの分泌亢進や抗炎症性サイトカインの adiponectin 分泌低下が引き起こされ、さらにそのこと自体がさらなる NF- $\kappa$ B の活性化などの炎症応答の増悪をもたらす悪循環を形成している可能性が示唆される。

本研究で着目した piceatannol は、パッションフルーツやブドウなどに豊富に含まれるポリフェノールの1種である。特にパッションフルーツにはブドウの50倍のポリフェノールが含まれており、抗酸化作用をはじめとして抗がん作用や再灌流不整脈抑制作用、血管拡張作用など様々な効果を有することが報告されている。また、先行研究では、piceatannol において、resveratrol よりも TNF- $\alpha$  の抑制効果がより高いことが報告されており、高血圧症や動脈硬化症などの生活習慣病の予防や病態を改善する手段としてこれらポリフェノールを摂取することの有用性が検討されている。

本研究において、低酸素暴露の脂肪細胞に piceatannol を添加することによって、adiponectin の分泌量は回復し、TNF- $\alpha$  分泌量は有意に抑制された。さらに、多くの炎症応答・小胞体ストレス関連遺伝子の mRNA 発現量が抑制された。しかし、resveratrol の添加においては、adiponectin の分泌量の有意な回復はみられなかった。このことから、本研究により、piceatannol には、脂肪細胞の低酸素状態による炎症応答を有意に抑制する作用があることが初めて示された。さらに、SIRT1 の mRNA 発現量が、低酸素暴露により有意に低下することも初めて明らかになった。一方で、resveratrol や piceatannol は SIRT1 の活性化をもたらし、adiponectin の分泌増加や炎症応答の抑制作用を有することが先行研究で報告されているが、本研究においては、piceatannol 添加によって、低酸素暴露により低下した SIRT1 の mRNA 発現の有意な回復は認められなかった。このことから、低酸素暴露による SIRT1 発現の低下は不可逆である可能性が高いこと、piceatannol による adiponectin 分泌量の回復や炎症応答の軽減には、SIRT1 を介さない経路が関与していることが示唆された。

また、本研究において、piceatannol の添加によって、低酸素による CHOP の発現上昇を有意に抑制し、ATF4、XBP-1、ATF6 の発現においても同様に、piceatannol の添加により抑制されていた。このことから、piceatannol は、小胞体ストレスの緩和およびそれに伴う CHOP の発現抑制を介することによっても、adiponectin の分泌量を回復させた可能性が考えられる。今後、これらのタンパク質レベルでの発現やリン酸化、小胞体ストレス応答に関連するその他の因子に対する影響を詳細に調べることで、piceatannol の脂肪細胞における小胞体ストレスの軽減作用の一端が明らかになるものと期待される。

(1)- : ビタミン E (  $\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocotrienol、 $\delta$ -tocotrienol )

(1) と同様の手順により、ビタミン E 同族体の添加による効果を検討した。ビタミン E は、脂溶性ビタミンの1種であり、主な特徴は強い抗酸化作用を有することである。ビタミン E は tocopherol と tocotrienol に分類され、クロマン環におけるメチル基の有無や数などから、それぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の同族体が存在する。ビタミン E は主に野菜、果実類、油脂類、魚介類、豆類、卵類から摂取でき、一般的に食品からの摂取量が一番多い。ビタミン E の中でも最も抗酸化作用が強いとされる  $\alpha$ -tocopherol は、植物性油やナッツ類に多く含まれている。一方、近年、その機能性が注目されている tocotrienol は、食品への含有量は比較的少ないが、米ぬか油やパーム油に豊富に存在する。ビタミン E の多くは細胞膜および小器官(核、ミトコンドリア、ミクロゾーム)の生体膜に存在し、過酸化脂質の生成を抑制することが、ビタミン E の抗酸化作用の主な役割である。ビタミン E の抗酸化作用は、動脈硬化の進展を抑制することが知られている。一方、近年、ビタミン E として従来注目されてこなかった tocotrienol が、動脈硬化抑制作用、細胞増殖抑制作用 や血管新生抑制作用、神経細胞保護作用などを有することが次々と明らかになり、注目を集めるようになった。

本研究において、 $\alpha$ -tocopherol 添加において、adiponectin の mRNA 発現量は有意に回復し

た。さらに、炎症応答に関連する転写因子(NF- $\kappa$ B)や小胞体ストレスに関連する各因子(CHOP、XBP-1)の mRNA 発現量が有意に抑制された。 $\alpha$ -tocotrienol の添加においては、adiponectin の mRNA 発現量は有意に回復し、NF- $\kappa$ B や ATF4 の mRNA 発現量が有意に抑制された。一方、CHOP、XBP-1 の mRNA 発現量は増加した。 $\alpha$ -tocotrienol では、adiponectin の mRNA 発現量および培養上清への分泌量は回復傾向がみられ、CHOP の mRNA 発現量が有意に抑制された。一方、ATF4 の mRNA 発現量は有意な抑制はみられず、NF- $\kappa$ B、XBP-1 の mRNA 発現量は増加した。

以上の結果から、ビタミン E の各同族体  $\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocotrienol、 $\delta$ -tocotrienol の添加により、脂肪細胞の低酸素状態による adiponectin 分泌量または mRNA 発現量の低下が回復することが明らかとなった。一方、炎症応答や小胞体ストレスに対する作用に関しては、ビタミン E 同族体の違いや添加濃度の違いによって効果には差異が認められたことから、同族体の種類によって異なる作用機序が存在する可能性が示唆された。今後、本研究で研究対象としなかった他のビタミン E 同族体 ( $\beta$ -tocotrienol、 $\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocotrienol、 $\delta$ -tocopherol、 $\beta$ -tocotrienol) についても、脂肪細胞における機能性を調べる必要がある。

