

## 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25年 5月 23日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780111

研究課題名（和文）生活習慣病発症に関わる脂肪組織内免疫環境の食品成分による制御

研究課題名（英文） Regulation of immune state in adipose tissue associated with life style diseases by food components

研究代表者

平井 静（HIRAI SHIZUKA）

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：90432343

研究成果の概要（和文）：

肥満の進行に伴い脂肪組織に浸潤する免疫細胞を明らかにするとともに、脂肪組織の免疫環境改善作用を有する食品成分の探索を行った。その結果、肥満の進行に伴い脂肪組織にはマクロファージやT細胞以外にマスト細胞が多数浸潤し、脂肪組織の線維化に関与する可能性が示唆された。またカロテノイドの一種であるアスタキサンチンおよびカンタキサンチンは脂肪細胞分化の抑制を介して耐糖能異常を改善し、それによって脂肪組織の免疫環境の悪化を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, I clarified the immune cells infiltrated into adipose tissues in the progression of obesity, and explored the food components which can improve the immune state in obese adipose tissues. As a result, T cells and mast cells, as well as macrophages, were infiltrated into obese adipose tissues, and I found the involvement of mast cells in fibrosis of obese adipose tissues. I further demonstrated that food-derived carotenoids, astaxanthin and canthaxanthin, could improve glucose intolerance in obese mice by the inhibition of adipocyte differentiation, which suppressed the aggravation of immune state in obese adipose tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：肥満、免疫環境、マスト細胞、カロテノイド、脂肪細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、糖尿病や心疾患などの生活習慣病の発症原因に、脂肪組織に浸潤したマクロ

ファージによる慢性炎症反応が関与することが知られていた。しかし肥満状態の脂肪組織にはマクロファージ以外にもT細胞やマス

ト細胞などの免疫細胞も浸潤していることから、脂肪細胞と各種免疫細胞のバランスが崩れた結果、生活習慣病が誘発される可能性が考えられたが、これらの免疫細胞の動態やその脂肪組織内での役割については不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

(1) 肥満状態の脂肪組織に浸潤するマスト細胞に着目し、その動態や脂肪組織内での役割について明らかにする。

(2) 肥満の進行に伴い脂肪組織に浸潤する免疫細胞を用いて、脂肪組織の免疫環境をモデル化した *in vitro* スクリーニング系を構築し、これを用いて、免疫細胞の機能制御作用を有する食品成分を探索する。

(3) *in vitro* において効果が認められた食品成分に関しては、肥満・糖尿病モデル動物を用いて *in vivo* における有効性を検討するとともに、そのメカニズムに関する検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 60%kcal 高脂肪食を 5, 10, 12, 15 週間摂取させた db/db マウスの脂肪組織から Stromal Vascular Fraction (SVF) を単離し、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いてマスト細胞の検出を行った。また脂肪組織を *in vitro* で培養することで得た培養培地を用いて、未分化マスト細胞のモデルであるマウス骨髄由来マスト細胞

(bone marrow derived mast cell:BMMC) の細胞遊走活性を測定した。さらに BMMC の成熟を促す因子の検討を行った。また、マウス由来 NIH-3T3 繊維芽細胞に肥満状態の脂肪組織の培養培地とマスト細胞由来顆粒成分に対する中和抗体を添加することで、重篤な肥満状態のマウスにおいて観察された脂肪組織の線維化とマスト細胞との関連について検討を行った。

(2) 肥満の進行に伴い脂肪組織に浸潤したマクロファージのモデルとしてすでに構築済みであった、3T3-L1脂肪細胞とRAW264.7マクロファージ様細胞の共培養系を用いて、マクロファージの活性化を抑制する食品成分の探索を行った。

また、T細胞の浸潤に着目したスクリーニング系の構築を行った。肥満の進行に伴い脂肪組織では、マクロファージの誘引に関わる MCP-1のほかにCCL5やIP-10といったケモカインの分泌量が増加し、その結果T細胞が脂肪組織に浸潤することが報告されている。そこで

CCL5の受容体であるCCR5の発現量をT細胞活性化の指標とし、C57BL/6マウスの脾臓から単離・精製したT細胞の活性化条件の検討を行った。T細胞をCD3抗体およびCD28抗体により48時間刺激した後、各種濃度のIL-12を添加し24時間後のCCR5遺伝子の発現を検討した。十分に活性化したT細胞を24well plateに挿入したセルインサートの上部wellに播種し、下部wellには高脂肪食誘導性の肥満マウス(C57BL/6)から採取した脂肪組織の培養培地、または各分化段階にある3T3-L1脂肪細胞の培養培地を添加し、最適な実験条件の検討を行った。

