

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 26 年 12 月 18 日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700754

研究課題名（和文）メタボリックシンドローム一次予防：活性酸素を介した老化関連遺伝子からのアプローチ

研究課題名（英文）Primary Prevention of Metabolic Syndrome：Aging-related gene with Reactive Oxygen Species

研究代表者 根岸 裕子（NEGISHI HIROKO）

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教

研究者番号：50523841

研究成果の概要（和文）：メタボリックシンドロームモデルラットである SHRSP・Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr(SP-ZF)において、酸化ストレスの亢進、UCP2mRNA 発現量については、腎臓、心臓において亢進が認められた。以上のことから、UCP2 発現異常は、活性酸素や NO 産生調節に影響を与え、メタボリックシンドロームの病態に関与している可能性が示唆された。さらに、イソフラボンを多く含む葛蔓抽出物を SP-ZF に投与した結果、体重減少を伴い、血圧上昇抑制、脂肪肝改善等抗メタボリックシンドローム作用が認められた。

研究成果の概要（英文）：Metabolic syndrome (MS) is associated with overproduction of reactive oxygen species (ROS). The increase of UCP2mRNA expression may depend on increased oxidative stress in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/Izm Dmcr rats (SP-ZF). The increase of UCP2 mRNA expression may relate to the phenotype in metabolic syndrome status in SP-ZF. We observed that kudzu extracts could decrease body weight, blood pressure, and serum lipids significantly by increasing UCPs, PPARs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：メタボリックシンドローム、UCP2、活性酸素種、NOS、イソフラボン、疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

戦後、生活習慣の欧米化を反映した内臓脂肪の蓄積を基盤に、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧の発症が増加している。そして、これらの症状を集積し、動脈硬化性疾患の危険因子を助長する病態を“メタボリックシンドローム”という。メタボリックシンドロームに着目する意義は、日本をはじめ多くの国で死因の上位を占める心血管疾患、脳血管疾患の

発症リスクが高くなること、死因だけではなく超高齢化を迎える多くの国で課題となっている認知症や寝たきりの原因疾患に脳血管疾患が深く関わっていること、そして何より生活習慣の改善によりこれら疾患の予防が可能ということがあげられる。また、メタボリックシンドローム関連疾患を予防することにより、現在問題となっている医療費の大幅な削減にもつながっていくことが期待

される。

2. 研究の目的

本研究では、腎障害など高血圧関連疾患のさらなる増悪が予想されるメタボリックシンドロームモデル動物、SHRSP・Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr (SP・ZF) を用い、メタボリックシンドロームの成因および機序について、活性酸素およびNOを介した老化関連遺伝子の関与を明らかにし、その後メタボリックシンドローム一次予防研究として、ポリフェノール負荷によるメタボリックシンドロームへの効果を観察し、活性酸素およびNOを介した老化関連遺伝子の関与および病態発症・進展予防のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1)メタボリックシンドロームモデルラットにおける病態の成因および機序について

メタボリックシンドロームモデルであるSP・ZFラットとその非肥満同胞のLean、正常ラットのWKYを用い、それぞれの心臓、肝臓、腎臓、腸間膜脂肪中のUCP2mRNA発現量をリアルタイムPCR法にて、心臓、肝臓中のiNOS、eNOS発現量とAMPのリン酸化をウエスタンブロッティング法にて測定した。

(2)メタボリックシンドロームモデルラットにおける葛蔓イソフラボン負荷による一次予防について

メタボリックシンドロームモデルラットであるSHRSP・Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr (SP・ZF)をコントロール群(C群)と葛蔓エタノール抽出物負荷群(KZ群)に分け、正常モデルとしてWistar Kyoto rat (WKY群)、高血圧を有する非肥満モデルとしてSHRSP (SP群)の計4群、5週齢・雌性ラットを用い実験を行った。1週間の予備飼育後、I群に葛蔓エタノール抽出物を6週間負荷し、体重、血圧を測定した。さらに、臓器中タンパク発現量を分析した。