(2) 膵細胞における低酸素暴露によるインスリン分泌低下に対する改善作用を有する食品成分の評価

(2)-1: piceatannol、resveratrol

本研究において、ラット膵細胞株 INS-1E への低酸素暴露(5% $O_2$ )によってインスリンの分泌量およびインスリン遺伝子発現量は有意に低下していた。また、インスリン遺伝子の転写因子である PDX-1 の mRNA 発現量においても、低酸素暴露により有意に減少していた。グルコーストランスポーター GLUT2、GLUT1 の mRNA では、先行研究同様、低酸素暴露により GLUT2 の発現量は有意に減少し、GLUT1 の発現量は有意に増加した。

一方、低酸素暴露の膵細胞に resveratrol (10  $\mu$ M) を添加することによって、インスリン分泌量は回復傾向がみられ、insulin mRNA 発現量は有意に回復した。また、PDX-1 mRNA 発現量においても有意な回復がみられた。一方、GLUT2 および GLUT1 mRNA 発現量においては、resveratrol の添加による有意な変化は認められなかった。次に、piceatannol (10  $\mu$ M) の添加においては、インスリン分泌量、mRNA 発現量とともに有意に回復し、PDX-1 発現量も有意に回復していた。GLUT2 発現量にも有意な回復が認められたが、GLUT1 発現量では有意な変化はみられなかった。これらの結果から、resveratrol、piceatannol には、膵細胞における低酸素暴露によるインスリン分泌量低下および遺伝子発現量低下において、回復効果があることが示された。その機序として、insulin 遺伝子の転写因子である PDX-1 の発現量の回復に作用したことが明らかとなった。一方、GLUT2 発現量の回復効果においては、resveratrol よりも piceatannol の方で効果が高く、化学構造の違いによる作用強度の違いが示唆された。

(2)-2: ビタミン E ( $\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocotrienol)、curcumin、naringenin、quercetin

(2)-2 と同様の条件において、INS-1E 細胞について、低酸素暴露の条件下で quercetin (20  $\mu$ M) を添加することによって、グルコース応答性インスリン分泌量は有意に増加し、insulin mRNA 発現量も有意に回復した。また、PDX-1 や GLUT2 mRNA 発現量においても有意な回復がみられ、GLUT1 mRNA 発現量においては有意な増加がみられた。 $\alpha$ -tocotrienol (20  $\mu$ M) の添加においては、グルコース応答性インスリン分泌量は有意な増加がみられたが、関連遺伝子の mRNA 発現量においては有意な回復はみられなかった。これらの結果から、quercetin においては、膵細胞の低酸素暴露によるインスリン分泌量低下および遺伝子発現量低下において、回復効果があることが示され、その機序として、insulin 遺伝子の転写因子である PDX-1 の発現量の回復に作用したことが明らかとなった。一方、 $\alpha$ -tocotrienol においては、これらの遺伝子発現以外への作用を介してインスリン分泌量の増加をもたらした可能性があり、その機序は今後の検討課題である。quercetin の添加による PDX-1 発現量の回復の機序としては、JNK 経路や小胞体ストレス緩和の抑制に作用している可能性が考えられ、核内 PDX-1 の活性量や JNK 活性量の測定、CHOP などの小胞体ストレスマーカーの評価などこれら分子への作用を詳細に検討する必要がある。

2 型糖尿病では高血糖の持続により、酸化ストレス、小胞体ストレス、低酸素ストレスなどが膵細胞内において複雑に交錯している。特に、膵細胞は細胞内のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などの抗酸化酵素が非常に少ないため、酸化ストレスに脆弱であるとされる。そのため、抗酸化作用を有する食品成分について、糖尿病による膵細胞の機能障害に対して改善作用が期待される。今回、低酸素ストレスに対しては、 $\alpha$ -tocotrienol や quercetin がわずかではあるが、インスリン分泌の回復をもたらすことが明らかとなった。今後の課題として、どのような機序によって  $\alpha$ -tocotrienol や quercetin が PDX-1 発現やインスリン回復に作用するのか、HIF や小胞体ストレスなど関連する様々なシグナル伝達機構への作用について調べていく必要がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tetsuro Matsunaga, Kazutaka Nishikawa, Tetsuya Adachi, Koichiro Yasuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Associations between dietary consumption and sleep quality in young Japanese males	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep and Breathing	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） なし	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 Kondoh Takashi, Matsunaga Tetsuro	4. 巻 213
2. 論文標題 Intake and preference for dried bonito dashi in male Sprague-Dawley rats and C57BL/6?N mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 112708 ~ 112708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2019.112708	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 Kondoh Takashi, Yoshimura Mitsuhiro, Sonoda Satomi, Fujihara Hiroaki, Matsunaga Tetsuro, Ueta Yoichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Induction of Fos expression in the rat brain after intragastric administration of dried bonito dashi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutritional Neuroscience	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） 10.1080/1028415X.2019.1670925	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松永哲郎、西塚奈菜恵
2. 発表標題 膵細胞株INS-1細胞における低酸素曝露によりインスリン分泌低下に対するResveratrolおよびPiceatannolの作用
3. 学会等名 第68回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------