

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02142

研究課題名(和文) 脂肪細胞の低酸素ストレス抑制による生活習慣病予防

研究課題名(英文) Prevention of life style diseases via suppression of hypoxic responses in adipocytes

研究代表者

山崎 正夫 (YAMASAKI, MASAO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80381060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は『肥満者の疾患リスクを下げる手段』として、脂肪細胞における低酸素応答抑制に注目して共役リノール酸による低酸素不応答誘導機構を明らかにすることを目的とした。共役リノール酸のうち10トランス、12シス型は低酸素状態にある脂肪細胞における代謝変化を抑制し、その要因として2つの仮説が推定された。1つ目は細胞内酸素消費を抑制し、低酸素状態においても細胞内酸素濃度を維持させる可能性が考えられた。また、2つ目は細胞内の代謝系を変化させるもので、特にプリン体代謝系への影響が強く確認された。この結果はアドレノコハク酸経路の活性化を示唆しており、本経路と種々の生活習慣病予防との関連性が注目された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満を基盤とする生活習慣病が国民の健康維持の上で重要な課題であり続けているが、肥満人口は決して減少には転じておらず、肥満を減らすことの難しさが窺える。肥満が生活習慣病のリスクファクターになることは多くの研究結果で支持されているが、その要因には脂肪組織での代謝異常が関与している。そこで、申請者は脂肪組織の低酸素状態によって生じる代謝異常の改善を目的とした。本研究成果では機能性脂質による低酸素応答抑制作用をツールとして、アドレノコハク酸回路の重要性を示した。この成果は、肥満解消とは別の視点から生活習慣病を予防を提案する上で、次につながる分子標的を与える結果として、学術的および社会的に重要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the inhibitory mechanism of conjugated linoleic acid (CLA) on hypoxic response in adipocytes to reduce the risk of obese related metabolic disorders. At first, 10-trans and 12-cis CLA was shown to suppress metabolic changes in hypoxic condition. Here, two hypotheses were postulated to explain the mechanisms of CLA. Firstly, it may suppress intracellular oxygen consumption to maintain intracellular oxygen concentrations under hypoxic condition. The second hypothesis is that it alters intracellular metabolic systems. Particularly, it strongly affected on the purine metabolic pathway. Moreover, results suggested activation of the adenosuccinic acid pathway, and the relationship between this pathway and prevention of various lifestyle-related diseases is noteworthy.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：食品機能化学

キーワード：生活習慣病 脂肪細胞 低酸素 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

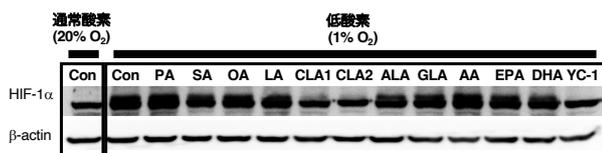
肥満を基盤とする生活習慣病が国民の健康維持の上で重要な課題であり続けているが、肥満人口は決して減少には転じておらず、肥満を減らすことの難しさが窺える。肥満が種々の生活習慣病のリスクファクターになることは多くの研究結果で支持されているが、その要因には脂肪組織での代謝異常が関与している。具体的には、肥満時には脂肪組織でアディポカイン産生バランスの破綻、慢性炎症の惹起、組織繊維化の進行など多くの現象が観察される。肥満を解消することでこれらの現象は解消される方向に向かうが、肥満が減らない現状を鑑みて、申請者は『肥満者の疾患リスクを下げる手段』と考えた。そこで、我々は肥満時の脂肪組織に生じる低酸素状態がアディポカイン産生異常や尿酸合成促進をすることを見出した。これらの結果から、低酸素応答が肥満による脂肪組織の代謝異常の根底にあることが示唆された。

次に低酸素応答を標的とした食品成分の機能解析を開始した。ここで、CLA を始めとする共役脂肪酸が他の食品成分に比べて群を抜いて高い活性を有する点に注目した。この研究において、CLA の体脂肪減少効果の作用機序を調べる中で、CLA が脂肪細胞において低酸素応答抑制するという現象を見出すに至った。この作用を持つ食事脂肪酸は見出せず、CLA の特異な作用を説明する作用機序である可能性が示された。そして、CLA は脂肪細胞で低酸素応答を抑制というメカニズムを介して、生活習慣病を改善できる素材であると結論づけることができた。これらの背景から、CLA をツールとして新たな抗生活習慣病予防法を提案する段階に至った。

2. 研究の目的

そこで、本研究は『共役リノール酸による低酸素不応答誘導機構を明らかにする』ことを目的とした。肥満は様々な生活習慣病の基盤病変であり、多くの機能性食品が肥満や生活習慣病予防をターゲットにしている。そして、肥満の解消は結果的に脂肪組織内の低酸素状態も解消し、脂肪組織内での繊維化や炎症応答が正常化して脂質代謝、糖代謝改善につながることを期待される。しかしながら日本で BMI 25 以上の肥満人口割合はここ 10 年で微増しており (国民健康・栄養調査)、肥満解消の難しさを知ることができる。翻って、脂肪組織の低酸素状態は、肥満を解消しなければ解消できないだろうかと考えた。細胞に低酸素応答させないという CLA の研究成果はこの説を可能するものであり、この『低酸素不応答誘導』が本研究における学術的独自性を持つ概念である。

申請者は様々な機能性食品素材を扱ってきたが、CLA にとりわけ注目して研究を進める理由は驚くべき生理活性の高さである。例えば、肝ガン細胞致死作用の IC₅₀ が 500 nM 程度、マウスに 1%含有食投与で内臓脂肪の 85%が減少するなど希有な強い活性を持つことを見出している。CLA の作用機序を明らかにする中で、『低酸素不応答誘導』という独自性の高い作用機序にたどり着いている (図 1; CLA は HIF-1 α を安定化阻害する物質である)。



各種脂肪酸で24時間前処理、1% O₂処理3時間処理後のHIF-1 α の安定化
YC-1はポジティブコントロール (HIF-1 α の分解促進剤)
CLA1, 9c, 11t-CLA, CLA2 10t, 12c-CLA

図1 HIF-1 α を指標にしたCLAが低酸素応答に与える影響

本研究は、CLA による低酸素応答抑制機構解明を目的に計画しているが、研究成果は抗生活習慣病予防の新たなターゲット提唱する点も創造性がある。例えば、本研究とは逆の作用である HIF-1 α の安定化を赤血球で誘導することを作用機序とした貧血の治療薬が販売承認されている。これは、HIF-1 α 分解酵素 PHD が薬剤ターゲットとなったためである。この例に倣って、低酸素応答抑制の分子ターゲットを明らかにすることで、肥満による生活習慣病のリスクを根本的に解消できる可能性を秘めている。また、申請者らは遊離型やトリグリセリド型、エマルジョン化した CLA の体内分布を評価しているが、脂肪組織への集積性が高いため脂肪組織で機能が発現しやすい素材である点にも CLA を用いる優位性がある。本研究は『2つの仮説のもと、CLA による低酸素不応答誘導機構を分子レベルで明らかにする』ことを目的とする。本研究では、2つの仮説として、

- ・CLA が酸素消費を低下させ、低酸素ストレスを回避する
 - ・CLA によりもたらされる代謝変化により、低酸素ストレスを回避する
- という点を想定して研究項目を設定した

3. 研究の方法

1) 低酸素下での脂肪細胞の代謝変化に対する CLA の影響

3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞をインスリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを用いた常法で脂肪細胞に分化させて脂肪細胞として用いた。CLA は 9 シス、11 トランス型および 10 トランス、12 シス型の 2 種を用い、脂肪酸の対象としてリノール酸を用いた。添加濃度は 50-200 μM とし、脂肪細胞の分化成熟過程において、培地交換の都度 CLA を添加した。培養中の酸素濃度はスギヤマゲン低酸素培養装置を用いて、それぞれの実験において 1-20%の間で調製した。脂肪酸処理後の脂肪細胞の培養上清および細胞のタンパク質、総 RNA を回収した。培養上清からは種々のアディポカイン濃度、乳酸濃度を測定し、タンパク質サンプルは HIF-1 α 発現量の解析、総 RNA は、mRNA を逆転写後にリアルタイム PCR によって、脂肪細胞分化マーカーおよび繊維化マーカーの遺伝子発現を解析した。また、細胞溶解物を調製し、細胞内容物に存在する低分子代謝物を Direct-injection electron ionization-mass spectrometry (DI-EI-MS)法により網羅的な解析を実施した。

2) 高脂肪食摂取マウスにおける脂肪組織内の代謝変化に対する CLA の影響

C57Bl/6 マウスに 40 cal%の脂肪を含む高脂肪食を 8 週間投与し、マウスに肥満を誘発した。8 週目から食事脂肪の一部を CLA (9 シス、11 トランス型および 10 トランス、12 シス型の 1:1 混合物)で置き換え、1 週間飼育した。CLA の添加量は食餌の 1wt%とした。飼育期間終了後、脂肪組織を回収し、Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) 法に供して、低分子代謝物の一斉定量を実施した。

3) 脂肪細胞における酸素消費に対する CLA の影響

1) と同様の方法を用いて脂肪細胞の分化成熟、脂肪酸による処理を 96-well プレートにおいて行った。酸素消費速度 (OCR) は同仁化学の Extracellular OCR plate assay kit を用い、プレートリーダー (Nivo)を用いた時間分解蛍光の測定により継続的な酸素濃度の変化をモニターすることで計算した。

4. 研究成果

本研究では機能性脂質の一種である CLA をツールに、脂肪組織での『低酸素ストレス抑制』を新たな生活習慣病予防法として確立することを目的に実施した。具体的な仮説の 1 つ目として、CLA が脂肪細胞において低酸素ストレスを抑制するように代謝系を変化させることを想定した。3T3-L1 脂肪細胞を 1%低酸素条件で培養したところ、培養上清中における乳酸濃度が上昇し、代謝系が解糖系優位になっていることが示唆された。一方で、10 トランス、12 シス型 CLA を処理した細胞においては乳酸濃度の上昇が抑制されており、低酸素に対する応答が抑制されていることが示唆された。また、HIF-1 α タンパク質の発現量を測定したところ、低酸素条件で上昇する傾向があり、10 トランス、12 シス型 CLA 処理では低下傾向にあった。しかしながらこれらは有意な差を認めるものではなかった。また、低酸素下において誘発される脂肪細胞の形質変化を種々評価するためアディポカイン産生と脂肪細胞分化成熟、繊維化関連遺伝子の mRNA に対する影響を評価した。プロテインアレイの結果から 10 トランス、12 シス型 CLA は 1%低酸素条件で RANTES, leptin, resistin の産生量が 10%以下に低下することが示された。今後、正確な定量試験を実施したいと考えている。アディポネクチンは 1%低酸素条件で産生量が低下したが CLA は明確な影響を与えなかった。

高脂肪食摂取マウス試験において、CLA は脂肪組織の重量に影響しなかった。CLA の投与期間が 1 週間であり、この期間では CLA の抗肥満作用は確認できないことが示された。また、GC による測定でも CLA の蓄積量は非常に少なく、10 トランス、12 シス型は検出できなかった。一方、2 週間投与では十分な抗肥満作用が確認できることが知られている。そこで、1 週間の投与時点では脂肪組織の重量変化を伴わないが、脂肪組織内の代謝変化が生じ始めるタイミングと推定した。次にノンターゲットな代謝物変化を解析するため、脂肪組織より水溶性低分子 (5KDa 以下)を標的としたメタボローム解析を行った。その結果、PCA 解析では CLA 投与による明瞭な代謝物パターンの変化は認められなかったが、OPLS 解析では CLA 投与によって代謝物パターンに明確な違いを認めた。興味深いことに CLA 投与によって 14 の代謝物レベルが有意に上昇したが (図 2)、有意な減少を認めたものは存在しなかった。このうち、7 種はプリン体代

謝に関連するものであり、CLA が尿酸産生抑制効果を有する点から、代謝変化との関連性を評価する予定である。さらに、細胞レベルでは 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化成熟後、1%及び 20%酸素濃度条件下で細胞内水溶性低分子代謝物のパターン変化について DI-EI-MS を用いて解析を試みた。DI-EI-MS 解析に向けた細胞内代謝物の前処理条件を決定後、細胞内代謝物に由来する MS ピークの解析を網羅的に実施した。その結果 1%および 20%酸素濃度条件下では明確なパターンの違いが確認できた。本手法では代謝物の同定には至っていないが、このパターンの違いに貢献度の高い代謝物の m/z 値を確認することができた。一方で、1, 2.5, 5, 10, 20%酸素濃度で評価した際には明確な濃度依存的なパターンは確認できなかった。このことから、脂肪細胞は低酸素強度の違いによって、細胞の機能変化のパターンが異なることが示唆された。一方で、低酸素条件下での代謝変化に対する CLA の影響は、現時点で有意差を確認できるデータが得られていない。

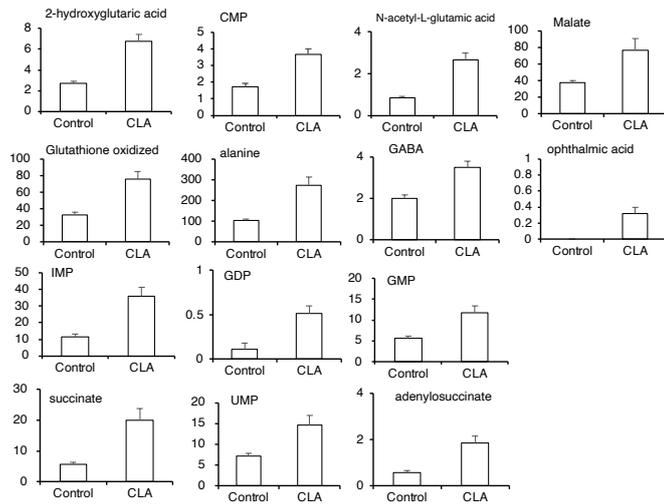


図2 CLA摂取で肥満モデルマウスの脂肪組織における量が変化した代謝物

また、CLA が低酸素応答を抑制する作用機序の 2 つ目として、CLA 処理した脂肪細胞内では酸素濃度が低酸素状態でも通常酸素状態と同様に維持されることを想定した。この仮説に基づくと、CLA は脂肪細胞における酸素消費速度を低下させると推定される。この評価においては、培地中の溶存酸素濃度に応じてリン光を生じるプローブを用いて、時間分解蛍光で酸素消費速度(Oxygen Consumption Rate; OCR)測定することとした。最初の過程として 96 ウェルでの 3T3-L1 脂肪細胞培養系を利用し、OCR を解析するための評価系を構築した。現時点で低酸素状態における安定的な OCR 定量をする条件の構築には至らなかった。さらに、CLA のうち 10trans, 12cis 型は OCR を抑制することが示唆されたが、9cis, 11trans 型やリノール酸にはそのような効果が観察されなかった (図 3)。

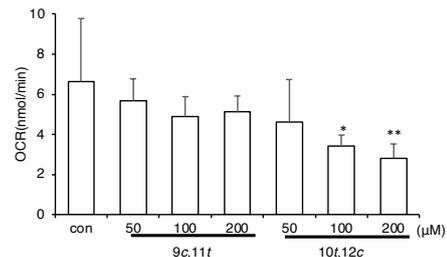


図3 CLAが脂肪細胞の酸素消費速度 (oxygen consumption rate ; OCR) に与える影響

これらの結果を総括する。本研究は『肥満者の疾患リスクを下げる手段』として、脂肪細胞における低酸素応答抑制に注目して共役リノール酸による低酸素不応答誘導機構を明らかにすることを目的として実施してきた。共役リノール酸のうち 10 トランス、12 シス型は低酸素状態にある脂肪細胞における代謝変化を抑制していることが示され、本研究を通じた総合的な考察として、2つの仮説が推定された。1つ目は細胞内酸素消費を抑制し、低酸素状態においても細胞内酸素濃度を維持させる可能性が考えられた。また、2つ目は細胞内の代謝系を変化させるもので、特にプリン体代謝系への影響が強く確認された。この結果はアドレコハク酸経路の活性化を示唆しており、本経路と種々の生活習慣病予防との関連性が注目された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Khan Faizullah, Khan Haroon, Khan Ajmal, Yamasaki Masao, Moustaid-Moussa Naima, Al-Harrasi Ahmed, Rahman Shaikh Mizanoor	4. 巻 155
2. 論文標題 Autophagy in adipogenesis: Molecular mechanisms and regulation by bioactive compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113715 ~ 113715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113715	査読の有無 無
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 M. Yamasaki, Y. Kiue, K. Fujii, M. Sushida, Y. Yamasaki, K. Sugamoto, Y. Suzuki, Y. Koga, H. Kunitake, H. Kai, K. Ogawa, K. Nishiyama, Y. Goto, T. Nakayama	4. 巻 10
2. 論文標題 Vaccinium virgatum aiton leaves extract suppressed lipid accumulation and uric acid production in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 2638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10122638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 M. Yamasaki, Y. Yamasaki, R. Furusho, H. Kimura, I. Kamei, H. Sonoda, M. Ikeda, T. Oshima, K. Ogawa, K. Nishiyama	4. 巻 26
2. 論文標題 Nanoparticles Inhibited LPS-Induced Nitrate Production, however, Their Intracellular Incorporation by Endocytosis Was Not Involved in this Effect on RAW264 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26092763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 MK. Zahid, HB. Sufian, M. Choudhury, M. Yamasaki, A. Al-Harrasi, N. Moustaid-Moussa, SM. Rahman	4. 巻 478
2. 論文標題 Role of macrophage autophagy in atherosclerosis: modulation by bioactive compounds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1359-1375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YAMASAKI Masao, MIYAMOTO Yuko, OGAWA Kenjiro, NISHIYAMA Kazuo, TSEND-AYUSH Chuluunbat, LI Yiran, MATSUSAKI Tatsuya, NAKANO Tomoki, TAKESHITA Masahiko, ARIMA Yuo	4. 巻 43
2. 論文標題 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 06CC2 upregulates intestinal ZO-1 protein and bile acid metabolism in Balb/c mice fed high-fat diet	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 13~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.2023-002	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須子田萌、藤井健斗、木上佑晟、山崎有美、鈴木耀介、菅本和寛、古賀靖子、國武久登、甲斐久博、小川健二郎、西山和夫、後藤陽、中山貴之、山崎正夫
2. 発表標題 ブルーベリー葉熱水抽出物 (BLEx) が 3T3-L1 脂肪細胞機能に与える影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市谷 花帆, 松崎 竜也, 中野 智木, 竹下 正彦, 新山 拓男, Chuluunbat Tsend-Ayush, 小川 健二郎, 西山 和夫, 山崎 正夫
2. 発表標題 Lactiplantibacillus plantarum 06CC2 による高脂肪食摂食マウスの脂質代謝改善作用
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 七瀬唯; 岩瀬大夢; 小川健二郎; 西山和夫; 山崎正夫
2. 発表標題 高脂肪食誘導肥満マウスにおける共役リノール酸の代謝系に与える影響
3. 学会等名 第12回 機能油脂 懇話会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	甲斐 久博 (Kai Hisahiro) (60533221)	九州保健福祉大学・薬学部・准教授 (37604)	

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
---------	---------