(3)脂肪前駆細胞への葛蔓抽出物およびイソフラボンの影響

3T3-L1細胞を用い、プエラリン、ゲニステイン、各濃度の葛蔓エタノール抽出物を負荷し細胞分化、脂質量、UCP2mRNA発現量および各種タンパク発現量を測定した。さらに、濃度依存性が存在するかを検討した。

4. 研究成果

(1)各種パラメータを比較したところ、解剖時に測定した体重ではSP・ZFにおける値が最も高く、Leanが最も低い値を示した。

解剖時に摘出した各臓器および内臓脂肪においては、SP・ZFの値が肝臓、睾丸周囲脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪で顕著に高く内臓脂肪肥満を呈していることが示唆された。

SP・ZFは血圧が高く、血清中の遊離脂肪酸、中性脂肪の量が増加しており、血糖値も

高いことが明らかにされている。さらに、尿中にタンパク質やアルブミンの漏出が確認されることからこのモデルは腎障害を起していることが示唆されている。

酸化ストレスマーカーである24時間尿中8-OHdG排泄量において、SP/ZFが非肥満同胞Leanに比し、高値を示した(図1)。

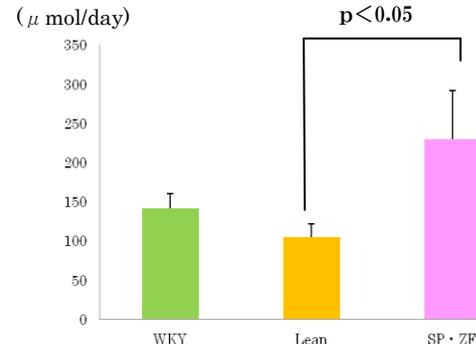


図1 24時間尿中8-OHdG排泄量

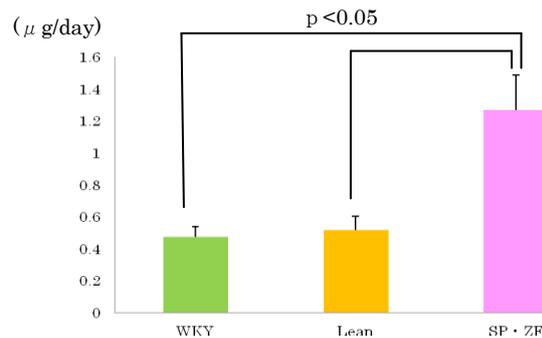


図2 24時間尿中NO₂⁻+NO₃⁻排泄量

24時間尿中におけるNO₂⁻+NO₃⁻排泄量に関して、SP・ZFで増加が確認された(図2)。

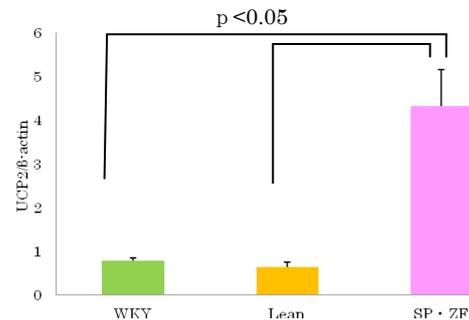


図3 心臓におけるUCP2 mRNA発現量

またUCP2mRNA発現量に関しては、心臓においてSP・ZFで発現亢進が確認され(図3)、腎臓ではSP・ZFとLeanにおいて発現亢進が認められた(図4)。肝臓、腸間膜脂肪に関しては三群間で有意差は確認されな

った。

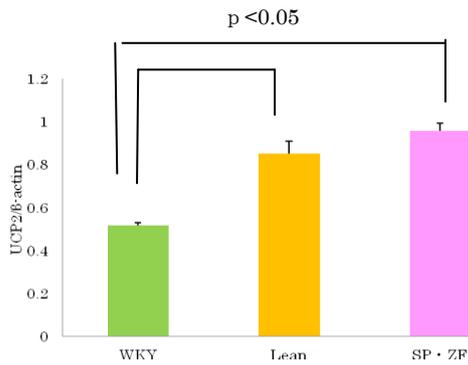


図4 腎臓における UCP2 mRNA 発現量

SP・ZF では体内の活性酸素、遊離脂肪酸が増加しており、これらが心臓における UCP2 mRNA の発現を亢進させていると考えられる。心臓における UCP2 過剰発現はミトコンドリア内の代謝経路の破綻を引き起こし、活性酸素の産生抑制機能を失う。さらに、UCP2 過剰発現に起因する ATP 不足、O₂ 消費の増加は心筋の機能低下を招き心血管疾患の発症に関与している。以上のことから、UCP2 過剰発現が様々な要因と複雑に関連し合い、メタボリックシンドロームモデルラットにおける病態発症・進展に関与していることが推察された。

(2)葛蔓エタノール抽出物負荷により C 群、KZ 群の各群 1 匹あたりの摂食量において、最終週に C 群と KZ 群間に有意差がみられた(図 5)。



図5 摂食量変化

それに伴い、負荷終了時 12 週齢時の体重は WKY 群と SP 群・C 群・KZ 群間、SP 群と C 群・KZ 群間、C 群と KZ 群間に有意差がみられた(図 6)

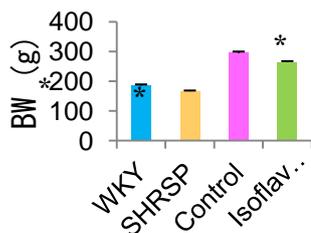


図6 終了時体重 * p<0.05 vs C

また、脂肪組織においては KZ 群と C 群と比較した際に脂肪細胞の小型化傾向が見られた(図 7)。

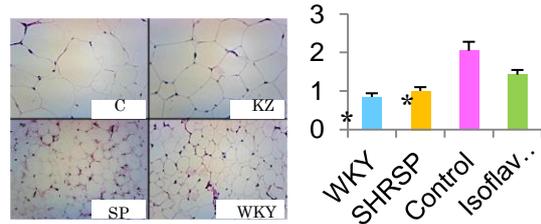


図7 脂肪組織写真(左)、脂肪細胞サイズ相対値(右)

負荷実験中の各群の血圧変化(図 8)について、収縮期血圧においては、負荷開始後 6 週目において WKY 群と SP 群・C 群・KZ 群間、SP と KZ 群間、C 群と KZ 群間に有意差がみられ、葛蔓による血圧上昇抑制効果が明らかとなった。拡張期血圧も同様の結果を示した。

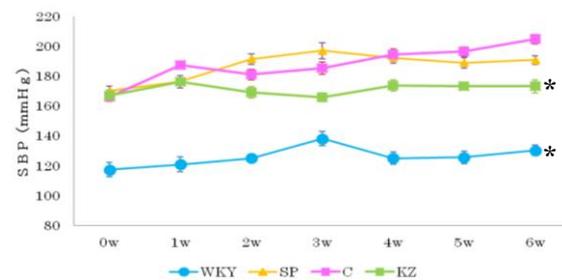


図8 収縮期血圧変化 * p<0.05 vs C

肝臓においては、臓器重量が、C 群に対し、KZ 群で有意に低値を示し、また組織学的検討では C 群に大脂肪滴および肝細胞の肥大が認められるが、KZ 群ではそれらが改善傾向にあることから(図 9)、葛蔓抽出物により、脂肪肝改善の可能性が示唆された。

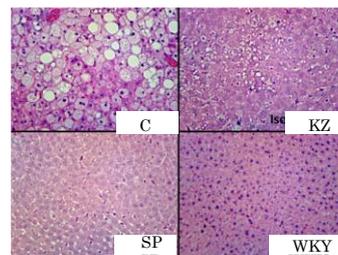
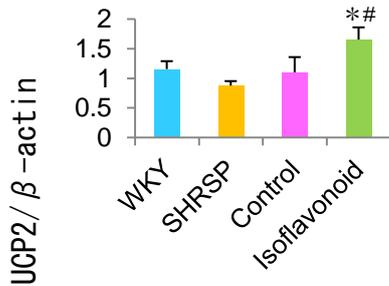


