

平成 22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880032  
 研究課題名（和文） 脂肪細胞におけるフラボノイドのTLRシグナルを介した炎症制御機構の  
 解明  
 研究課題名（英文） Effects of flavonoids on TLR-mediated inflammatory changes in  
 adipocytes  
 研究代表者  
 吉田 裕樹（YOSHIDA HIROKI）  
 九州保健福祉大学・薬学部・助教  
 研究者番号：90469411

研究成果の概要（和文）：脂肪組織における炎症性変化の増悪は、インスリン抵抗性を基盤とする糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症・進展に深く関与している。従って、脂肪細胞の炎症制御機構を解明することは、病態予防・改善を考える上で重要である。本研究では、脂肪細胞の炎症モデルを用いて、種々の柑橘類フラボノイドによる影響とその作用メカニズムの解明を行った。その結果、柑橘類フラボノイドは、細胞内シグナル伝達経路の制御を介して、遊離脂肪酸・アディポカイン・TLR発現量・TLRシグナルに影響を与えること明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Obese adipose tissue produces excess inflammatory factors, including free fatty acid (FFA) and adipokines, which are involved in the development of metabolic syndrome. Thus, understanding the regulatory mechanism of adipocytes inflammation is important in the improvement of metabolic syndrome. In this report, we show that citrus flavonoids affect the FFA secretion, adipokines expression, TLR expression and TLR signaling through the regulation of intracellular signaling in adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2009年度	1,020,000	306,000	1,326,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：分子細胞生物学・生化学

科研費の分科・細目：農学・食品科学

キーワード：脂肪細胞、炎症、食品因子、TLR、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

肥満に伴って脂肪組織から過剰に分泌される遊離脂肪酸（FFA）や、TNF- $\alpha$ などの炎症性アディポカインは、全身および局所の炎症バランスの破綻をもたらし、糖尿病や脂質異常

症などのメタボリックシンドロームの発症・進展に深く関与している。従って、脂肪細胞機能、特に炎症制御機構を解明することは、本疾患の病態予防・改善法を開発する上で重要である。

フラボノイド類は、果物や野菜などに多く含まれる食品因子であり、古くから抗酸化・抗炎症作用を持つことが知られており、心血管障害やガン・喘息・糖尿病などの疾患の予防に関与する。しかしながら、脂肪細胞機能および脂肪細胞の炎症制御機構に対する作用メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

Toll-like receptor (TLR)ファミリー分子は、哺乳類のマクロファージ・樹状細胞・上皮細胞などに広く発現が確認されており、細菌やウイルスの構成成分を特異的リガンドとして認識し、細胞内シグナル伝達経路の活性化を介して炎症性サイトカインを産生し、宿主の感染防御（自然免疫）において重要な役割を担っている。脂肪細胞においてもTLRの発現が確認されている。また近年、グラム陰性菌の構成成分を認識するTLR 4が、脂肪細胞から分泌されるFFAの受容体あるいは結合タンパク質として機能している可能性が報告された。このように、従来、自然免疫システムの制御分子として考えられていたTLRが、内因性物質をリガンドとして認識し、脂肪組織における炎症性変化の病態メカニズムに関与していることが示唆されたのは、メタボリックシンドロームの新しい創薬ターゲットとなり得るため興味深い。

## 2. 研究の目的

前項に記した背景のもと、本研究代表は、脂肪細胞機能に対するフラボノイド類の影響とその作用メカニズムの解明を行うため以下の研究を行った。

- (1) 柑橘類フラボノイドによる脂肪細胞からのFFA分泌およびアディポカイン発現・分泌の制御機構の解明。
- (2) 脂肪細胞におけるTLR発現量およびTLRシグナルに対する柑橘類フラボノイドの影響と作用メカニズムの解明。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

マウス脂肪前駆細胞（3T3-L1）を分化誘導剤（isobutylmethylxanthine, dexamethasone, insulin）を用いて成熟脂肪細胞へ分化させ、柑橘類フラボノイドまたは各種阻害剤などの前投与を行った後、脂肪細胞の炎症モデルの1つであるTNF- $\alpha$ 刺激を行い各種測定実験に用いた（図1）。

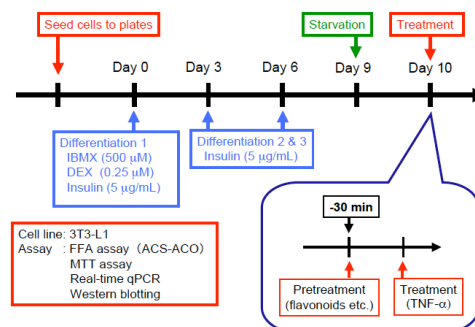


図1 細胞培養プロトコール

### (2) Fatty acid assay

脂肪細胞を2.0% fatty acid-free bovine serum albuminを含む無血清培地で一晚培養した後、フラボノイド類やTNF- $\alpha$ の投与後24時間において、培養上清を回収し、ACS-ACO酵素法によりFFA濃度を測定した。

### (3) Cell viability assay

細胞生存率は、MTT assay kitを用いて測定した。具体的には、TNF- $\alpha$ 刺激後の細胞にMTT試薬を添加し37°C、4時間反応した後、可溶性液でformazanを溶出した後、570 nmの吸光度で測定した。

### (4) Real-time RT-PCR analysis

細胞からtotal RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを合成した。その後、SYBR Green法を用いてReal-time PCRを行った。相対的mRNA発現量は、comparative Ct法も用いて測定し、 $\beta$ -actinとcyclophilinを内標準として用いてデータを解析した。

### (5) Western blot analysis

細胞をRIPA bufferにより溶解後、細胞抽出液を10% SDS-PAGE gelを用いて電気泳動し、続いてPVDF膜に転写した。その後、一次抗体および二次抗体反応を行い、ECL試薬により可視化した。

### (6) siRNA transfection

siRNA transfectionは、DeliverX siRNA Transfection Reagent Kit (Panomics)を用いて行った。概要は、3T3-L1細胞を脂肪細胞へ分化した後、siRNAとTransfection試薬を混合し、混合液を細胞へ添加して24時間培養した。

### (7) 統計解析

測定値は、mean  $\pm$  SDで表される。データは、ANOVA with Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc testを用いて解析し、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

(1) 柑橘類フラボノイドによる脂肪細胞からのFFA分泌およびアディポカイン発現・分泌の制御機構の解明。

始めに、数種類の柑橘類成分を用いて、3T3-L1脂肪細胞における、TNF- $\alpha$ 誘導性FFA分泌に対する効果をFatty acid assayで測定した。その結果、柑橘類フラボノイドのヘスペレチンとナリンゲニンが顕著に抑制効果を示すことを見出した(図2)。また、本研究で使用したフラボノイドの濃度(100  $\mu$ M)は、細胞生存率に影響を与えないことをCell viability assayにより確認した(図3)。

