

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500972

研究課題名(和文) 非 α-トコフェロールの生体内活性型はカルボキシエチルヒドロキシクロマン体である

研究課題名(英文) CEHC is the active form of non alpha-tocopherol in vivo

研究代表者

清瀬 千佳子 (Kiyose, Chikako)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：60392528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ビタミンEの代謝物であるカルボキシエチルヒドロキシクロマン(CEHC)体がビタミンEの真の生理活性型であることを立証するために、炎症を誘導した脂肪細胞に対する抗炎症効果に焦点を当てて研究を行う事とした。最初に、マウス繊維芽細胞である3T3-L1細胞を分化誘導させて成熟脂肪細胞にしたあとにマウスマクロファージ細胞であるRAW264.7細胞と共培養した。その結果、炎症誘導した脂肪細胞モデルを確立することができた。そこで、このモデル細胞を用いて、γ-トコトリエノールの効果について検討したが、残念ながら、炎症性サイトカインであるIL-1 等のmRNA発現を抑えることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Vitamin E has eight different naturally occurring forms: four tocopherols (Toc) and four tocotrienols (Toc-3), among which alpha-Toc, in particular, is known to be a major antioxidant for protection of cellular membranes. Vitamin E analogs are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman (CEHC) in vivo and excreted into urine. Although the CEHC form is the main metabolite of vitamin E, CEHC -particularly gamma-CEHC- has also been reported to have some physiological functions, for example as a natriuretic hormone and an antioxidant. Therefore, I investigated the effect of vitamin E and its metabolite on the adipocytes induced inflammation. At first, I determined the culture method of adipocytes (3T3-L1 cells) with macrophages (RAW264.7 cells). Next, I examined the effect of vitamin E on the adipocytes induced inflammation. According to this result, I was shown that gamma-tocotrienol could not suppress the inflammation of adipocytes.

研究分野：食品科学、栄養化学、ビタミン学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学B

キーワード：ビタミンE CEHC 脂肪細胞 炎症性サイトカイン 共培養法 アロエ抽出物

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミンEは脂溶性ビタミンの1つで、クロマン環の2位の位置に飽和型のフィチル側鎖が結合したものをトコフェロール、側鎖が不飽和型のものがトコトリエノールで、クロマン環にあるメチル基の数と位置の違いにより、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の4種類があり、合計8種類の同族体が自然界に存在する。この中で最も生理活性が高いものが $\alpha$ -トコフェロールで、抗酸化作用を初めとして多くの作用が報告されている。しかし近年、 $\alpha$ -トコフェロール以外の同族体(非 $\alpha$ -トコフェロール)も抗ガン作用、血管新生抑制作用等様々な研究が報告されている。しかし、そのような状態で、細胞内や各組織中のビタミンEを測定してもほとんど検出できない状態である。そのような報告から、ビタミンEは体内では別の活性型となって存在する可能性を推察した。実は、我々はその裏付けとなる研究をいくつか報告している。

ビタミンEの代謝は、まず、シトクロームP450によって、 $\omega$ -酸化を受けた後、フィチル側鎖の炭素が2つずつ開裂する $\beta$ -酸化を受けたのちに、最終的には carboxyethyl-hydroxychroman (CEHC)の形になると考えられている。特に、 $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノールの最終代謝物は $\gamma$ -CEHC 体であるが、この物質は、ナトリウム利尿性ホルモン様物質である LLU- $\alpha$  と同一物質であった。そこで、我々は $\gamma$ -トコフェロール(1,2)並びに $\gamma$ -トコトリエノール(3)を摂取した際に、体内で $\gamma$ -CEHC に変換することで、ナトリウム利尿作用を発揮する、つまり、プロドラッグ作用があるのではないかと考えた。高食塩食を摂取させたラットに $\gamma$ -トコトリエノールを投与すると、投与6~12 時間後にプラセボを投与した群と比べて有意に多くナトリウムを尿中に排泄する事を明らかにした。これは通常食を摂取させた場合では見られず、食塩を過剰に摂取した時にだけこの作用を発揮することを見出した。さらに、この時間帯の尿中 $\gamma$ -CEHC 量は予想に反して、高食塩食負荷群で通常群に比べて有意に多く排泄されていた。この結果より、体内で $\gamma$ -トコトリエノールから $\gamma$ -CEHC への変換が促進することで、ナトリウムの体外への排泄を促すことが明らかとなった。それゆえ、この機能に関しては、 $\gamma$ -CEHC が活性本体であり、生体内の状況によっては、CEHC の変換が調節されることが推察された。このように、 $\gamma$  体は肝臓または他の組織で $\gamma$ -CEHC に変換される事で有用な機能を発揮する事が示唆された。そこで、本研究では、ナトリウム利尿作用以外に他の新規機能性がないか

探索し、ビタミンEの活性型は CEHC であることを立証するデータを蓄積したいと考えた。

- 1) Uto H, Kiyose C et.al. *J.Nutr.Sci. Vitaminol.*, **30**, 277-282, 2004
- 2) Uto-Kondo H, Kiyose C et.al. *J.Clin.Biochem. Nutr.*, **41**, 211-217, 2007
- 3) Saito H, Kiyose C et.al. *J.Lipid Res.*, **44**, 1530-1535, 2003

## 2. 研究の目的

本研究では、生活習慣病発症の引き金となる肥満からの脂肪組織の炎症誘導に着目した。日本人での生活習慣病の罹患率は年々上昇しており、その予防や改善における対策が急がれている。生活習慣病発症の基盤には「肥満」がある。肥満とは、脂肪組織が過多になった状態であり、このような脂肪細胞の肥大が何かのきっかけで炎症誘導されると、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL 類が産生されることで、様々な生活習慣病の発症が引き起こされると推察されている。そこで、ビタミンEやその代謝物である CEHC が脂肪細胞の炎症誘導を抑制することが出来るかどうかについて検討することにした。最初に、炎症誘導された脂肪細胞系の確立を行う事にし、その培養法が確立されたら、ビタミンE及びCEHC の効果について検討することにした。培養細胞系での効果が認められれば、動物実験の方へ移行する予定である。

## 3. 研究の方法

(1)炎症誘導した脂肪細胞系(共培養法)の確立  
共培養法の検討であるが、脂肪細胞はマウス由来の 3T3-L1 繊維芽細胞を用いる事にした。この細胞はインスリン等により分化誘導することで脂肪細胞へと成熟する細胞である。この細胞に単球またはマクロファージを接触させる事で、炎症性サイトカインを発現させる系の検討を行った。検討に使用したのは、マウス単球細胞である WEHI-274.1 細胞ならびにマウス由来のマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞の2つである。その結果、WEHI-274.1 細胞に関しては残念ながら安定に炎症誘導を起こすことができなかったため、RAW264.7 細胞を使って検討することにした。エンドポイントを IL-1 $\beta$ 、IL-6 及び MCP-1 の mRNA 発現量が有意に上昇することとし、培養時間等の条件について検討を行った。

(2)炎症誘導した脂肪細胞系を用いてのビタミンE類の抗炎症効果について

上記で確立した細胞系を用いて、まずはγ-トコリエノールを添加し、培養12時間後ならびに24時間後でのIL-1β及びIL-6のmRNA発現量に対する効果について検討を行った。

### (3)炎症誘導した脂肪細胞系を用いてのアロエ抽出物の抗炎症効果について

ビタミンEの抗炎症効果が得られなかったことから、急きょ研究内容を方向転換し、確立した炎症誘導した脂肪細胞系を用いて、他の食品成分の効果について検討することとし、アロエについて検討を行う事とした。近年、アロエベラにヒト単球由来マクロファージであるTHP-1細胞におけるIL-1βのmRNA発現量を減少させる効果があったことが報告(4)されたことから、アロエに本研究での評価系で効果が発揮できる事が期待できる。アロエは約500種類程知られているが、ほとんどが観賞用で、食用、医薬品用として使えるものは数少ない。その中で化粧品や医薬品としてよく使用されているキダチアロエと食用として用いられているアロエベラについて検討することとした。キダチアロエ及びアロエベラとも外皮を除去し、葉肉の部分を凍結乾燥させ、ミルサーにて粉碎した。抽出溶媒をいくつか検討したが、今回は100%エタノール抽出物を用いる事にした。2週間分化誘導した3T3-L1細胞とRAW264.7細胞を12時間共培養した後、それぞれのアロエ抽出物を終濃度が50, 75, 100 μg/mLになるように添加した。24時間後に細胞を回収し、IL-1β, IL-6及びMCPのmRNA発現量をreal-time PCRにて測定した。

4)Budai MM et.al. *Molecular Immunology*, 56, 471-479, 2013

### (4) In vivo におけるアロエ摂取の抗炎症効果について

次にKK-TaJClマウスを用いて、アロエ摂取による脂肪組織の抗炎症効果について検討することにした。上記のマウスを高脂肪食を与えたコントロール群、ピオグリタゾン投与群、アロエベラ摂取群、キダチアロエ摂取群の4群に分けて、4週間飼育した。アロエは葉肉の部分を凍結乾燥し、粉碎したものを添加(2% w/w diet)した。4週間飼育後、エーテル麻酔下にて解剖し、腎周囲脂肪及び睪丸周囲脂肪を採取した。

## 4. 研究成果

### (1)炎症誘導した脂肪細胞系(共培養法)の確立方法で述べたように、3T3-L1細胞とマウスマク

ロファージ細胞であるRAW264.7細胞と共培養法の検討を行った。その結果、3T3-L1細胞の分化誘導1週間後及び2週間後でそれぞれ、RAW264.7細胞を接触させて、12時間後並びに24時間後の炎症性サイトカインの発現について検討した所、IL-βに関しては、分化誘導2週間後の細胞にRAW264.7細胞を接触させて12時間経つと、IL-1βのmRNA発現が有意に上昇した(図1)。また、IL-6のmRNA発現量については、分化誘導2週間後で、共培養を12時間した状態と24時間した状態ともIL-6のmRNA発現量は共に有意に上昇した(図2)。データは示さなかったがMCP-1の結果と合わせると、3T3-L1細胞を2週間分化誘導して成熟した脂肪細胞になったあと、RAW264.7細胞を12時間接触させると、各炎症性サイトカインが有意に発現することを明らかにした。

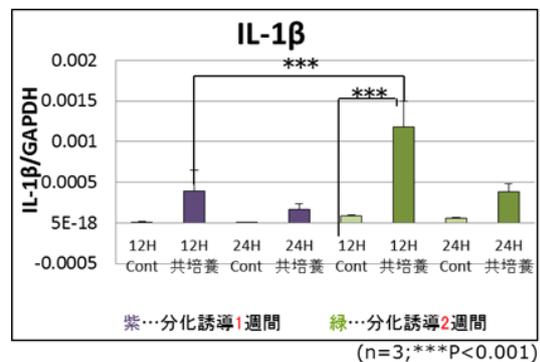


図1. 分化誘導及び共培養時間の違いによるIL-βのmRNA発現量の違いについて

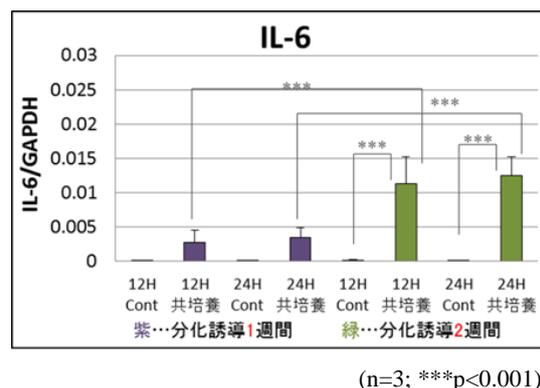


図2. 分化誘導及び共培養時間の違いによるIL-6のmRNA発現量の違いについて

### (2)炎症誘導した脂肪細胞系を用いてのビタミンE類の抗炎症効果について

上記示したように、炎症誘導した脂肪細胞のモデルを構築する事ができたので、ビタミンEについての炎症抑制効果について検討することにし

た。まず、ビタミンEの中で、体内で代謝物になりやすく、また様々な機能性について最近報告がある、 $\gamma$ -トコトリエノールについて検討することにした。 $\gamma$ -トコトリエノールの終濃度を 2, 5, 10 $\mu$ M にし、添加から 12 時間または 24 時間後にそれぞれ細胞を回収し、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量を見たところ、コントロールに比べて共培養群では、IL-1 $\beta$  の発現は上昇していたが、 $\gamma$ -トコトリエノールを添加したところ、添加 12 時間で抑制傾向が見られたものの有意な抑制は見られなかった(図 3)。以上の結果より、この系では、ビタミンEに抗炎症効果は見られない可能性が示唆された。この時点で、本評価系におけるビタミンEおよび代謝物の抗炎症効果については期待できないと判断し、次に別の食品成分についての抗炎症効果について検討することとした。

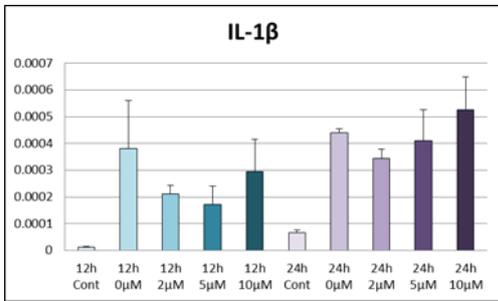
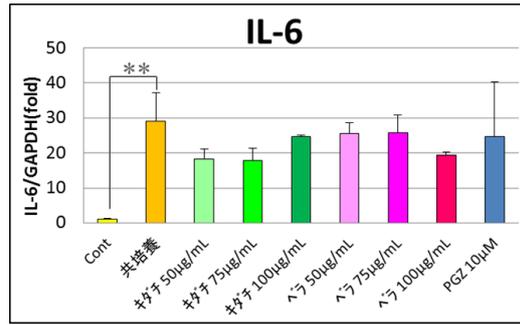


図 3.  $\gamma$ -トコトリエノールによる脂肪細胞の炎症抑制効果

### (3)炎症誘導した脂肪細胞系を用いてのアロエ抽出物の抗炎症効果について

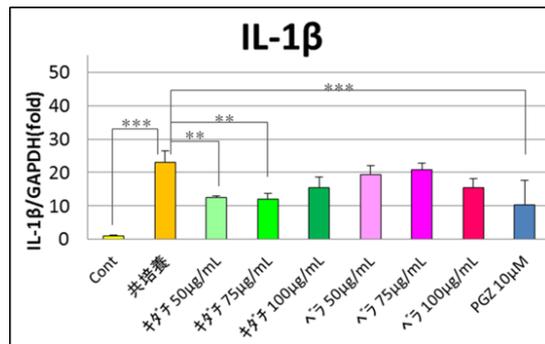
残念ながら、ビタミンEの抗炎症効果が期待できない事が示唆されたことから、別の食品成分について検討をすることとした。研究方法にも記載したように、アロエの中には抗炎症効果の報告があることから、本研究で確立できた脂肪細胞が炎症誘導された状態で、アロエに抗炎症効果があるかどうかについて検討した。その結果、IL-6 に関しては、コントロール群に比べて、共培養群でその mRNA 発現は有意に上昇したが、アロエベラ並びにキダチアロエ抽出物はキダチアロエで抑制傾向が見られたものの有意な抑制は認められなかった(図 4)。



(n=3; \*\*p<0.01)

図 4. 炎症誘導した脂肪細胞に対するアロエベラ並びにキダチアロエ抽出物の IL-6mRNA 発現に対する効果

一方、IL-1 $\beta$  に関しては、キダチアロエ 50 及び 75 $\mu$ g/mL 群で、有意に抑制し、その効果はピオグリタゾン 10 $\mu$ M(終濃度)添加群に匹敵する効果であることが明らかとなった(図 5)。

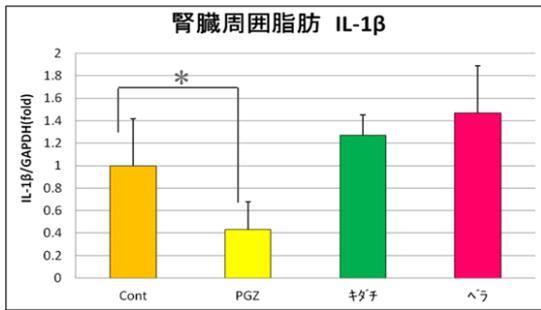


(n=3;\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

図 5. 炎症誘導した脂肪細胞に対するアロエベラ並びにキダチアロエ抽出物の IL-1 $\beta$  mRNA 発現に対する効果

### (4) In vivo におけるアロエ摂取の抗炎症効果について

KK マウスに高脂肪食と同時にアロエベラ並びにキダチアロエ果肉粉末を 4 週間摂取させた時の腎周囲脂肪の炎症性サイトカインの mRNA 発現への影響を検討した所、腎周囲脂肪中の IL-1 $\beta$  の mRNA 発現はコントロール群に比べて、ピオグリタゾン投与群で有意に低下したが、アロエベラ及びキダチアロエ群では有意な差は見られなかった(図 6)。



(n=4-7; \*p<0.05)

図6. 高脂肪食を摂取させたKK マウスにおけるアロエ摂取の抗炎症効果について

In vitro と in vivo での効果の違いについては、in vivo の場合、アロエ果肉全体の粉末物を摂取させたので、その影響が出たものと思われる。今後は、果肉粉末からのエタノール抽出物における in vivo の効果について検討する必要がある。

以上の結果より、キダチアロエ葉肉抽出物には in vitro において、脂肪細胞での炎症を抑制する効果があることが示唆された。今後は、アロエ中にある、炎症抑制効果を発揮した活性本体について同定する必要があると思われる。

※本研究の本来の目的は、ビタミンE及びビタミンEの代謝物であるCEHCが炎症誘導した脂肪細胞に対して改善効果をもたらすかということであったが、残念ながら抗炎症効果は見られなかった。しかし、炎症誘導した脂肪細胞のモデルは構築できたので、他の食品成分としてアロエに着目して検討を行った。タイトルとは大きくかけ離れてしまったことは反省点ではあるが、炎症誘導した脂肪細胞のモデルが構築できたので、それを用いて、アロエの新規機能を見出すことができた。

## 5. 主な発表論文等(計2件)

### 【学会発表】

- 1) 中村彩愛、武藤知衣、瀬戸口洋、五十嵐脩、清瀬千佳子:「脂肪組織における炎症誘導に対するトコトリエノール効果」日本ビタミン学会第65回大会(2013年、東京)
- 2) 武藤知衣、中村彩愛、小成遥、五十嵐脩、清瀬千佳子:「アロエ摂取がKK/Taマウスの脂質代謝に及ぼす影響」第68回日本栄養・食糧学会大会(2014年、札幌)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者