次に、このスクリーニング系を用いてT細胞の浸潤に影響を与える食品由来の探索を行った。

(3) スクリーニングにおいて見いだされた食品由来成分(アスタキサンチン、カンタキサンチン)の *in vivo* における有効性を評価するため、肥満・糖尿病モデルマウスを用いて実験を行った。

卵巣摘出により肥満を誘発したC57BL/6Jマウスに0.1%および0.5%のアスタキサンチンを摂取させて4か月間飼育を行い、体重や組織重量、血中パラメーターへの影響を検討した。

また、C57BL/6Jマウスに60%kcal高脂肪食を4ヶ月間給与し肥満を誘導するとともに0.05%および0.1%のカンタキサンチンを摂取させ、同様に、体重や組織重量、血中パラメーターへの影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 様々な肥満段階にあるマウスの脂肪組織から単離したSVF中のマスト細胞の割合を検討したところ、肥満の進行に伴う脂肪組織内マスト細胞数の増加が確認された(図1)。またこのことは、脂肪組織切片を用いた解析によっても明らかとなった。

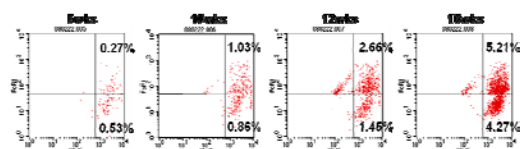


図1. 異なる肥満段階のマウスの脂肪組織におけるマスト細胞の浸潤

またマウス骨髄由来マスト細胞 (bone marrow derived mast cell:BMMC) の細胞遊走活性を測定したところ、BMMCは肥満の進行した状態ではなく、肥満初期または痩せマウスの脂肪組織由来培養培地に対して高い遊走活性を示した。そこで、脂肪組織内におい

てマスト細胞の成熟に関わる因子について検討するため、BMBCに各種脂肪酸を添加したところ、飽和脂肪酸の添加によるのみ成熟マスト細胞マーカーの発現の亢進が認められた(図2)。これらの結果より、肥満の初期段階で脂肪組織内に浸潤している未成熟マスト細胞は、肥満の進行に伴い脂肪細胞内で成熟する可能性が示唆され、このような成熟を促す因子の一つとして、脂肪細胞から分泌される飽和脂肪酸の関与が考えられた。

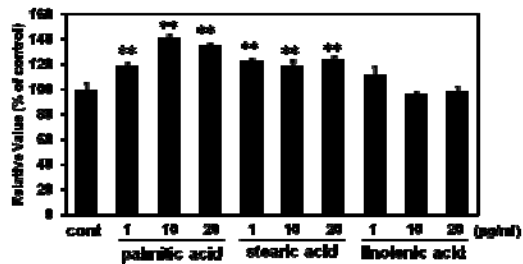


図2. 各種脂肪酸による成熟マスト細胞マーカー(MCP-6)発現

次に、重篤な肥満状態のマウスにおいて観察された脂肪組織の線維化とマスト細胞との関連性について検討するため、マウス由来 NIH-3T3 繊維芽細胞に肥満状態の脂肪組織の培養培地を添加したところ、collagen mRNA 発現の亢進が認められ、この作用はマスト細胞顆粒因子である MCP-6 (tryptase) の中和抗体の添加によって抑制された。以上のことより、肥満状態の脂肪組織内に存在するマスト細胞は、その顆粒成分の分泌を介して脂肪組織の線維化に関わる可能性が示唆された。

(2) 分化誘導後 20 日間経過し十分に脂肪滴を蓄えた 3T3-L1 脂肪細胞と RAW264.7 マクロファージ様細胞の共培養系に各種食品由来成分を添加したところ、柑橘由来のクマリンであるオーラプテンにマクロファージの活性化抑制作用があることが判明した。これにより、オーラプテンには、肥満の進行に伴うマクロファージの活性化抑制を介して脂肪組織の免疫環境を改善する可能性が示唆された。

また、T 細胞を用いたスクリーニング系の構築において、まず T 細胞の活性化条件の検討を行ったところ、C57BL/6 マウスの脾臓から単離・精製した T 細胞は、0.25 ng/mL の IL-12 の添加によって最も CCR5 の発現量が最大になることが判明した。そこで次に、このようにして十分に活性化させた T 細胞が最も誘引される条件を検討したところ、T 細胞は 20 日間培養し十分に脂肪滴を蓄えた 3T3-L1 細胞の培養培地に対して有意な遊走活性の上昇を示したため、スクリーニング系として適していることが考えられた。

このようにして構築したスクリーニング系

を用いて T 細胞の浸潤に影響を与える食品成分の探索を行った結果、カロテノイドの一種でサケやイクラなどの海産物に含まれるカンタキサンチンおよびアスタキサンが濃度依存的に T 細胞の浸潤を抑制する傾向を示した。アスタキサンチンを添加した 3T3-L1 細胞では脂肪滴の小型化が観察されたため、アスタキサンチンは脂肪細胞の小型化を介して T 細胞の浸潤を抑制している可能性が示唆された。

(3) カンタキサンチンおよびアスタキサンチンの *in vivo* における有効性を評価するため、肥満・糖尿病モデルマウスを用いて実験を行った。

C57BL/6J マウスにカンタキサンチン含有高脂肪食を摂取させたところ、体重や組織重量に変化は認められなかったが、TNF- $\alpha$  等の血中の炎症性マーカーの低下、および経口糖負荷試験において血糖値の有意な低下が認められた。またアスタキサンチンも、卵巣摘出による肥満・糖尿病モデルマウスにおいて糖・脂質代謝異常の改善作用を示した(図3)。

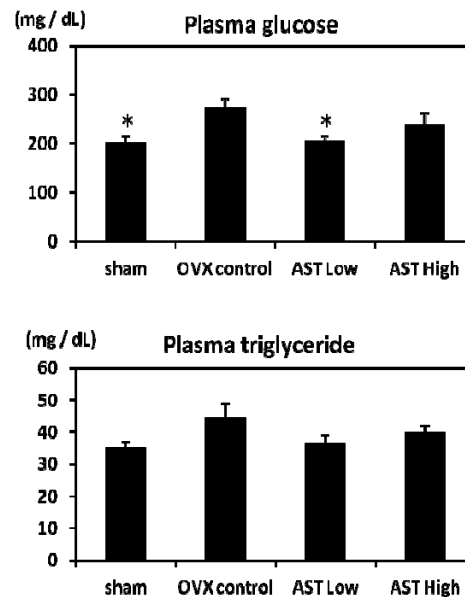


図3. 卵巣摘出モデルマウスにおけるアスタキサンチンの糖・脂質代謝改善作用

そこで次に、カンタキサンチンによる免疫環境および糖代謝改善のメカニズムについて検討したところ、カンタキサンチンは CV-1 細胞を用いたレポーターアッセイ系において PPAR $\gamma$  活性には影響を及ぼさなかったが、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化過程において、脂肪滴の蓄積を顕著に抑制するとともに(図4)、PPAR $\gamma$  およびその下流の脂肪細胞特異的遺伝子発現も抑制した。

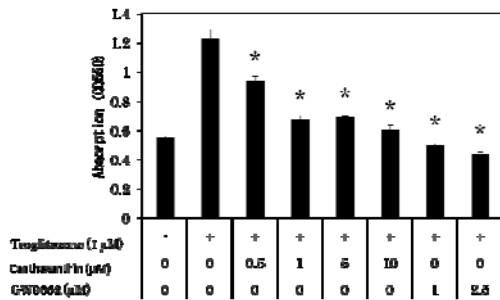


図4. カンタキサンチン添加を行った3T3-L1細胞の Oil Red O染色 (染色液を溶出した際の吸光度で表示)

以上のことより、カンタキサンチンは脂肪細胞分化の抑制を介して高脂肪食誘導性の糖代謝異常および脂肪組織の免疫環境の悪化を改善する可能性が示唆された。

## 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1件)

① Lin S, Hirai S, Goto T, Sakamoto T, Takahashi N, Yano M, Sasaki T, Yu R, Kawada T. Auraptene suppresses inflammatory responses in activated RAW264 macrophages by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase activation. Mol Nutr Food Res. 2013 in press. (査読あり)

[学会発表] (計3件)

① 渡部慎平、平井 静、千葉大成、植松知里、高橋信之、河田照雄、江頭祐嘉合  
アスタキサンチンが閉経モデルマウスにおける骨代謝および糖・脂質代謝に及ぼす影響  
第33回日本肥満学会、2012年10月11, 12日、京都市

② 松井英里、平井 静、高橋信之、河田照雄、江頭祐嘉合  
カンタキサンチンによる脂肪細胞分化抑制作用、第33回日本肥満学会、2012年10月11, 12日、京都市

③ Hirai S, Ohyane C, Kim Y, Lee JY, Goto T, Takahashi N, Yu R, Kawada T  
The pathophysiological role of mast cells in obese adipose tissue  
XI International Conference on Obesity - International Congress of Obesity. 2010. 5. Stockholm, Sweden

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 静 (HIRAI SHIZUKA)  
千葉大学・園芸学研究科・助教  
研究者番号：90432343

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし