

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590291

研究課題名(和文) 脂肪細胞と血管内皮細胞の相互作用を改善する天然資源物質の解析

研究課題名(英文) Study of natural resources improving the interaction between adipocytes and vascular endothelial cells

研究代表者

上嶋 繁 (UESHIMA, Shigeru)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：30193791

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

研究成果の概要(和文)：肥満は脂肪細胞の油滴蓄積によって生じ、動脈硬化症の増悪因子である。動脈硬化症の進展には、血管内皮細胞の遊走により引き起こされる血管新生が関わっている。また、血管内皮細胞には血栓形成を防ぐ機能がある。本研究では、脂肪細胞と血管内皮細胞の相互作用に影響する天然資源物質を解析した。その結果、黒豆の色素成分であるcyanidin-3-glucosideや腐植物質が脂肪細胞存在下における血管内皮細胞の遊走能を抑制して動脈硬化の進展を抑制するだけでなく、血栓形成をも抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Obesity is caused by the accumulation of oil into adipocytes and the deterioration factor for atherosclerosis. Angiogenesis induced by the migration of vascular endothelial (VE) cells is involved in acceleration of atherosclerosis. On the other hand, VE cells contribute to prevention of thrombogenesis. In this study, the natural resources which affect the interaction between adipocytes and VE cells were investigated. As a result, it was clarified that cyanidin-3-glucoside, natural pigments from black soy beans, and the humic substance inhibited the migration of VE cells in the presence of adipocytes. Moreover, it was demonstrated that the humic substance suppressed the progression of atherosclerosis and induced anti-thrombotic effect in animal model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：脂肪細胞 血管内皮細胞 遊走 動脈硬化 肥満 天然資源物質

## 1. 研究開始当初の背景

肥満を抑制し動脈硬化症や血栓症などを予防する目的で数多くの食品や食品成分が市場に出回っている。しかしながら、その効果についての科学的なエビデンスは乏しく、生物化学的な裏づけが証明されていないものも存在する。動脈硬化症の進展には動脈硬化巣周辺の動脈外膜から硬化巣への血管新生や、不安定プラーク内の血管新生が関与することが知られている。血管新生は血管内皮細胞の増殖や遊走から引き起こされ、血管内皮細胞が有するこれらの生物化学的機能は動脈硬化の進展に深くかかわっている。一方、血管内皮細胞は抗血栓性を有し、血管内での血液の流動性を保ち、血液循環の維持に必要な役割を演じている。血管内皮細胞は血栓溶解を促進する組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator : t-PA) およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator : u-PA) を産生・分泌するとともに、これらの PA 活性を阻害して血栓溶解を抑制するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター - 1 (PA inhibitor-1: PAI-1) も産生・分泌している。そして、これらのアクチベーターとインヒビターの活性バランスに基づいて線溶活性 (血栓溶解活性) が決定され、抗血栓性が制御されている。

肥満は脂肪細胞の増大によって生じるが、脂肪細胞からは生理活性物質のアディポサイトカインとして PAI-1 が分泌されている。さらに脂肪細胞の分化には u-PA レセプターが関わっており、脂肪組織の周囲に存在する血管内皮細胞から分泌される u-PA によってその分化が促進される可能性がある。このように脂肪細胞と血管内皮細胞とは相互に密接な関係にあるにもかかわらず、脂肪細胞と血管内皮細胞の共存下における両細胞の生理作用およびそれぞれの機能変化についての報告は国内外を通じてほとんど見当たらない。申請者は、ある種のミネラル成分が培養血管内皮細胞からの PAI-1 分泌を抑制することを明らかにしており、天然資源中の生理活性物質が脂肪細胞および血管内皮細胞の相互作用に影響を及ぼして、その作用を改善する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

脂肪細胞からはレプチン、アディポネクチンなど数多くのアディポサイトカインが分泌されている。これらのアディポサイトカインは血管内皮細胞に作用し、血管内皮細胞の生理作用を変化させることによって動脈硬化の進展や血栓形成などに基づく生活習慣病を引き起こすと考えられる。飲料水や食物などの天然資源中には多くの生理活性物質が含まれており、これらが脂肪細胞や血管内

皮細胞に作用することは容易に考えられる。そこで、本研究の目的は、脂肪細胞と血管内皮細胞の共存下において、抗肥満、抗動脈硬化および抗血栓効果を発揮する天然資源物質を解明することである。特に動脈硬化の進展に悪影響を及ぼす血管新生に着目し、油滴を蓄積した脂肪細胞と血管内皮細胞の共存下における血管内皮細胞の遊走能を改善する天然資源物質を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪細胞の油滴蓄積におよぼす天然資源物質の影響

マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を 24well プレートの各 well は  $0.045 \times 10^5$  個播種し、コンフルエントになるまで 10% FBS 含有 DMEM 培地で培養した。コンフルエントの状態ですらに 2 日間培養し、分化誘導培地に交換して 2 日間培養した後、3 日目に分化維持培地に交換した。

分化維持培地に容量%が 1% となるように天然資源物質を加えておき、2 日毎に培地交換を行った。以後、2 日おきに分化維持培地を交換しながら 8 日間培養を続け、経時的に分化した脂肪細胞を Oil Red O で染色した。Oil Red O 染色後に細胞から抽出した色素液の波長 492nm における吸光度を測定し、油滴の蓄積量として評価した。

天然資源物質として、黒豆の色素成分である cyanidin-3-glucoside (C3G)、有明海産の海洋性腐植土水抽出物質 (腐植物質)、葉野菜の一種である大和マナの凍結乾燥粉末、およびネギの一種である結崎ネブカの凍結乾燥粉末を用いた。腐植物質とは、生物の死後、生物体有機物が微生物的・化学的作用を受けて崩壊して生じた「化学構造が特定されない有機物 (非生物体有機物) の総称」である。

### (2) 脂肪細胞存在下での血管内皮細胞の遊走能の検討

Double boyden chamber 法を応用して脂肪細胞存在下におけるマウス由来血管内皮細胞 (TKD-2) の遊走能を評価した。1% の各種天然資源物質含有分化維持培地で down chamber 内の 3T3-L1 前駆脂肪細胞を培養した。分化誘導培地から分化維持培地に交換した日を分化 0 日目として分化維持培地は 2 日毎に交換し、分化 2 日目、4 日目、6 日目および 8 日目にマウス由来血管内皮細胞を播種した upper chamber を各 well に装着した。

Upper chamber 装着 4 時間後に upper chamber の底面を構成するメンブレンの裏側に遊走してくる細胞数を顕微鏡下で計測した。すなわち、分化 0 日目から分化 8 日目の脂肪細胞が存在する down chamber (24well プレートの各 well) に血管内皮細胞を播種した upper chamber を装着し、4 時間後に upper

chamber の底面を構成するメンブレンの裏側に遊走してくる細胞数を顕微鏡下で計測した(図1)。脂肪細胞は  $0.045 \times 10^5$  個/well 播種し、血管内皮細胞は upper chamber に  $0.3 \times 10^5$  個播種した。

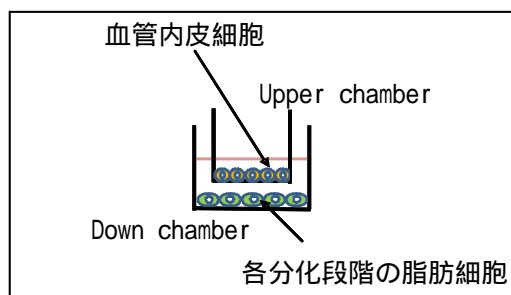


図1 脂肪細胞存在下での血管内皮細胞の遊走能の検討

### (3) 脂肪細胞と血管内皮細胞の共培養液中線溶活性の測定

(2)の実験条件に従い、脂肪細胞の分化維持培地に容量%が1%となるように各種天然資源物質を加えて2日毎に培地交換を行い、以後、2日おきに分化維持培地を交換しながら8日間培養を続けた。そして、8日目の培養液中に含まれるPA活性をフィブリンエンザイモグラフィにて検討した。