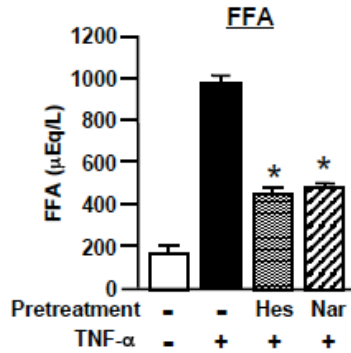


図2 TNF- $\alpha$ 誘導性FFA分泌に対する柑橘類フラボノイドの抑制効果

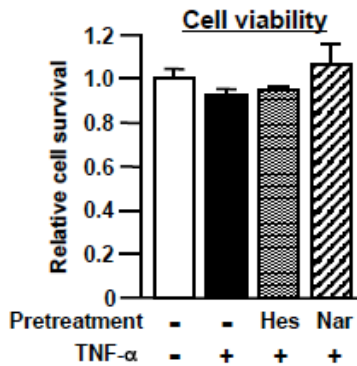


図3 柑橘類フラボノイドの細胞毒性評価

TNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌において、細胞内シグナル伝達経路のNF- $\kappa$ BおよびERKが関与することが示されている。そこで、ヘスペレチンとナリンゲニンがどのような作用メカニズムでFFA分泌を抑制するか解明するために、NF- $\kappa$ BおよびERK経路の活性化に対する影響をWestern blot analysisにより測定した。その結果、TNF- $\alpha$ 単独では、NF- $\kappa$ BおよびERK経路の活性化が確認されたが、ヘスペレチンとナリンゲニンの投与により両経路の活性化が抑制された(図4)。また、NF- $\kappa$ BおよびERK経路がTNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌に関与しているか確認するために、両経路の阻害剤を用いて検討を行った(MG: NF- $\kappa$ B阻害剤、U: ERK阻害剤)。その結果、これらの阻害剤は、FFA分泌を抑制した(図5)。

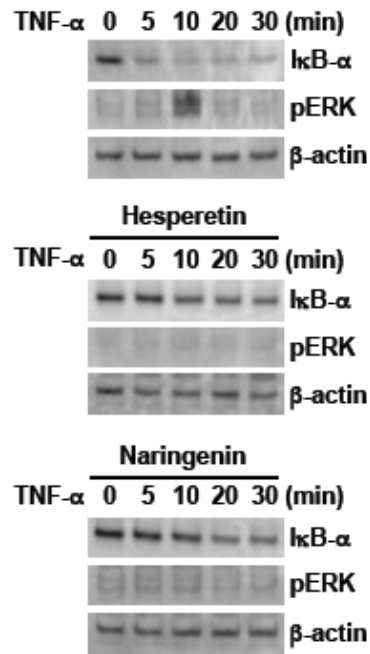


図4 細胞内シグナル伝達経路の活性化に対するフラボノイドの影響

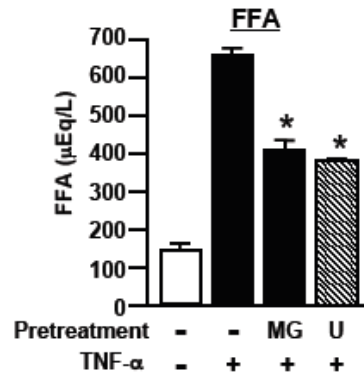


図5 FFA分泌に対するシグナル伝達経路阻害剤の効果

TNF- $\alpha$ 誘導性FFA分泌の制御には、antilipolytic genesの発現量低下も関与することが知られている。そこで、ヘスペレチンとナリンゲニンがperilipinの発現量に影響を与えるかReal-time RT-PCRを行い測定した。その結果、TNF- $\alpha$ 単独では、perilipinのmRNA発現量を低下させたが、フラボノイドの投与により、perilipinの発現量は回復した(図6)。また、NF- $\kappa$ BおよびERK経路の阻害剤がperilipinの発現量に影響を与えるか検討したところ、NF- $\kappa$ B阻害剤(MG)は、影響を示さなかったが、ERK阻害剤(U)は、TNF- $\alpha$ によるperilipinの発現量低下を回復させた(図7)。

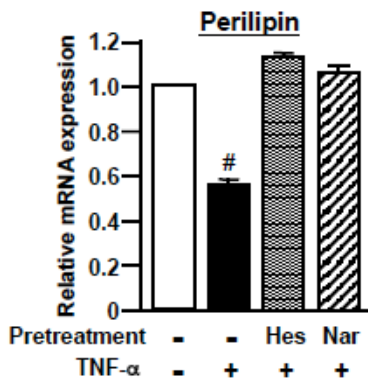


図6 Perilipin mRNA発現量に対するフラボノイドの影響

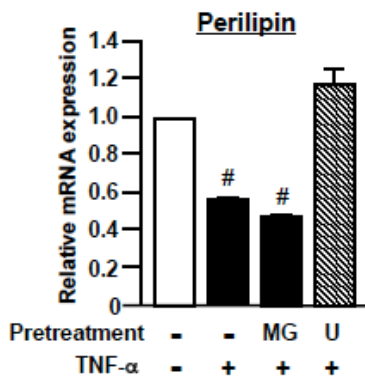


図7 Perilipin mRNA発現量に対するシグナル伝達経路阻害剤の効果

ヘスペレチンおよびナリングeninによるERK経路の阻害は、perilipinの発現量低下を回復してTNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌を抑制することを明らかにした。しかし、NF- $\kappa$ B経路の関与は不明のままである。TNF- $\alpha$ は、脂肪組織における強力な制御因子として知られており、他の炎症性アディポカインの産生に関与していることが知られている。従って、NF- $\kappa$ B経路を介して産生される他のアディポカインが、オートクリン/パラクリン作用により脂肪細胞からのFFA分泌を促している可能性がある。候補物質としてIL-6が挙げられる。IL-6は、TNF- $\alpha$ と同様にインスリン抵抗性やFFA分泌に関与するため、ヘスペレチンとナリングeninが、TNF- $\alpha$ によるIL-6の発現誘導に影響を与えるかReal-time RT-PCRにより測定した。その結果、これらのフラボノイドは、IL-6の発現を抑制した(図8)。また、NF- $\kappa$ BおよびERK経路の阻害剤を用いてTNF- $\alpha$ 誘導性のIL-6発現に対する影響を検討したところ、NF- $\kappa$ B阻害剤(MG)は、IL-6の発現を抑制したが、ERK阻害剤(U)は、影響を与えなかった(図9)。

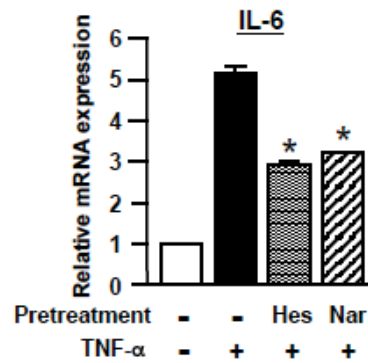


図8 TNF- $\alpha$ 誘導性IL-6 mRNA発現量増加に対するフラボノイドの影響

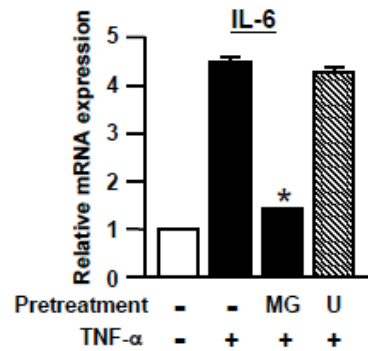


図9 IL-6 mRNA発現量に対するシグナル伝達経路阻害剤の効果

次に、IL-6によるFFA分泌作用を確認するためFatty acid assayを行った。その結果、IL-6はFFA分泌を誘導した。しかしながら、その作用はTNF- $\alpha$ と比較して弱かった。また、TNF- $\alpha$ とIL-6の同時投与は、相加的にFFA分泌を増強した(図10)。

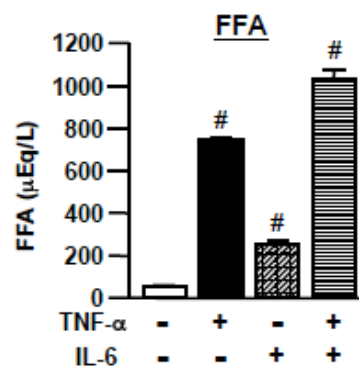


図10 TNF- $\alpha$ およびIL-6誘導性のFFA分泌

TNF- $\alpha$ 誘導性のIL-6が、オートクリン/パラクリン作用により脂肪細胞からのFFA分泌に関与するか確認するために、IL-6中和抗体を用いてTNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌に対する影響を検討した。その結果、IL-6中和抗体は、

TNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌を抑制した (図11)。

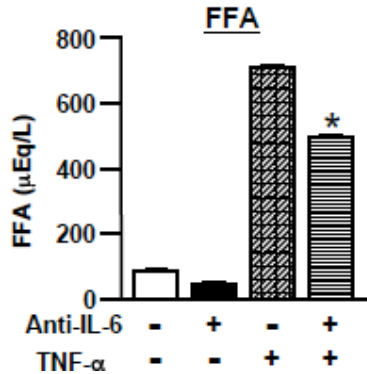


図11 TNF- $\alpha$ 誘導性FFA分泌に対するIL-6中  
和抗体の効果

(2) 脂肪細胞におけるTLR発現量およびTLRシグナルに対する柑橘類フラボノイドの影響と作用メカニズムの解明。

近年、脂肪細胞におけるTLRファミリーの発現が確認され、さらに脂肪組織の炎症においても関与することが示唆されている。そこで、TNF- $\alpha$ 刺激により3T3-L1脂肪細胞におけるTLRファミリー (TLR2, 4, 6, 7, 9) の発現量が増加するかReal-time RT-PCRにより検討した。また、柑橘類フラボノイドのヘスペレチンとナリンゲニンが、TLR発現量に影響を与えるか否かも同時に測定した。その結果、TNF- $\alpha$ 刺激によって、TLR2のみが有意に発現量が増加した。また、ヘスペレチンとナリンゲニンは、TNF- $\alpha$ 誘導性のTLR2発現を有意に抑制した (図12)。

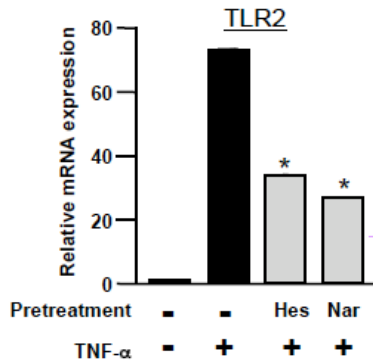


図12 TNF- $\alpha$ 誘導性TLR2 mRNA発現量増加に対するフラボノイドの影響

我々のこれまでの研究において、ヘスペレチンとナリンゲニンは、脂肪細胞においてTNF- $\alpha$ 誘導性のNF- $\kappa$ BおよびERK経路の活性化を抑制することを示している。そこで、これらの経路がTLR2の発現制御に関与するか明らかにするため、NF- $\kappa$ B阻害剤 (MG) とERK阻害剤 (U) を用いてReal-time RT-PCRを行っ

た。その結果、NF- $\kappa$ B阻害剤は、TNF- $\alpha$ 誘導性のTLR2発現増加を抑制したが、ERK阻害剤は影響を示さなかった (図13)。

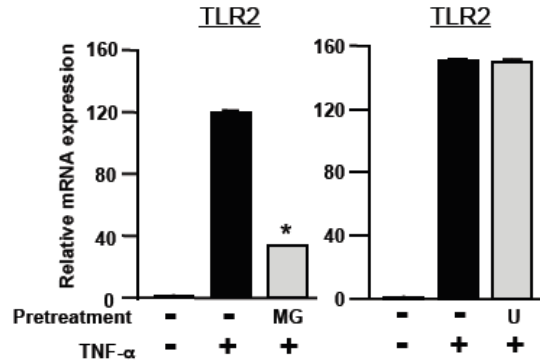


図13 TLR2 mRNA発現量に対する細胞内シグナル伝達経路阻害剤の効果

次に、脂肪細胞におけるTLR2の機能的な意義を解明するために、siRNAを用いてTLR2をノックダウンし、アディポカインなど (IL-6, MCP-1, PAI-1, PPAR $\gamma$ , Adiponectin) の発現量に影響を与えるか検討した。その結果、siRNA-TLR2の処理によりTLR2発現の減少が確認された。また、PAI-1の発現も抑制された (図14)。

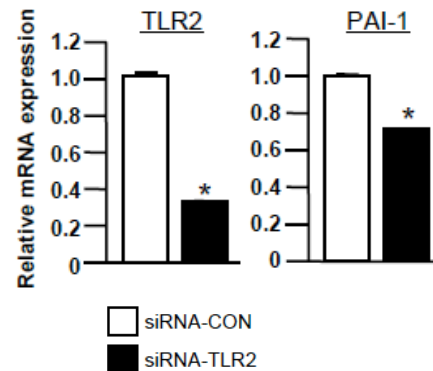


図14 アディポカイン発現量に対するsiRNA-TLR2の効果

最後に、脂肪細胞におけるTLR2シグナル活性化に対して、ヘスペレチンとナリンゲニンが影響を与えるか明らかにするために、TLR2の特異的リガンドであるPGN処理後のアディポカインなど (IL-6, MCP-1, PAI-1, PPAR $\gamma$ , Adiponectin, TLR2) の発現量変化について検討を行った。その結果、PGN処理によりMCP-1の発現量が増加した。また、ヘスペレチンとナリンゲニンの投与は、PGN誘導性のMCP-1発現を抑制した (図15)。

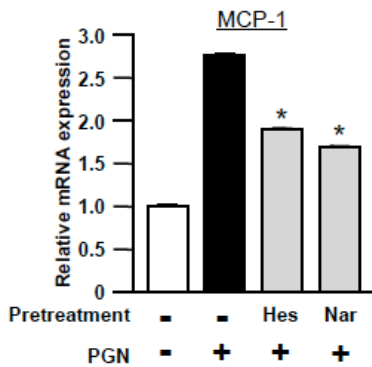


図15 PGN誘導性アディポカイン発現量増加に対するフラボノイドの影響

以上、本研究により、柑橘類フラボノイドのヘスペレチンとナリンゲニンは、細胞内シグナル伝達経路の制御を介して、TNF- $\alpha$ 誘導性のFFA分泌を抑制することが明らかとなった。また、IL-6の発現制御にも関与することが明らかとなった。さらに、これらのフラボノイドは、脂肪細胞におけるTNF- $\alpha$ 誘導性のTLR2発現量増加を阻害し、TLR2シグナルを介した炎症性変化も抑制し得る可能性が示された。

以前から報告されている研究において、フラボノイド類が抗炎症作用などを持つことが知られていたが、それらの多くの研究は、マクロファージなどの非脂肪細胞を用いて行われた。本研究では、脂肪細胞機能に対するヘスペレチンとナリンゲニンの影響と作用メカニズムの一端を明らかにすることができた。この結果は、脂肪細胞がメタボリックシンドロームの病態に深く関与していることを鑑みると、意義深いと考える。また、脂肪細胞におけるTLRの発現量変動は、メタボリックシンドロームの新しい病態メカニズムを提起するものであり、新しい病態予防・改善法の開発の一助となると考える。

本研究では、*in vitro*の実験を中心に行ったが、今後、個体レベルでのフラボノイドの影響と、脂肪組織における炎症性変化およびTLRファミリーの発現量変動や病態との関連を検証することが重要であると考えられる。

## 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1件)

- ① Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, Kai H. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- $\alpha$  in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 394(3), 2010, 728-32.

[学会発表] (計6件)

- ① 吉田裕樹、脂肪細胞の遊離脂肪酸分泌制御機構に対する柑橘類フラボノイドの影響、日本薬学会第130年会(岡山)、2010年3月30日、岡山桃太郎アリーナ
- ② Hiroki Yoshida, Hesperetin and naringenin, two citrus flavonoids inhibit TNF- $\alpha$ -induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜
- ③ 吉田裕樹、脂肪細胞の炎症性変化に対する柑橘類フラボノイドの影響、日本薬学会第129年会(京都)、2009年3月27日、国立京都国際会館
- ④ 吉田裕樹、フルーツを食べてメタボ予防!?, 日本薬学会第129年会(京都)、2009年3月27日、国立京都国際会館
- ⑤ 吉田裕樹、遊離脂肪酸およびアディポカイン発現に対するフラボノイドの影響、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド
- ⑥ 吉田裕樹、遊離脂肪酸およびアディポカイン発現・分泌制御に対する柑橘類フラボノイドの影響、第25回日本薬学会九州支部大会、2008年12月7日、九州保健福祉大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA HIROKI)  
九州保健福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号: 90469411

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: