

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500619

研究課題名（和文）貯蔵遺伝子発現を指標とした抗酸化食品成分の効果検証系の構築と疾患予防への応用

研究課題名（英文）Studies of food components having anti-oxidant effects on the 'depository gene' expression and its clinical application.

研究代表者

生山 祥一郎（IKUYAMA SHOICHIRO）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：20184393

研究成果の概要（和文）：種々の生活習慣病は過剰な細胞内脂質蓄積に基づく病態といえ、脂質蓄積に働く蛋白を我々は「貯蔵遺伝子」と呼んでいる。動脈硬化に関わるマクロファージと脂肪肝に関わる肝細胞で、貯蔵遺伝子 ADRP と TIP47 に対するフランス海岸松樹皮成分の効果を検討した。いずれの細胞でもこの成分はこれらの遺伝子発現と細胞内脂質蓄積を抑制した。その機序は前者では炎症性転写因子の活性抑制、後者では mRNA 分解促進であった。この成分を1ヶ月間摂取した前後での白血球遺伝子発現を網羅的に解析し、増加 12、減少 64 の遺伝子を抽出した。これらの変動遺伝子の生理的意義は今後の解析課題である。

研究成果の概要（英文）：Excessive intracellular lipid accumulation causes various diseases such as atherosclerosis, fatty liver, etc. Specific proteins as we named 'depository genes' are involved in this process. We tested effects of an extract of French maritime pine, a widely used dietary supplement, on the expression of these genes in macrophages and liver cells. The compound suppressed the gene expression and lipid accumulation in both cells by different molecular mechanisms. We also analyzed the change in mRNA expression in white blood cells before and after ingestion of this compound using DNA microarray analysis. We identified 12 increased and 64 decreased genes, although physiological significance remains to be clarified at this moment.

交付決定額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内分泌代謝学

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：生活習慣病、補完代替医療、健康食品、抗酸化、細胞内脂肪滴、遺伝子転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における高齢者人口の増加、糖尿病・高血圧症・高脂血症などの生活習慣病患者の増加、死因としての癌や脳・心血管病変の増加は実地医療のなかでも特に重大な問

題であり、このような疾病の発症を未然に防ぐことは医療経済の面からも極めて重要である。これらの疾患は医療者のみならず一般の人々の大きな関心事であり、これらに対す

る効果を謳った多種多様な健康食品やサプリメントなどの隆盛をもたらしている。その多くは「体に優しい」、「免疫力増強」、「ストレス緩和」等、科学的に曖昧であるが素人受けはする言葉で喧伝されているため、一般人に対する影響は大きい。したがって、疾患を発症する以前からのセルフケアや発症後のセルフトリートメントとして、これらの食品は利用者個人の自己判断で幅広く用いられている。しかし、その効果や安全性については多くのもので信頼できる科学的検証を欠いており、社会的問題になっている例も少なくない。多くの場合、細胞や個体を用いて有用性を示す生理的变化を確認していないことが科学的信頼性を欠く大きな要因の一つであると思われる。潜在的に利用者が多いという日常診療での経験から、私どもは健康食品やサプリメントの効果を科学的に実証することの重要性を実感し、研究を行ってきた。

(2) 脂質は生体にとって効率的なエネルギー源であるとともに、細胞膜などの構成成分や情報伝達物質の前駆物質などとして多彩な生命現象に必須であるため、すべての細胞は細胞内に脂質を貯える機能をもつ。脂質蓄積に働く遺伝子は細菌、植物、動物のいずれにも存在しており、このような機能を持つ遺伝子群を我々は「貯蔵遺伝子」と名付けた。adipose differentiation-related protein (ADRP)はその一つである。ADRPは多くの細胞で恒常的に発現し、長鎖脂肪酸やコレステロールの細胞内取り込みを促進し細胞内脂肪蓄積を促進する蛋白である。なかでもマクロファージや肝細胞はその発現が高い細胞で、これらの細胞でのADRP過剰発現による病的状態が脂肪肝や動脈硬化であるといえる。実際、これらの病巣ではADRPが過剰に発現していることが病理組織学的に示されている。また、ADRP遺伝子をマウスに過剰発現させると、脂肪肝を発症する。一方、ADRPノックアウトマウスやsiRNA法によりADRP遺伝子の発現を抑制すると脂肪肝の発症が抑制されることが最近示されている。