フィブリンエンザイモグラフィはSDS-PAGEとフィブリン平板法の原理を組み合わせた方法であり、PA用物質の検出とその分子量を同時に評価することができる。すなわち、SDS-ポリアクリルアミドゲル中にはフィブリンとプラスミノゲンが含まれており、電気泳動を行うことによって試料中のPAがその分子量に応じて泳動されると、その部位でPAがプラスミノゲンをプラスミンに活性化し、その部位のフィブリンを溶解してフィブリン溶解バンドが現れる。

### (4) *In vivo*における天然資源物質の効果

天然資源物質の動脈硬化症進展に及ぼす影響および抗血栓性に対する効果を、高脂肪食を摂取させたラットを用いて検討した。本実験は、近畿大学動物実験委員会の承認を受け、近畿大学動物実験規定に従って実施した。

雄性Wistar系6週齢ラットを日本クレア(株)より購入し、使用した。対照群8匹には水道水を与え、腐植物質群8匹には腐植物質を3%含む水道水与えた。飼料として、普通食群にはMF(オリエンタル酵母工業(株)、東京、日本)を与え、脂肪食群にはQuick Fat(日本クレア(株)、東京、日本)を与えた。実験期間を通して飲料水、飼料ともに自由摂取させ、温度は23~25、12時間の明暗サイクル(明期:7~19時、暗期:19~7時)

で飼育を行った。ラットの体重、飲水量、飼料摂取量の測定は隔日に行った。9週間の実験飼育後、採血及び臓器を摘出した。血清と血漿を調整後、血中脂質濃度、血中酸化脂質濃度を測定した。胸部大動脈の脂質沈着量をオイルレッドO染色と画像処理により定量化した。血漿のユーグロブリン分画中のPA活性をフィブリンエンザイモグラフィにて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪細胞の油滴蓄積におよぼす天然資源物質の影響

分化した3T3L-1脂肪細胞を分化維持培地で培養したところ、日数の経過とともに油滴蓄積量の増加が認められた。C3G(最終濃度20 $\mu$ M)、腐植物質(最終濃度1v/v%)、大和マナ(最終濃度1v/v%)、結崎ネブカ(最終濃度1v/v%)は分化8日目の油滴蓄積量をコントロールよりも有意に低下させた(図2)。

