

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580136

研究課題名（和文） 脂肪細胞の機能制御を軸とする包括的抗メタボリックシンドローム機能性食品の開発

研究課題名（英文） Studies on functional foods for anti-metabolic syndrome based on regulation of adipocytes' functions

研究代表者

照屋 輝一郎 (TERUYA KIICHIRO)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：10273971

研究成果の概要（和文）：

脂肪・筋肉細胞を基に抗メタボリックシンドローム *in vitro* 培養細胞評価系を構築した。構築した評価系を用い、候補の機能性食品群より抗メタボリックシンドローム効果の検索を行った。(1) 転写因子 C/EBP α , β , δ 、そして PPAR γ の発現量低下を介した脂肪細胞分化抑制機能、(2) AMP-activated protein kinase 活性化を介した筋管細胞脂肪酸 β 酸化増強効果、(3) 脂肪細胞のアディポネクチンの発現量増加と TNF- α 発現量減少効果、に代表される発酵乳ケフィアの有効性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In vitro evaluation systems for anti-metabolic syndrome using adipocytes and myotubes were established. Anti-metabolic syndrome effects were investigated from candidates of functional food components by using the *in vitro* evaluation systems. The effectiveness of fermented milk, Kefir was revealed. (1) suppression of adipogenesis *via* down-regulations of transcription factors C/EBP α , β , δ and PPAR γ expressions. (2) Enhancement of fatty acid beta oxidation in myotubes by activation of AMP-activated protein kinase. (3) Up-regulation of adiponectin expression and down-regulation of TNF- α expression in differentiated adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：メタボリックシンドローム，機能性食品，細胞・組織，シグナル伝達，発現制御

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MS) とは動脈硬化による循環器病 (心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症など) を個々の疾病としてではなく、包括的にとらえ、そして予防するための概念として提唱されたもので

あり、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、高脂血症のうちいずれか2つ以上を併せもった状態と定義されるようになった。このMSは現代人のライフスタイル、即ち、過栄養、運動不足、ストレス過剰、高脂肪食過剰摂取という生活習慣の変化に伴い、その発症

頻度は急速に増加している。

これまでの国内外の研究により、体内の脂肪細胞の機能に関しては従来までの過剰エネルギーの“貯蔵庫”という役割のほかにも、さまざまな生理活性物質を分泌する“内分泌細胞”としての役割をもつことが明らかにされてきた。この脂肪細胞から分泌される生理活性物質は「アディポサイトカイン」と呼ばれており、正に働くアディポネクチンや負に働く TNF- α などが知られている。内臓脂肪型肥満における体内でのアディポサイトカイン分泌バランスの崩壊が MS である。また MS は現代日本の三大死因であるガン・心疾患・脳血管疾患のうち二つに密接に関連している。日本人死亡原因の 4 人に 1 人はガンであるが、同じく 4 人に 1 人は MS が進展した循環器病で死亡したと考えることができ、今後重点的な研究と対策が必要とされている分野である。

2. 研究の目的

脂肪細胞の内分泌器官としての機能の研究はこの十年程度のものであり、様々な知見の集積が必要とされている分野である。メタボリックシンドローム (MS) で優性となる悪玉アディポサイトカインは活性酸素種生成を促進し生体に過剰な酸化ストレスを与えることで、体内の細胞の酸化ストレスを増大させる。MS においては、生体内細胞が酸化ストレスによりダメージを受けていると考えられる。そこで第一に、細胞の抗酸化ストレスシステムを賦活化により酸化ストレス障害から防御できる物質の探索・開発が、第二に MS のトリガーを引く脂肪細胞、特に内臓脂肪細胞の内分泌機能の制御を可能とする物質の探索・開発これら二点が MS の発症予防・重篤化遅延に非常に有効であると考えられた。

本研究課題では脂肪細胞の内分泌器官としての機能制御に定め、MS の発症予防・症状進展抑制を目的として、アディポサイトカイン生成を指標とした、脂肪細胞機能制御成分の探索・同定、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化制御成分の探索・同定、筋肉細胞での β 酸化増強能を指標に、脂肪燃焼促進物質の単離・同定、加えて、活性物質の作用点を明確にするための検討を行った。上記各項に関する効果を *in vitro* では培養細胞システムにおいて、また *in vivo* では動物実験において明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化を制御する成分の探索・同定