図9 肝臓組織写真

脂質パラメータについて、血清中総コレステロール濃度において、C 群・KZ 群が他群より有意に高値を示し、KZ 群は C 群に対し有意に低値を示したことから、葛蔓抽出物によりコレステロール低下作用を示したと推察される。また、24 時間尿中アルブミン排泄量において、KZ 群が C 群に対し有意に低値を示したことから、肥満および高血圧に起因する腎障

害が改善されたことが明らかとなった。

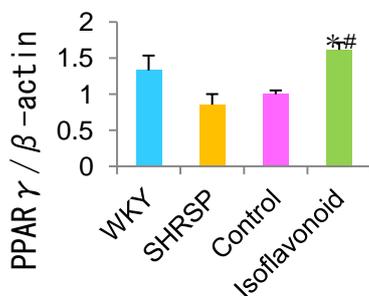
最近、エネルギー代謝や脂質代謝との関連で注目されている UCP2mRNA 発現量に関しては、心臓において C 群・KZ 群の 2 群が WKY 群、SP 群と比較して、有意に発現が亢進しており、SP・ZF と WKY、SP 間の系統間での有意差が認められた。腸間膜脂肪の UCP2mRNA 発現においては KZ 群が C 群と比較して、有意に発現が亢進していた (図 10)。



*p<0.05 vs C #p<0.05 vs SP

図 10 腸間膜脂肪における UCP2mRNA 発現

さらに、各種タンパク発現に関して心臓、腸管膜脂肪において脂肪分化や血圧に関与することが知られている PPARs の発現が KZ 群で C 群に対し亢進傾向が認められ、腎臓における PPAR γ 発現量は、C 群と比較すると KZ 群で有意に高値を示した (図 11)。一方、血管収縮に関連する pNOS 発現量は、C 群と SP 群と比較すると KZ 群で有意な発現亢進が見られた。



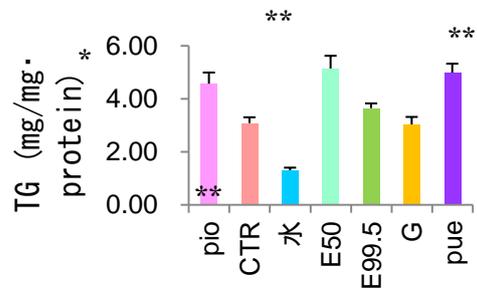
*p<0.05 vs C #p<0.05 vs SP

図 11 腎臓における PPAR γ タンパク発現

以上のことから、葛蔓エタノール抽出物は、UCPs や PPARs、NO を介して、雌性メタボリックシンドロームモデルラットにおいて血圧上昇抑制、体重増加抑制、脂肪肝抑制、コレステロール低下傾向が明らかとなった。

(3)脂肪細胞に分化するマウス繊維芽細胞 3T3-L1 にプエラリン、ゲニステイン、葛蔓水抽出物、葛蔓 50%エタノール抽出物、葛蔓 99.5%エタノール抽出物、ピオグリタゾン負荷およびコントロールの 7 群に分け、脂肪細胞への分化誘導を開始した。なお、葛蔓抽出

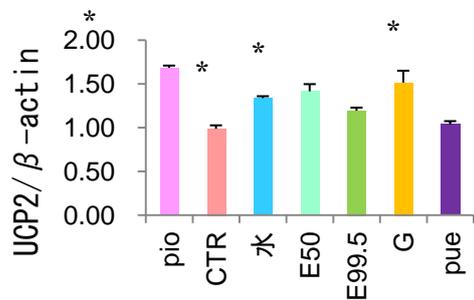
物濃度は総イソフラボン量が 30 μ g/mL と なるよう調整した。トリグリセライド(TG)含量を測定した結果、ポジティブコントロールである脂肪細胞分化促進作用を有するチアゾリジン誘導体、ピオグリタゾンと同様に、葛蔓エタノール抽出物において前駆脂肪細胞を分化誘導する作用があることが認められた。



**p<0.01, *p<0.05 vs CTR 群

図 12 3T3 培養細胞におけるタンパク 1mg あたり TG 含量: pio: ピオグリタゾン (ポジティブコントロール)、CTR: コントロール、水: 葛蔓水抽出物、E50: 葛蔓 50%エタノール抽出物、E99.5: 葛蔓 99.5%エタノール抽出物、G: ゲニステイン、pue: プエラリン

また、UCP2 遺伝子発現を検討したところ、葛蔓エタノール抽出物において、有意な発現亢進が認められた。さらに、PPARs タンパク発現においても、50%葛蔓エタノール抽出物において、有意な発現亢進が認められた。



*p<0.05 vs CTR

図 13 3T3 培養細胞における UCP2mRNA 発現

以上のことから、葛蔓エタノール抽出物は、脂肪細胞の分化を抑制し、UCPs、PPARs を発現亢進に寄与することが示唆された。

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. 安井菜穂美、根岸裕子、奈良安雄、家森幸男、池田克巳、メタボリックシンドローム、基礎・臨床最新知見 III. 成因と病態生理「メタボリックシンドローム関連モデル動物」 日本臨床 2011, 69/

- 増刊号 1, 358-363、査読無
2. S.Juman, N. Yasui, H. Okuda, A. Ueda, H. Negishi, T. Miki, and K. Ikeda. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses the Production of Adipocytokines, Leptin, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Resistin, during Differentiation to Adipocytes in 3T3-L1 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2011; 34/4:490-494, 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.490>
 3. Hiroko Negishi, Takashi Maoka, Marina Njelekela, Naomi Yasui, Sachiko Juman, Jacob Mtabaji, Tomohiro Miki, Yasuo Nara, Yukio Yamori and Katsumi Ikeda. New chromone derivative terminalianone from African plant Terminalia brownii Fresen (Combretaceae) in Tanzania. *Journal of Asian Natural Products Research* 2011; 13/3: 281-283, 査読有 DOI: 10.1080/10286020.2011.552431
 4. S.Juman, N. Yasui, H. Okuda, A. Ueda, H. Negishi, T. Miki, and K. Ikeda.. Caffeic acid phenethyl ester inhibits differentiation to adipocytes in 3T3-L1 mouse fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(9):1484-8. 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1484>

[学会発表] (計 4 件)

1. 井手法慧、安井菜穂美、奈良安雄、池田克巳、根岸裕子、葛蔓エタノール抽出物による SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr への影響、第 47 回高血圧関連疾患モデル学会、2011 年 9 月 6 日、日本 北海道
2. Norie Ide, Naomi Yasui, Yasuo Nara, Yukio Yamori, Katsumi Ikeda, Hiroko Negishi Metabolic Syndrome and Reactive Oxygen Species in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr Rats, the Model of Metabolic Syndrome, International Congress of Pathophysiology、2010 年 9 月 23 日、カナダ、モントリオール
3. Hiroko Negishi, Kazuya Kitamori, Hiroaki Aso, Katsumi Ikeda, Yasuo Nara, Neuroprotection Role of Clofibrate in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats、International Congress of Pathophysiology、2010 年 9 月 23 日、カナダ、モントリオール
4. 井手法慧、巽啓子、安井菜穂美、奈良安雄、池田克巳、根岸裕子、メタボリックシンドロームモデルラット SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr における脱共役タンパク質および酸化ストレスについて、第 45 回高血圧関連疾患モデル学会、2009 年 9 月 5 日、日本 東京

[図書] (計 1 件)

1. 池田克巳、安井菜穂美、北森一哉、根岸裕子、第 6 章第 6 節「SHR.CP と SHRSP.ZF」モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用 - 循環器疾患 株式会社エル・アイ・シー 2010, 470-472

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 「葛蔓抽出物、その製造方法、それを含有する生活習慣病改善剤組成物又は食品組成物」
発明者: 根岸裕子、清水浩美
権利者: 国立大学法人奈良女子大学 奈良県
種類: 特許
番号: 特願 2014-016405 号
出願年月日: 平成 26 年 1 月 31 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/life/health/negishi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 裕子 (NEGISHI HIROKO)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教

研究者番号: 50523841

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし