

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580172

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能強化による抗メタボリックシンドローム機能性食品の開発

研究課題名(英文)Studies on functional foods for anti-metabolic syndrome based on enhancements of mitochondrial functions

研究代表者

照屋 輝一郎 (TERUYA, Kiichiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10273971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉細胞を用いたミトコンドリア機能培養細胞評価系を構築しミトコンドリア機能亢進効果の検討を行った。(1) 5'-AMP-activated protein kinase、およびAcetyl-CoA carboxylaseの活性化を介した筋肉細胞のエネルギー代謝亢進効果、(2) 細胞内でのミトコンドリア生合成に関するPeroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 分子のmRNA発現量増加、(3) 細胞の呼吸活性の亢進効果、に代表される発酵乳ケフィアのミトコンドリア機能強化を介した抗メタボリックシンドローム効果を見いだした。

研究成果の概要(英文)：In vitro evaluation systems for mitochondrial function of myotubes were developed, and enhancing effects of mitochondrial functions were evaluated. The effectiveness of fermented milk Kefir was revealed. (1) Enhancing effects of energy metabolism in myotubes via activations 5'-AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase. (2) Enhancing effects of peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 alpha expression, which is the key molecule related to mitochondrial biogenesis. (3) Enhancing effects of cellular respiratory activities.

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：メタボリックシンドローム 機能性食品 細胞・組織 シグナル伝達 生理活性 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームメタボリックシンドロームとは動脈硬化による循環器病(心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症など)を個々の疾病としてではなく、包括的にとらえ、そして予防するための概念として提唱されたものであり、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、高脂血症のうちいずれか2つ以上を併せもった状態と定義されている。このメタボリックシンドロームは現代人のライフスタイル、即ち、過栄養、運動不足、ストレス過剰、高脂肪食過剰摂取という生活習慣の変化に伴い、その発症頻度は急速に増加している。日本人死亡原因の4人に1人はガンであるが、同じく4人に1人はメタボリックシンドロームが進展して循環器病で死亡したと考えることができ、今後重点的な研究と対策が必要とされている分野である。

メタボリックシンドロームの主要なリスクファクターである肥満の発症の主な原因は、脂肪組織へのトリアシルグリセロールの過蓄積であり、エネルギー代謝恒常性が破綻した状態とも考えられる。生体内において細胞内 ATP の枯渇を感知することで活性化し、糖や脂質の異化を促進し ATP 産生を促す“エネルギー代謝センサー”として 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) が注目されている。AMPK はアディポサイトカインなどによっても活性化し、様々な他の因子によっても制御を受けることが明らかになってきた。このように筋肉でのエネルギー代謝亢進を通じた抗メタボリックシンドロームを可能とする成分の探索および新規素材の発見に注目が集まっている。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームのリスクを低下させるためには肥満発症の抑制が有効な対処法となる。そこで第一に、細胞のエネルギー代謝システムの賦活化によりエネルギー利用強化を通じた抗生活習慣病物質の探索・開発が、第二にエネルギー代謝賦活化に重要な筋肉細胞をはじめとする細胞内ミトコンドリア機能の制御を可能とする物質の探索・開発これら二点がメタボリックシンドロームの発症予防・重篤化遅延に非常に有効であると考えた。

本研究課題では食品機能のターゲットとしてメタボリックシンドロームの改善に重要な役目を果たす筋肉細胞のミトコンドリア機能制御に定め、メタボリックシンドロームの発症予防・症状改善効果を行うものである。これまで申請者が見いだしてきた DNA 修復活性増強、細胞内タンパク質品質管理機能増強ならびに、脂肪細胞分化抑制効果を抗メタボリックシンドロームに利用することの可能性について検討を行った。上記各項に関する効果を *in vitro* では培養細胞システムの実験系において、*in vivo* では動物実験にお

いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 筋肉細胞の脂肪酸燃焼機能の制御

筋肉での脂肪酸燃焼は 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) や Acetyl-CoA carboxylase (ACC) により制御されているため、AMPK や ACC を活性化できる食品成分の探索・同定を試みた。AMPK や ACC はタンパク質リン酸化により活性制御されていることからリン酸化 AMPK またはリン酸化 ACC のイムノプロットングにより検討を行った。

(2) 筋肉細胞のグルコース取り込み機能の制御

細胞外のグルコースを筋肉細胞内に取り込むことはエネルギー代謝亢進の観点からみて筋肉の重要な機能の一つである。そこでグルコースの細胞内取り込み活性を増強する食品成分の探索・同定を試みた。細胞のグルコース取り込み能は RI 標識した 2-デオキシグルコースを用いて評価を行った。

(3) 筋肉細胞のミトコンドリア呼吸能の増強効果

筋肉細胞のモデルとマウス骨格筋由来 C2C12 筋芽細胞ならびに分化処理を行った C2C12 筋管細胞を用いてエネルギー代謝を亢進する機能性食品を検討した。細胞内呼吸活性はテトラゾリウム塩の一種である WST-1 を用いて評価した。

(4) 肝細胞のエネルギー代謝亢進効果

肝細胞での脂肪酸酸化を制御する因子の一つ AMPK を活性化できる食品成分の探索・同定を試みた。AMPK はリン酸化 AMPK のイムノプロットングにより評価を行った。また細胞自身の脂肪酸酸化は RI 標識した脂肪酸を用い、酸化により生じる CO₂ 量を測定することにより行った。また、肝細胞でエネルギー代謝に関わる上流因子の一つ peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は mRNA 発現量を定量 RT-PCR で評価した。

(5) メタボリックシンドロームのモデル動物を使用した抗メタボリックシンドローム効果の評価

メタボリックシンドロームモデルマウスを用い、本研究で得られた抗メタボリックシンドローム効果を *in vivo* で評価した。

4. 研究成果

筋肉細胞を用いてミトコンドリア機能培養細胞評価系を構築し、ミトコンドリア機能亢進効果の検討を行った。

マウス由来 C2C12 筋管細胞に4時間以上の発酵乳 NKG ケフィア処理を行うことで、細胞のミトコンドリアでのエネルギー代謝制御に関与する AMPK、および脂肪酸酸化に関与する ACC のリン酸化増強が確認されたことから筋肉細胞のミトコンドリア機能活性化が生じていると考えられた(図 1-2)。

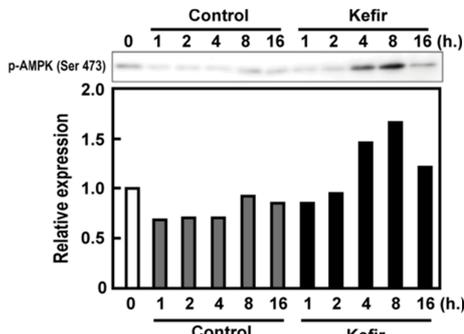


図1. C2C12細胞に対する発酵乳ケフィアのリン酸化 AMPK 増強効果

筋管細胞に分化誘導後ケフィアサンプル処理を行い、Western blotting によりリン酸化 AMPK 量を評価した。

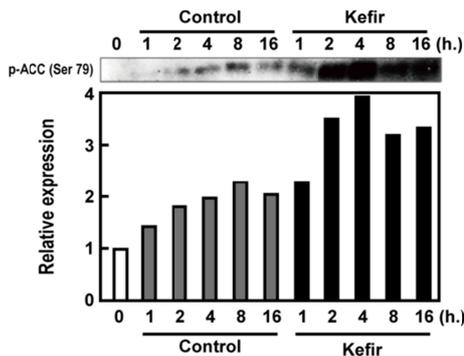


図2. C2C12細胞に対する発酵乳ケフィアのリン酸化 ACC 増強効果

筋管細胞に分化誘導後ケフィアサンプル処理を行い、Western blotting によりリン酸化 ACC 量を評価した。

さらに、脂肪細胞が分泌するホルモンの一種アディポネクチンは骨格筋に対して運動と同様の効果を示すことが知られている。このアディポネクチンの受容体である AdipoR1 の発現量が発酵乳 NKG ケフィア処理時間依存的に増加していた (図3)。

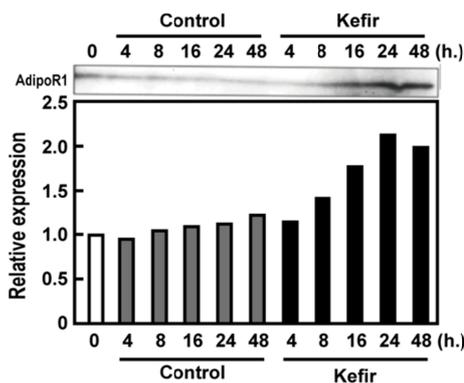


図3. C2C12細胞に対する発酵乳ケフィアの AdipoR1 発現増強効果

筋管細胞に分化誘導後ケフィアサンプル処理を行い、Western blotting により AdipoR1 量を評価した。

また、細胞内でのミトコンドリア生合成に関与している PGC-1 分子の mRNA 発現量は比較対照群において 12 時間以上の時点で減少していくのに対し、ケフィア処理群においては mRNA 発現量が維持されていること

が確認された (図4)。

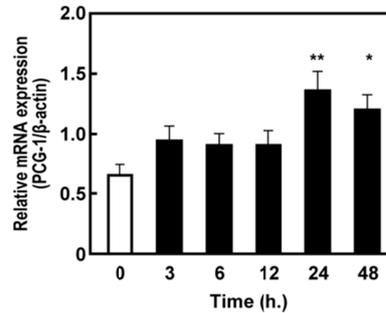


図4. C2C12細胞に対する発酵乳ケフィアの PGC-1α mRNA 発現増強効果

筋管細胞に分化誘導後ケフィアサンプル処理を行い、リアルタイム RT-PCR により PGC-1α mRNA 量を評価した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 0 h.)

以上のように、NKG ケフィアが筋肉のエネルギー代謝向上効果を持つことが強く示唆された。

細胞外グルコースを筋肉細胞内に取り込む活性を増強する食品成分の探索を行ったところ、発酵乳 NKG ケフィアに加え、還元水においても増強活性が確認された。さらにこの細胞内へのグルコース取込み増強効果はインスリン刺激の有無にかかわらず増強することが確認された。

筋肉細胞モデルの C2C12 細胞を用いてエネルギー代謝を亢進する機能性食品を検討した。細胞内呼吸活性をテトラゾリウム塩の一種である WST-1 を用いて評価したところ、C2C12 筋管細胞に対して発酵乳ケフィア処理を 48 時間行った結果、細胞の呼吸活性亢進効果が確認された (図5)。

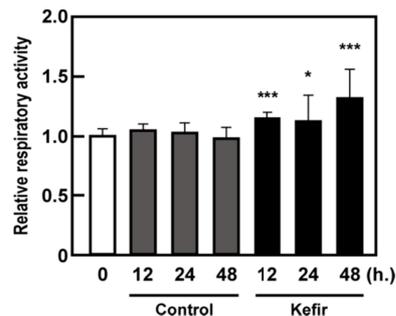


図5. C2C12細胞に対する発酵乳ケフィアの呼吸活性増強効果

筋管細胞に分化誘導後ケフィアサンプル処理を行い、WST-1 assay により細胞呼吸活性を評価した。(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs control)

マウス初代肝細胞を用いて肝細胞モデル系を構築し、エネルギー代謝への機能性を有する食品に関して検討を行ったところ、発酵乳ケフィア処理により肝細胞モデルにおける脂肪酸酸化の亢進が確認された (図6)。また、発酵乳ケフィア処理は肝細胞で AMPK を活性化することが確認され、また同時にエネルギー代謝制御に関わる上流因子の一つである PPAR の mRNA 発現量の上昇が確認

された(図7-8)。

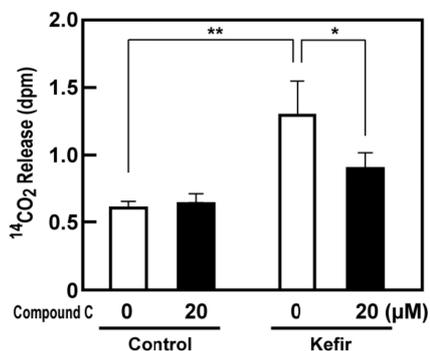


図6. マウス初代肝細胞に対する発酵乳ケフィアのパーミチン酸 酸化増強効果

マウス初代肝細胞に2時間の無血清培養後、6時間ケフィアサンプル処理の後、放出された¹⁴CO₂量より酸化量を評価した。Compound C: AMPKの阻害剤。(**p* < 0.05, ***p* < 0.01)

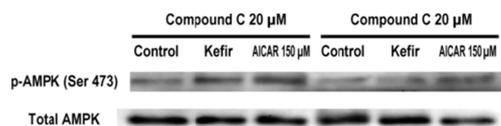


図7. マウス初代肝細胞に対する発酵乳ケフィアのリン酸化 AMPK 増強効果

マウス初代肝細胞に2時間の無血清培養後、2時間ケフィアサンプル処理を行い、Western blottingによりリン酸化 AMPK 量を評価した。AICAR: AMPKの活性化剤、Compound C: AMPKの阻害剤。

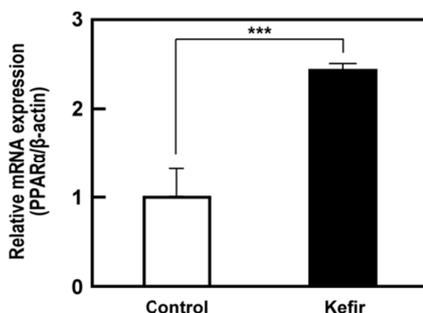


図8. マウス初代肝細胞に対する発酵乳ケフィアの PPAR mRNA 発現増強効果

マウス初代肝細胞にケフィアサンプル処理を行い、リアルタイム RT-PCRにより PPAR mRNA 量を評価した。(***p* < 0.01 vs control)

メタボリックシンドロームモデルマウスを用い、本研究で得られた抗メタボリックシンドローム効果を *in vivo* で評価した。

メタボリックシンドロームモデルマウス KK-A^y マウスを用いて検討したところ、発酵乳ケフィア投与による血中アディポネクチン量の変化は見られなかったが、耐糖能の改善と血中インスリン量の低下が認められ2型糖尿病症状の改善が強く示唆された(図9-11)。

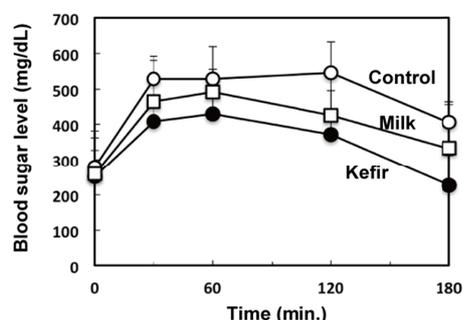


図9. メタボリックシンドロームモデル KK-A^y マウスに対する発酵乳ケフィアの耐糖能改善効果

ケフィアおよびミルクは高脂肪飼料 Quick Fat に混合し、自由摂取させた(サンプル重量 3.25 mg/g body weight に設定)。本飼育後 39 日目に耐糖能試験を行った。耐糖能試験は、生理食塩水に溶かしたグルコース 1 g/kg body weight を腹腔内注射により投与した後、経時的(0、30、60、120、および 180 分後)に血糖値を測定した。

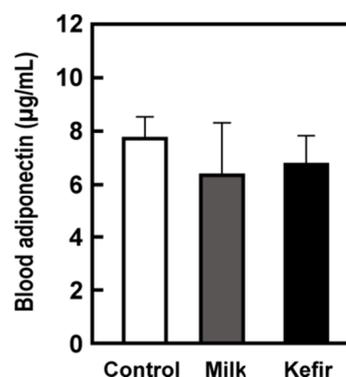


図10. メタボリックシンドロームモデル KK-A^y マウスの血中アディポネクチン濃度及ばず発酵乳ケフィアの効果

本飼育後 42 日目に血液を採取し得られた血清中のアディポネクチン量を ELISA 法にて測定した。

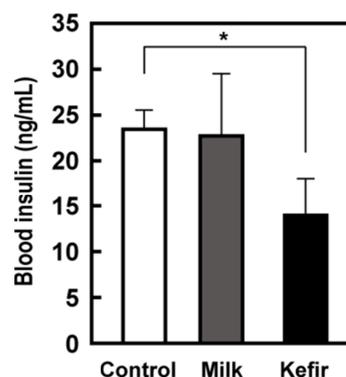


図11. メタボリックシンドロームモデル KK-A^y マウスの血中インスリン濃度及ばず発酵乳ケフィアの効果

本飼育後 42 日目に血液を採取し得られた血清中のインスリン量を ELISA 法にて測定した。(**p* < 0.05 vs control)

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11件)

- Tomimatsu, K., Matsumoto, S.-E., Tanaka, H., Yamashita, M., Nakanishi, H., Teruya, K., Kazuno, S., Kinjo, T., Hamasaki, T., Kusumoto, K.-I., Kabayama, S., Katakura, Y., Shirahata, S. A rapid screening and production method using a novel mammalian cell display to isolate human monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読あり), **441**(1), 59-64 (2013). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.007
- Nakanishi, H., Hamasaki, T., Kinjo, T., Yan, H., Nakamichi, N., Kabayama, S., Teruya, K., Shirahata, S. Low concentration platinum nanoparticles effectively scavenge reactive oxygen species in rat skeletal L6 cells. *Nano Biomed. Eng.* (査読あり), **5**(2), 76-85 (2013). doi: 10.5101/nbe.v5i2.p76-85
- Teruya, K., Myojin-Maekawa, Y., Shimamoto, F., Watanabe, H., Nakamichi, N., Tokumaru, K., Tokumaru, S., Shirahata, S. Protective effects of the fermented milk Kefir on X-ray irradiation-induced intestinal damage in B6C3F1 mice. *Biol. Pharm. Bull.* (査読あり), **36**(3), 352-359 (2013). doi: 10.1248/bpb.b12-00709
- Zhang, Z., Teruya, K., Eto, H., Shirahata, S. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読あり), **77**(2), 235-242 (2013). doi: 10.1271/bbb.120631
- Zhang, Z., Teruya, K., Yoshida, T., Eto, H., Shirahata, S. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Mar. Drugs.* (査読あり), **11**(1), 81-98 (2013). doi: 10.3390/md11010081.
- Kinjo, T., Ye, J., Yan, H., Hamasaki, T., Nakanishi, H., Toh, K., Nakamichi, N., Kabayama, S., Teruya, K., Shirahata, S. Suppressing effects of electrochemically reduced water on matrix metalloproteinase-2 activities and in vitro invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cytotechnol.* (査読あり), **64** (3) 357-371 (2012). doi: 10.1007/s10616-012-9469-7.
- Li, Y., Hamasaki, T., Teruya, K., Nakamichi, N., Gadek, Z., Kashiwagi, T., Yan, H., Kinjo, T., Komatsu, T., Ishii, Y., Shirahata, S. Suppressing effects of natural reduced waters on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Cytotechnol.* (査読あり), **64** (3) 281-297 (2012). doi: 10.1007/s10616-011-9414-1.
- Shirahata, S., Hamasaki, T., Teruya, K. Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends Food Sci. Technol.* (査読あり), **23**(2), 124-131 (2012). doi:

10.1016/j.tifs.2011.10.009

- Yan, H., Kinjo, T., Tian, H., Hamasaki, T., Teruya, K., Kabayama, S., Shirahata, S. Mechanism of the lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by electrolyzed reduced water-participation of Pt nanoparticles. *Biosci. Biotech. Biochem.* (査読あり), **75**(7), 1295-1299 (2011). Doi: 10.1271/bbb.110072
- Zhang, Z., Teruya, K., Eto, H., Shirahata, S. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ros-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. *PLoS One.* (査読あり), **6**(11), e27441 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0027441

〔学会発表〕(計51件)

- 中西 恵ら(7名), (2014) 白金ナノ粒子及び分子状水素の併用処理によるガン細胞のアポトーシス誘導機構. 2014年3月30日. 日本農芸化学会2014年度大会(川崎市・明治大学生田キャンパス).
- 浜崎 武記ら(7名), (2014) ラジカル補足剤DBNBsを利用した抗酸化活性評価. □ 2014年3月28日. 同上.
- 中西 恵ら(7名), (2013) 白金ナノ粒子及び水素の併用処理によるガン細胞のアポトーシス誘導機構. 2013年12月3日. 第36回日本分子生物学会年会(神戸市・神戸国際展示場).
- 菅 真樹ら(6名), (2013) 白金ナノ粒子の細胞内取り込みと抗酸化作用. 2013年11月16日. 第12回日本機能水学会学術大会(福岡市・アクロス福岡).
- 中西 秀和ら(8名), (2013) 合成白金ナノ粒子の細胞内抗酸化機構. 2013年11月16日. 同上.
- 中西 恵ら(7名), (2013) 白金ナノ粒子存在下での水素分子によるガン細胞のアポトーシス誘導機構. 2013年11月16日. 同上.
- 末永 美由紀ら(5名), (2013) 発酵乳ケフィアによる筋肉細胞のエネルギー代謝亢進効果. 2013年9月6日. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区2013年度合同広島大会(広島市・広島県立大学).
- 山本 諭司ら(4名), (2013) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタマメ抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果. 2013年9月6日. 同上.
- 石橋 祐子ら(4名), (2013) 酵素消化低分子化フコイダンのガン細胞に対する増殖抑制効果の検討. 2013年9月6日. 同上.
- 森田 将平ら(5名), (2013) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果. 2013年07月19日. 第26回日本動物細胞工学会2013

- 年度大会 (JAAC2013) (福井市・ホテルフジタ福井).
- 浜崎 武記ら(7名), (2013) 培養動物細胞に及ぼす白金ナノ粒子の抗酸化効果. 2013年3月25日. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台市・東北大学川内北キャンパス).
 - 山川 智寛ら(8名), (2013) 抗糖尿病効果を示す天然還元水の機能評価法の開発. 2013年3月25日. 同上.
 - Sanetaka Shirahata, Takeki Hamasaki, Kiichiro Teruya, (2012) Newest research on the health benefit of electrochemically reduced water. 2012年11月27日. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (名古屋市・名古屋国際会議場).
 - Hidekazu Nakanishi *et al.*, (6名), (2012) Action mechanism of platinum nanoparticles as redox regulation factors. 2012年11月30日. 同上.
 - Tomoya Kinjo *et al.*, (8名), (2012) Antioxidative effects of hydrogen via redox regulation mechanism in animal cells. 2012年11月30日. 同上.
 - Takeki Hamasaki *et al.*, (7名), (2012) Analysis of apoptosis pathway induced by platinum nanoparticles and hydrogen molecules. 2012年11月30日. 同上.
 - 成田 義篤ら(6名), (2012) 天然還元水によるアロキサン誘導1型糖尿病の抑制. 2012年11月25日. 第10回日本予防医学学会学術総会 (広島市・広島大学霞キャンパス内広仁会館).
 - 片山 貴博ら(5名), (2012) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物の細胞表面糖鎖構造変化を伴うガン細胞死誘導効果. 2012年9月28日. 平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (鹿児島市・鹿児島大学).
 - 森田 将平ら(6名), (2012) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果. 2012年9月28日. 同上.
 - 佐藤 愛弥ら(5名), (2012) 発酵乳 NKG ケフィアの抗メタボリックシンドローム効果. 2012年9月28日. 同上.
 - 濱崎 武記ら(7名), (2012) 電解還元水による細胞内糖取り込み促進効果. 2012年9月28日. 同上.
 - 照屋 輝一郎、吉田 年宏、白畑 實隆 (2012) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用による抗腫瘍増強効果. 2012年9月19日. 第71回日本癌学会学術総会 (札幌市・ホテルロイトン札幌).
 - 照屋 輝一郎ら(7名), (2012) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用による抗腫瘍増強効果. 2012年5月19日. 第66回日本栄養・食糧学会大会 (仙台市・東北大学川内北キャンパス).
 - 濱崎 武記ら(8名), (2012) 電解還元水による糖尿病改善効果の解析. 2012年5月20日. 同上.
 - 照屋 輝一郎ら(6名), (2011) Anti-tumor effects of fucoidan extract: Induction of cancer cell-specific cell death and alteration of sugar chain synthesis pathways. 2011年12月14日. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜市・パシフィコ横浜).
 - 濱崎武記ら(8名), (2011) 電解還元水モデル水の2型糖尿病抑制効果の解析. 2011年12月10日. 第9回日本機能性食品医学学会総会 (大阪府吹田市・大阪大学コンベンションセンター).
 - 照屋 輝一郎ら(6名), (2011) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物による糖鎖合成経路の改変誘導. 2011年12月10日. 同上.
 - 濱崎 武記ら(8名), (2011) 電解還元水モデル水による2型糖尿病の抑制機構. 2011年11月19日. 第9回日本予防医学学会学術総会 (東京都荒川区・首都大学東京荒川キャンパス).
 - 栗田 真衣ら(7名), (2011) 発酵乳 NKG ケフィアによる筋肉・脂肪細胞の分化機能の制御. 2011年9月17日. 平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 (宮崎市・宮崎大学).
 - 井上 貴博ら(5名), (2011) 酵素消化低分子化フコイダン抽出物の抗ガン作用増強効果の開発. 2011年9月17日. 同上.
 - Zhongyuan Zhang *et al.*, (4名), (2011) Low molecular weight fucoidan extract inhibits proliferation of MCF-7 human breast cells by inducing apoptosis. 2011年7月23日. 第24回日本動物細胞工学会2011年度大会 (東京都文京区・東京大学山上会館).
 - Hanxu Yan *et al.*, (7名), (2011) The neuroprotective effects of electrolyzed reduced water and its model water containing molecular hydrogen and Pt nanoparticles. 2011年5月16日. The 22nd Meeting of European Society for Animal Cell Technology (Vienna, Austria).
 - Zhongyuan Zhang *et al.*, (4名), (2011) The mechanism of apoptosis induction in MCF-7 human breast carcinoma cells by low molecular weight fucoidan extract. 2011年5月16日. 同上.
 - Sanetaka Shirahata *et al.*, (7名), (2011) The regulation mechanism of glucose transportation by hydrogen and platinum nanoparticles. 2011年5月16日. 同上.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 輝一郎 (TERUYA, Kiichiro)
九州大学・農学研究院・助教
研究者番号: 10273971