3T3-L1 前駆脂肪細胞は細胞の接触阻止による増殖停止、細胞内 cAMP 濃度の上昇、そしてグルココルチコイドの刺激により成熟

脂肪細胞へと分化する。この 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪細胞分化を制御する食品成分の探索・同定を試みた。細胞分化に及ぼす効果は脂肪蓄積量、脂肪細胞分化のマスタ遺伝子である PPAR γ の発現変化を評価した。

(2) 脂肪細胞の機能を制御する成分の探索・同定

脂肪細胞は中性脂肪の蓄積とアディポサイトカイン生成・分泌という機能を持っている。中性脂肪の過剰蓄積は脂肪細胞の悪性化を促進し、アディポサイトカインバランスの崩壊につながる。そこで、3T3-L1 脂肪細胞の中性脂肪蓄積機能を制御する食品成分の探索・同定を試みた。またアディポサイトカインに関しては、善玉アディポサイトカインとして知られているアディポネクチンや悪玉アディポサイトカインとして知られている TNF- α などの発現変化を評価した。

(3) 筋肉細胞の脂肪酸燃焼機能を制御する成分の探索・同定

筋肉での脂肪酸燃焼は AMP-activated protein kinase (AMP キナーゼ) により制御されているため、AMP キナーゼを活性化できる食品成分の探索・同定を試みた。AMP キナーゼはタンパク質リン酸化により活性制御されていることからリン酸化 AMP キナーゼのイムノブロットングにより検討を行った。また細胞自身の脂肪酸燃焼機能は最終的に RI 標識した脂肪酸を用い、 β 酸化により生じる CO₂ 量を測定することにより行った。

(4) 筋肉細胞のグルコース取り込み機能を制御する成分の探索・同定

細胞外のグルコースを筋肉細胞内に取り込むことは筋肉の重要な機能の一つである。そこでグルコースの細胞内取り込み活性を増強する食品成分の探索・同定を試みた。

(5) メタボリックシンドロームのモデル動物を使用した動物実験による包括的な抗メタボリックシンドローム機能を有する機能性食品の評価

メタボリックシンドロームモデルマウスを用い、本研究で得られた包括的な抗メタボリックシンドローム効果を *in vivo* で評価した。

4. 研究成果

脂肪細胞分化抑制効果を検討するにあたり、フローサイトメーターや BODIPY493/503 染色による IN Cell Analyzer 1000 を用いた脂肪細胞分化度の定量的な評価法の確立を行った。その結果、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導初期において、発酵乳ケフィア由来水溶性画分は処理濃度依存的に細胞内脂肪蓄積量と脂肪滴数の減少が確認された (図 1)。この現象が脂肪細胞分化抑制効果であることを明らかにするため、脂肪細胞の分化マーカーである PPAR γ や aP2 遺伝子の発現を RT-PCR により確認したところ、発酵乳

ケフィア処理により分化マーカーaP2 遺伝子 大幅な発現量低下が確認された (図2)。

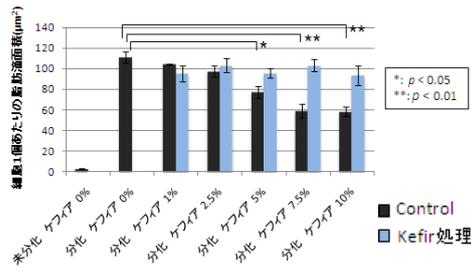


図1 発酵乳ケフィア水溶性画分の脂肪細胞分化抑制効果

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導処理時から6日間のケフィア処理を行った細胞と、分化3日目から3日間のケフィア処理を行ったサンプル。分化6日目に IN Cell Analyzer 1000 で測定を行い、それぞれのサンプルにおける細胞1個あたりの細胞内脂肪滴面積をグラフ化した。

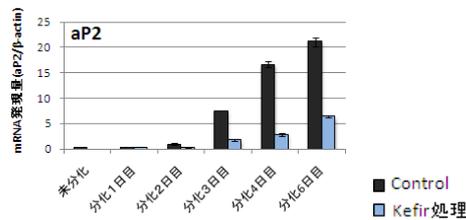


図2 発酵乳ケフィアが aP2 の発現に及ぼす効果

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導処理時から3日間のケフィアサンプル処理を行い、細胞を分化0、1、2、3、4、6日目に回収した。aP2 遺伝子の発現量を Real Time PCR を用いて検討した。

発酵乳ケフィア由来水溶性画分は、脂肪細胞分化時に発現する転写因子 C/EBPα, β, δ、PPARγ の発現量を低下させることが確認された (図3、図4)。細胞内 cAMP レベル上昇処理は、濃度依存的に発酵乳ケフィア由来水溶性画分の脂肪細胞分化抑制効果を低下させたことより、脂肪細胞の分化誘導初期の細胞内 cAMP レベル上昇阻害を介して、C/EBPβ, δ の発現を抑制し、脂肪細胞分化抑制効果を示すと考えられた。

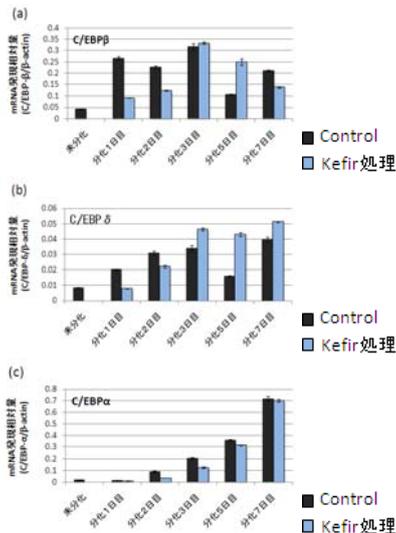


図3 発酵乳ケフィアが C/EBPファミリーの発現に及ぼす効果

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導処理時から3日間のケフィアサンプル処理を行い、細胞を分化0、1、2、3、5、7日目に回収し、遺伝子発現量を Real Time PCR を用いて検討した。(a)C/EBPβ、(b)C/EBPδ、(c)C/EBPα。

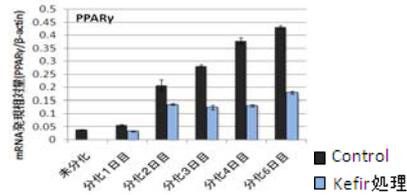


図4 発酵乳ケフィアが PPARγ の mRNA 発現に及ぼす効果

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導処理時から3日間のケフィアサンプル処理を行い、細胞を分化0、1、2、3、4、6日目に回収した。PPARγ 遺伝子の発現量を Real Time PCR を用いて検討した。

3T3-L1 脂肪細胞のアディポサイトカインの発現に及ぼす発酵乳ケフィア画分の影響を検討した結果、通常時と酸化ストレス負荷時の双方において、発酵乳ケフィア由来脂溶性画分、水溶性高分子画分、そして水溶性低分子画分の各々の処理区において、抗糖尿病効果などを有する善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの発現量増加と、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病を誘発させる悪玉アディポサイトカインである TNF-α の発現量減少が確認された (図5)。

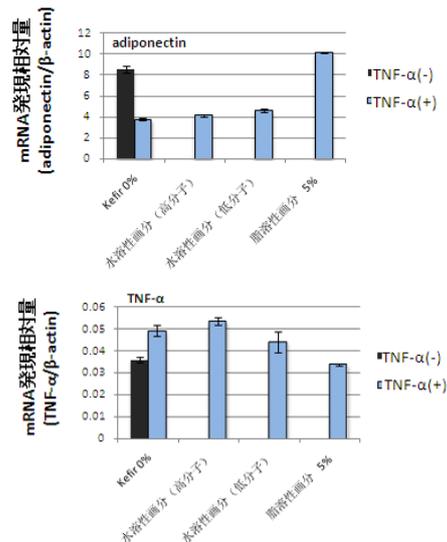


図5 TNF-α 処理によるストレス負荷脂肪細胞に対する発酵乳ケフィアの脂肪細胞機能向上効果

分化19日目の3T3-L1脂肪細胞にケフィア高分子画分処理を24時間行った後、5 ng/ml TNF-α 処理を12時間行い、細胞を回収した。Adiponectin、および TNF-α 遺伝子の発現量を Real Time PCR を用いて検討した。

マウス C2C12 筋管細胞およびラット L6 筋管細胞において、細胞のエネルギー代謝に重要な働きを持つ AMP-activated protein kinase (AMP キナーゼ) の活性化状態をリン酸化 AMP キナーゼに対するウェスタンブロッティング法により検討したところ、発酵乳ケフィアが AMP キナーゼ活性化作用を示すことを明らかにした (図6)。

発酵乳ケフィア由来水溶性画分は筋管細胞へのグルコース取り込み促進活性を示した。インスリンシグナル経路と本活性の関与を検討したところ、PI 3-キナーゼを介したイ

インスリン様の作用と PI 3-キナーゼを介さない非インスリン様の作用の二面性を持つことが明らかとなった (図 7)。また AMP キナーゼ活性化を介したグルコース取り込み促進効果の存在が示唆された (図 8)。またマウス C2C12 筋管細胞において、発酵乳ケフィアが脂肪酸 β 酸化増強効果を有することを明らかにした (図 9)。発酵乳ケフィア由来水溶性画分の処理により脂肪酸 β 酸化関連遺伝子群の mRNA 発現量の上昇が確認された (図 10)。発酵乳ケフィア由来水溶性画分の脂肪酸 β 酸化亢進効果はこれらの複合的な作用の結果生じるものと考えられた。以上の結果より発酵乳ケフィアには AMP キナーゼ活性化を介したエネルギー代謝亢進活性物質が含有されていることが示唆された。

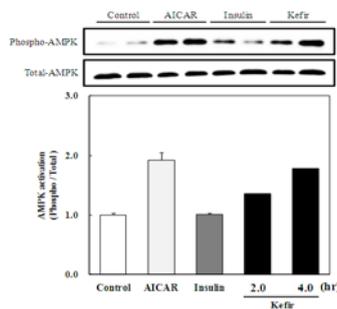


図 6 L6 筋管細胞に対する発酵乳ケフィアの AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化効果
L6 筋管細胞を分化誘導後、ケフィアサンプル処理を 2, 4 時間行い、Western Blotting により AMPK 活性を評価した

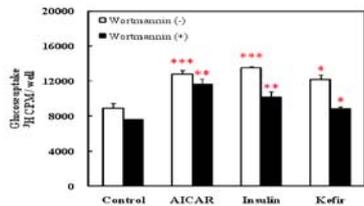


図 7 C2C12 筋管細胞のグルコース取り込みに及ぼす発酵乳ケフィアの効果：PI 3-キナーゼ阻害の影響
C2C12 筋管細胞を分化誘導後、ケフィアサンプル処理を 4 時間行い、グルコース取り込み能測定を行った。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control)

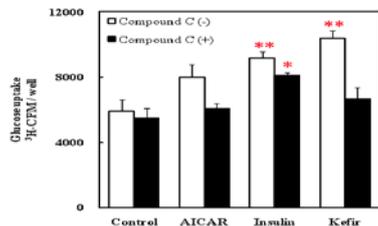


図 8 C2C12 筋管細胞のグルコース取り込みに及ぼす発酵乳ケフィアの効果：AMPK 阻害の影響
C2C12 筋管細胞を分化誘導後、ケフィアサンプル処理を 4 時間行い、グルコース取り込み能測定を行った。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control)

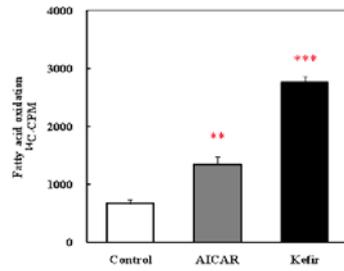


図 9 C2C12 筋管細胞の脂肪酸 β 酸化に及ぼす発酵乳ケフィアの効果
C2C12 筋管細胞を分化誘導後、ケフィアサンプル処理を 2 時間行い、脂肪酸 β 酸化活性を測定した。(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control)

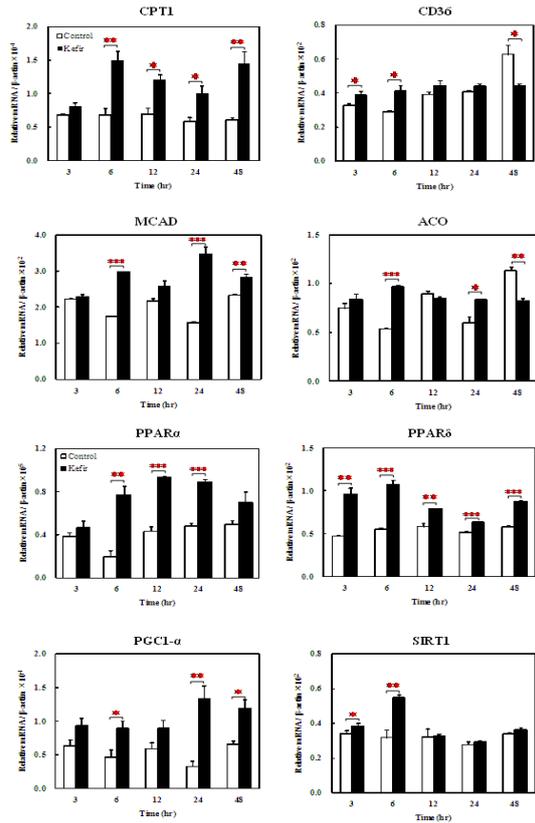
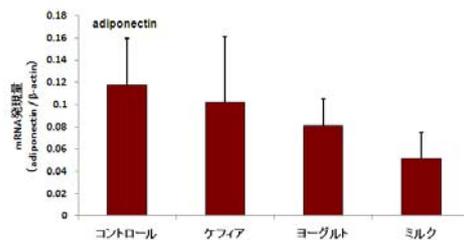


図 10 発酵乳ケフィアが脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の mRNA 発現に及ぼす効果
C2C12 筋管細胞にケフィアサンプル処理を行い Real Time PCR を用いて mRNA 発現量を検討した。

メタボリックシンドロームモデルマウスを用い検討したところ、本研究で得られた包括的な抗メタボリックシンドローム効果が *in vivo* レベルで確認できた (図 11)。



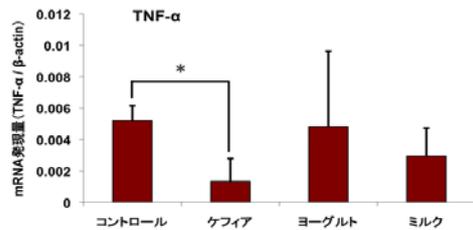


図1 1 発酵乳ケフィアが KK-A^Y マウスの脂肪組織の adipocyte 遺伝子 mRNA 発現に及ぼす効果
KK-A^Y 雄マウスに 6 週間ケフィア添加飼料を与え、組織回収後 Real Time PCR を用いて mRNA 発現量を検討した。(**p* < 0.05 vs control)

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 4 件)

1. K. Tomimatsu, S.E. Matsumoto, M. Yamashita, K. Teruya, Y. Katakura, S. Kabayama, S. Shirahata. Production of human monoclonal antibodies against FcεRIα by a method combining *in vitro* immunization with phage display. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読あり), **73**(7):1465-1469 (2009).
2. T. Fujiki, A. Tsuji, S.E. Matsumoto, M. Yamashita, K. Teruya, S. Shirahata, Y. Katakura. Generation of a human anti-tumor necrosis factor-α monoclonal antibody by *in vitro* immunization with a multiple antigen peptide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読あり), **74**(9):1836-1840 (2010).
3. H. Yan, H. Tian, T. Kinjo, T. Hamasaki, K. Tomimatsu, N. Nakamichi, K. Teruya, S. Kabayama, S. Shirahata. Extension of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by the use of electrolyzed reduced water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読あり), **74**(10):2011-2015 (2010).
4. Y. Li, T. Hamasaki, N. Nakamichi, T. Kashiwagi, T. Komatsu, J. Ye, K. Teruya, M. Abe, H. Yan, T. Kinjo, S. Kabayama, M. Kawamura, S. Shirahata. Suppressive effects of electrolyzed reduced water on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Cytotechnology* (査読あり), **63**(2):119-131 (2011).

[学会発表] (計 46 件)

1. H. Yan *et al.* (9 名), (2008) Elongation of lifespan of nematode by electrolyzed reduced water. 2008 年 11 月, The 21st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2008) (Fukuoka, Japan).

2. Y. Matsuda *et al.* (11 名), (2008) Anti-cancer effects of enzyme-digested fucoidan extract from seaweed Mozuku. 同上.
3. K. Tomimatsu *et al.* (7 名), (2008) Production of human monoclonal antibodies against FcεRI alpha by a method combining *in vitro* immunization with phage display. 同上.
4. K. Osada *et al.* (9 名), (2008) Anti-diabetes effects of natural reduced water. 同上.
5. M. Abe *et al.* (9 名), (2008) Suppressive effect of electrolyzed reduced water on lipid peroxidation and lipid absorption. 同上.
6. K. Haramaki *et al.* (7 名), (2008) "Suppressive effects of hydrogen and atomic hydrogen on type 2 diabetes. 同上.
7. K. Nakanishi *et al.* (8 名), (2008) Growth suppression of HL60 and L6 cells by atomic hydrogen. 同上.
8. K. Teruya and S. Shirahata (2008) Enzyme-digested Fucoidan Extract from Seaweed Mozuku enhances sensitivity of lectin-induced apoptosis of tumor cells. 2008 年 10 月, The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Nagoya, Japan).
9. 服巻佳佑ら (10 名), (2008) 電解還元水及びそのモデル水の抗糖尿病効果. 2008 年 9 月, 2008 年度 日本農芸化学会西日本支部大会 (長崎).
10. 嘉手苺佳太ら (11 名), (2008) 電解還元水及びそのモデル水のガン細胞死誘導効果. 同上.
11. S. Shirahata *et al.* (7 名), (2007) Anti-cancer Effect of Enzyme-digested Fucoidan Extract from Seaweed Mozuku. 2008 年 6 月, World Congress on In Vitro Biology (Tucson, Arizona, USA).
12. 山下万貴子ら (9 名) (2008) 体外免疫法を用いたヒト免疫賦活作用を有する乳酸菌の検索. 2008 年 5 月, 日本食品免疫学会 第 4 回学術大会 (東京).
13. 細川 歩ら (11 名), (2009) 電解還元水及びそのモデル水によるレドックス制御. 2009 年 3 月, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡).
14. 杉本 昌紀ら (7 名), (2009) 酵素消化低分子フコイダン抽出物の抗腫瘍活性増強効果. 同上.
15. 東 誠一郎ら (8 名), (2009) NKG ケフィアによるエネルギー代謝亢進効果. 同上.
16. 加藤 恵美子ら (7 名), (2009) NKG ケフィアによる細胞 DNA 障害抑制効果. 同上.
17. 中村 拓郎ら (11 名), (2009) 電解還元水及びそのモデル水の抗糖尿病効果の検

- 討. 同上.
18. 晏 涵虚ら (9 名), (2009) 酸化ストレス抑制効果を持つ電解還元水による線虫の寿命延長. 同上.
 19. 嶋山 克彦ら (11 名), (2009) 原子状水素によるガン細胞死誘導機構. 同上.
 20. 松田 誉子ら (6 名), (2009) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物によるガン細胞アポトーシス誘導効果. 同上.
 21. K. Tomimatsu *et al.* (7 名), (2009) Efficient production of human monoclonal antibodies against Fc ϵ RI α by combining in vitro immunization with phage display. 2009 年 6 月. The 21st Meeting of European Society for Animal Cell Technology (Dublin, Ireland).
 22. S. Shirahata and K. Teruya (2009) Induction of apoptosis of cancer cells by atomic hydrogen produced by catalyst activity of platinum nonparticles. 2009 年 10 月. 第 68 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜).
 23. 杉本昌紀ら (7 名), (2009) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物による抗腫瘍効果. 2009 年 10 月. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部, 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部, 日本食品科学工学会西日本支部 2009 年度合同沖縄大会 (沖縄県中頭郡西原町).
 24. 加藤恵美子ら (7 名), (2009) 発酵乳 NKG ケフィアによる細胞 DNA 障害抑制効果. 同上.
 25. 中村 拓郎ら (9 名), (2009) 電解還元水モデル水の抗糖尿病効果の検討. 2009 年 11 月. 第 8 回日本機能水学会学術大会 (富山県富山市).
 26. 嶋山 克彦ら (11 名), (2009) 原子状水素によるガン細胞死誘導機構の解析. 同上.
 27. 晏 涵虚ら (7 名), (2009) 線虫に及ぼす電解還元水の延命効果. 同上.
 28. 門岡 桂史ら (11 名), (2009) ナノ粒子の生体における有効性及び毒性の解析. 同上.
 29. 細川 歩ら (7 名), (2009) 電解還元水モデル水によるレドックス制御. 同上.
 30. 東 誠一郎ら (5 名), (2010) 発酵乳 NKG ケフィアがエネルギー代謝に及ぼす効果. 2010 年 3 月. 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京都目黒区).
 31. 宮永 美帆ら (6 名), (2010) 発酵乳 NKG ケフィアが脂肪細胞機能に及ぼす効果. 同上.
 32. 谷口 薫ら (6 名), (2010) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤併用による抗腫瘍効果の増強. 同上.
 33. 富松 航佑ら (8 名), (2010) 動物細胞ディスプレイ法を用いたヒトモノクローナル抗体作製系の開発. 同上.
 34. 浜崎 武記ら (8 名), (2010) 電解還元水モデルとしての水素及び Pt ナノ粒子含有水による抗糖尿病効果の検討. 同上.
 35. 釜谷 翔太ら (10 名), (2010) 水素及び Pt ナノ粒子によるガン細胞死誘導機構の解析. 同上.
 36. 門岡 桂史ら (9 名), (2010) ナノ粒子の細胞毒性及びレドックス関連遺伝子発現への影響. 同上.
 37. 金城 智也ら (8 名), (2010) 電解還元水モデルとしての水素及び Pt ナノ粒子含有水によるレドックス制御. 同上.
 38. H. Yan *et al.* (7 名), (2010) The mechanism of lifespan elongation of nematode by electrolyzed reduced water. 2010 年 9 月, The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (Sapporo, Japan).
 39. T. Kinjo *et al.* (8 名), (2010) Effects of hydrogen and platinum nanoparticles on the redox regulation in animal cells. 同上.
 40. K. Tomimatsu *et al.* (7 名), (2010) 同上.
 41. K. Teruya and S. Shirahata (2010) Induction of cancer cell-specific cell death and alteration of sugar chain synthesis pathways by fucoidan extract. 2010 年 9 月. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪).
 42. 栗田真衣ら (7 名), 発酵乳 NKG ケフィアによる筋肉・脂肪細胞機能の制御. 2011 年 3 月. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都).
 43. 金城智也ら (7 名), 水素及び Pt ナノ粒子含有水によるレドックス制御機構の解析. 同上.
 44. 中西秀和ら (8 名), 細胞内レドックス制御に及ぼすナノ粒子の影響. 同上.
 45. 山川智寛ら (8 名), 水素化サンゴカルシウムの抗酸化活性. 同上.
 46. Zhongyuan Zhang *et al.* (4 名), Fucoidan extract induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells involving ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathway. 同上.
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 照屋 輝一郎 (TERUYA KIICHIRO)
 九州大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号: 10273971