(3) 我々はこれまでの研究で、ADRPは種々の細胞で恒常的に発現し脂質が存在しない場合には直ちにプロテアソーム系で分解されることや、ADRP遺伝子のプロモーターに脂質や炎症に応答するエレメントが存在することを解明し、その作動メカニズムを明らかにしてきた。この知見を臨床に応用する目的で、動脈硬化による心血管イベントが最大の死因である糖尿病と慢性炎症である関節リウマチの患者において、予備的な研究として、末梢白血球におけるADRP mRNAの発現量を定量PCR法により測定した。その結果、ADRP

mRNAの発現量には大きな個人差があること、また、糖尿病や関節リウマチの患者では健康人に比較してその発現量が有意に高いことを見出した。酸化ストレスは老化、発癌、動脈硬化をはじめ、多彩な疾病の発症・進展に関わっている。我々は培養細胞系で酸化ストレスや脂肪酸がADRP発現を促進し、抗酸化作用を有する食品成分がこれを抑制することを見出した。このような研究成果に基づくと、酸化ストレスの標的遺伝子のなかでもADRP遺伝子は発現量が多く測定が容易であり、抗酸化作用を有する食品成分の生理的効果の検証に応用することが可能であると考えられた。また、抗酸化食品成分がヒトにおいてADRPなどの貯蔵遺伝子発現を抑制するならば、脂肪肝や動脈硬化の発症・進展予防効果の裏づけとして理解されることから、その臨床的有用性が期待できると考えられた。

## 2. 研究の目的

### (1) ADRP 遺伝子発現に及ぼす抗酸化食品成分の作用機構の解析

抗酸化食品成分がADRP遺伝子発現を抑制する分子生物学的機序を明らかにする。これに基づいて、マクロファージや肝細胞におけるADRP遺伝子発現の抑制を指標とする抗酸化食品成分の作用を検証する系を構築する。

### (2) マイクロアレイ解析を用いた機能性食品の抗酸化作用の検証手段の開発

ヒトにおける抗酸化食品成分の臨床的有用性を検証する系を構築するために、末梢白血球を用いて、抗酸化食品成分により変動する遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析する。

## 3. 研究の方法

(1) マクロファージおよび肝細胞の培養細胞系において、種々の抗酸化食品成分の貯蔵遺伝子ADRP発現に対する効果を明らかにする。ADRP発現に影響を与えた成分について、その作用機序に関する分子生物学的な解析を行う。

(2) 上記(1)で作用を認めたサプリメント成分を1ヶ月間摂取した場合の末梢白血球における変動遺伝子を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。

## 4. 研究成果

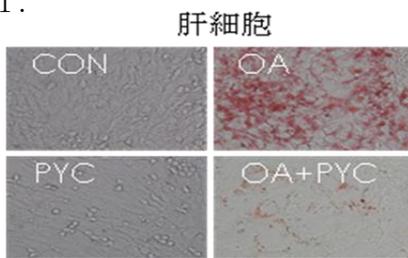
(1) 動脈硬化発症に深く関わるマクロファージRAW264.7細胞において炎症性刺激はADRP発現を強く増強したが、フランス海岸松樹皮抽出物(PYC)はADRP発現を用量依存的に抑制した。この機序は、①PYCがADRP遺伝子のプロモーター活性を抑制する直接作用と、②マクロファージからの炎症性サイトカイン分

泌を抑制する間接作用の両面であることを示した。さらにこの研究では、①②を惹起する機序は炎症性転写因子 AP-1 と NFκB の転写活性化能を抑制することにあるが、PYC はこれらの転写因子の機能を何らかの epigenetic な制御で調節している可能性を示した (論文⑥)。

さらに、マクロファージにおける炎症性刺激は別の貯蔵遺伝子 TIP47 の発現も増強するが、TIP47 は主として中性脂肪の蓄積に重要な役割をもつことを明らかにした (論文①)。

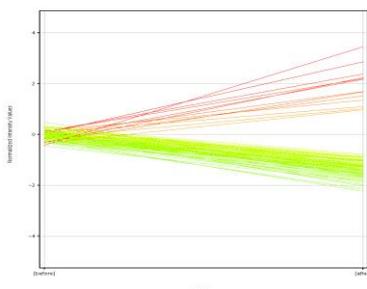
(2) 肝細胞 NMuLi 細胞において、遊離脂肪酸は ADRP 発現を増強し、この機序には ADRP 遺伝子プロモーターの PPAR 応答配列を介する活性増強に関わるが、この PPAR 応答配列が機能するためには、我々がすでに明らかにした上流の Ets/AP-1 応答配列の存在が必須であることを示した。この結果は ADRP 遺伝子が炎症と代謝との接点であること意味する。さらに遊離脂肪酸による ADRP 発現と細胞内脂肪蓄積はフランス海岸松樹皮抽出物 (PYC) により有意に抑制された (図 1. OA vs. OA+PYC)。この機序は ADRP mRNA の分解促進であることを明らかにした。このことは PYC のような天然化合物複合体は genetic にも epigenetic にも作用することを示している (論文②)。

図 1.



(3) 上記研究により、フランス海岸松樹皮抽出物 (PYC) の作用に関する基礎的基盤が明らかになった。本成分はすでに抗酸化サプリメントとして一般に利用されているため、この成分を摂取した場合の末梢血白血球における遺伝子発現を網羅的に解析した。PYC120mg/日を 1 ヶ月間摂取した前後で白血球より RNA を抽出しマイクロアレイ解析に供したところ、増加した遺伝子 12 個、減少した遺伝子 64 個を同定した (図 2. 赤: 増加、緑: 減少)。

図 2.



これらの変動を示した遺伝子はその機能がまだ明らかでないものが多い。これらの遺伝子の機能や変動の生理的意義については、今後の解析が必要である (論文未発表)。

### 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 7 件)

- ① Gu JQ, Wang DF, Yan XG, Zhong WL, Zhang J, Fan B, Ikuyama S.  
A Toll-like receptor 9-mediated pathway stimulates perilipin 3 (TIP47) expression and induces lipid accumulation in macrophages.  
*Am J Physiol Endocrinol Meta* (査読有), 299:E593-E600, 2010.
- ② Fan B, Ikuyama S, Gu JQ, Wei P, Oyama J-I, Inoguchi T, Nishimura J.  
Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR-response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells.  
*Am J Physiol Endocrinol Metab* (査読有), 297:E112-E123, 2009.
- ③ Ikuyama S, Imamura-Takase E, Tokunaga S, Oribe M, Nishimura J.  
Sixty percent of patients with rheumatoid arthritis in Japan have used dietary supplements or health foods.  
*Modern Rheumatol* (査読有), 19:253-259, 2009.
- ④ Ikuyama S, Imamura E.  
Dietary supplement use in patients with rheumatoid arthritis in Japan.  
*Current Rheumatology Reviews* (査読有), 5:241-245, 2009.
- ⑤ Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Shirayoshi Y, Yamamoto Y, Miake J, Ohkura T, Akama T, Igawa O, Shigemasa C, Kamijo K, Ikuyama S, Caturegli P, Suzuki K.  
Pendrin is a novel autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid diseases.  
*J Clin Endocrinol Metab* (査読有), 94:442-448, 2009.
- ⑥ Gu JQ, Ikuyama S, Wei P, Fan B, Oyama J-I, Inoguchi T, Nishimura J.  
Pycnogenol, an extract from French maritime pine, suppresses Toll-like

receptor 4-mediated expression of adipose differentiation-related protein in macrophages.  
Am J Physiol Endocrinol Metab (査読有), 295:E1390-E1400, 2008.

- ⑦ Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S-I, Ikuyama S, Ito T, Ishii N.  
Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*.  
FEMS Microbiol Lett (査読有), 289: 72-79, 2008.

[学会発表] (計10件)

- ① Ikuyama S, Wang Z, Fan B.  
Pycnogenol, an extract from French maritime pine, suppresses osteoclast differentiation.  
14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology  
3/26-30, 2010, Kyoto, Japan.
- ② Suzuki J, Ueno M, Kimura T, Imagawa M, Zenimaru Y, Takahashi S, Ikuyama S, Kraemer FB, Miyamori I.  
Function of adipose differentiation-related protein (ADRP) in myocardial steatosis  
14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology  
3/26-30, 2010, Kyoto, Japan.
- ③ Ikuyama S, Wang Z, Fan B.  
Pycnogenol, an extract from French maritime pine, suppresses osteoclast differentiation.  
14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology  
3/26-30, 2010, Kyoto, Japan.
- ④ Ikuyama S, Gu JQ, Nishimura J.  
Pycnogenol<sup>R</sup>, an extract from the bark of maritime pine, suppresses the expression of Toll-like receptor 4-mediated ADRP expression in macrophages.  
90th Annual Meeting of The Endocrine Society  
6/15-6/18, 2008, San Francisco, USA.
- ⑤ 范 斌、生山祥一郎、谷 劍秋、井口登與志、西村純二.  
ピクノジェノールによる肝細胞の細胞内脂肪滴形成の抑制

第52回日本糖尿病学会年次学術集会  
5/21-5/24, 2009, 大阪.

- ⑥ 鈴木仁弥、上野勝巳、木村朋子、今川美智子、銭丸康夫、高橋貞夫、生山祥一郎、宮森 勇.  
心筋 Adipose differentiation-related protein (ADRP) の機能  
第52回日本糖尿病学会年次学術集会(プレジデントポスターセッション)  
5/21-5/24, 2009, 大阪.
- ⑦ 生山祥一郎、范 斌、西村純二.  
ピクノジェノールは肝細胞での細胞内脂肪滴蛋白 ADRP の発現を抑制する  
第82回日本内分泌学会学術総会  
4/23-4/25, 2009, 前橋.
- ⑧ 生山祥一郎、谷 劍秋、西村純二.  
ピクノジェノールはマクロファージにおける TLR-4 を介する細胞内脂肪滴蛋白 ADRP の発現を抑制する  
第11回日本補完代替医療学会学術集会  
11/8-11/9, 2008, 横浜.
- ⑨ 谷 劍秋、生山祥一郎、西村純二.  
ピクノジェノールはマクロファージの細胞内脂肪滴蛋白 ADRP の発現を抑制する  
第51回日本糖尿病学会年次学術集会  
5/22-5/24, 2008, 東京.
- ⑩ 西川 寛、生山祥一郎、大庭功一、高瀬恵美子、西村純二.  
骨関節疾患患者におけるサプリメント利用の実態-薬剤性肝障害を発症した変形性膝関節症(OA)の1例  
第18回日本老年医学会九州地方会  
3/1, 2008, 福岡.

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等

大分合同新聞 2011年5月 掲載予定  
特集「からだを読み解く—九大病院別府病院の研究から」  
生山祥一郎：「貯蔵遺伝子」の制御と生活習慣病予防

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

生山 祥一郎 (IKUYAMA SHOICHIRO)  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：20184399

### (2) 研究分担者

大庭 功一 (OBA KOICHI)  
九州大学病院・助教  
研究者番号：50444857