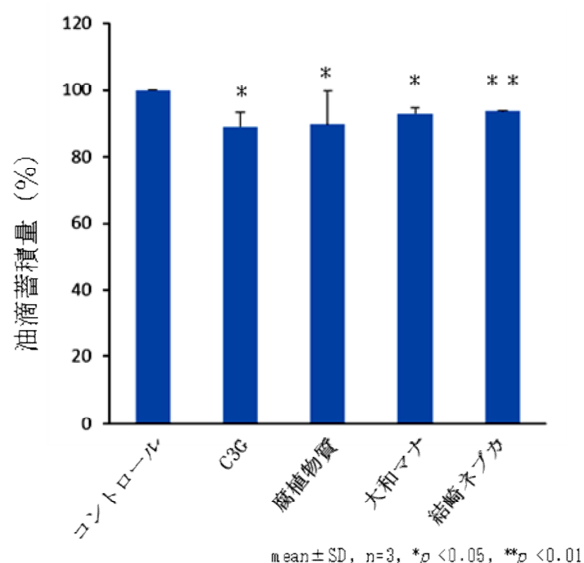


図2 天然資源物質の油滴蓄積に及ぼす影響

### (2) 脂肪細胞存在下での血管内皮細胞の遊走能の検討

血管内皮細胞の遊走能は脂肪細胞非存在下よりも脂肪細胞存在下において増強していた。この血管内皮細胞の遊走能の増強は脂肪細胞の分化日数に依存していた。

脂肪細胞存在下で増強した血管内皮細胞の遊走能はC3Gおよび腐植物質により有意に減弱されたが、大和マナおよび結崎ネブカによる影響は認められなかった(図3)。

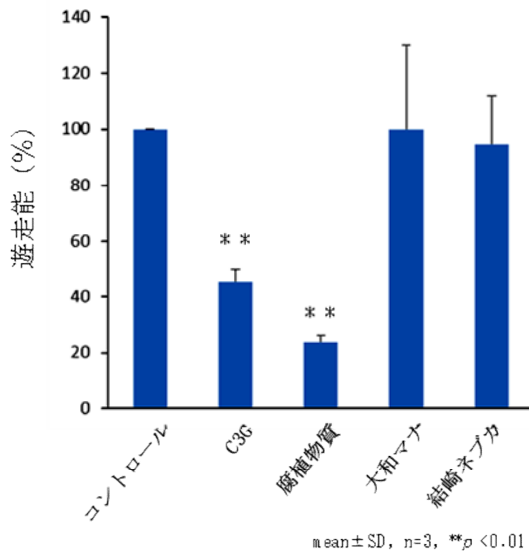


図3 脂肪細胞存在下における血管内皮細胞の遊走能におよぼす天然資源物質の影響

### (3) 脂肪細胞と血管内皮細胞の共培養液中線溶活性の測定

大和マナと結崎ネブカは、脂肪細胞と血管内皮細胞の共培養時の u-PA 活性量に明らかな影響を及ぼさなかった (図4)。

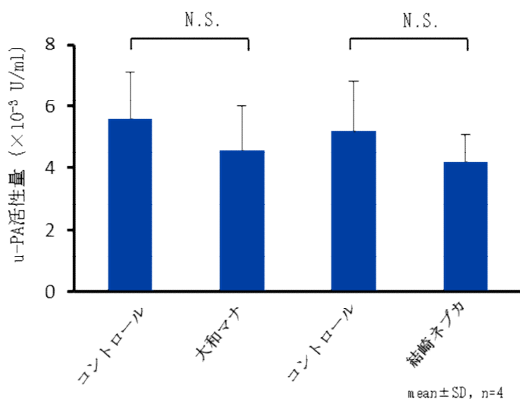


図4 脂肪細胞と血管内皮細胞の共培養時の u-PA 活性量に及ぼす天然資源物質の影響

### (4) *In vivo*における天然資源物質の効果

普通食を摂取させた場合、コントロール群と腐植物質投与群で、体重、飼料摂取量、飲水量に有意差は認められなかった。高脂肪食を摂取させた場合にも、コントロール群と腐植物質投与群で、体重、飼料摂取量、飲水量に有意差は認められなかった。

脂肪組織重量は、精巣周囲部、後腹部の脂肪、腸間膜の総重量をラットの体重 1g 当たり換算して求めた。普通食を摂取させたラットにおいて、腐植物質群とコントロール群の2群間で脂肪組織重量に有意差は認められ

なかった。一方、高脂肪食を摂取させた場合、腐植物質群の脂肪組織重量は  $0.042 \pm 0.002g$  であり、コントロール群の脂肪組織重量 ( $0.049 \pm 0.002g$ ) よりも有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。

高脂肪食を投与した場合の血液生化学的検査において、腐植物質群のトリグリセリド濃度がコントロール群よりも有意に低下していた (表1)。

表1 高脂肪食を摂取させたラットの血液生化学的検査値

	コントロール群	腐植物質群
LDL- コレステロール濃度 (mg/dl)	$10.02 \pm 0.57$	$7.42 \pm 0.34$
トリグリセリド濃度 (mg/dl)	$95.83 \pm 18.1$	$54.38 \pm 7.94^*$
TBARS ( $\mu M$ )	$25.42 \pm 6.56$	$21.25 \pm 6.01$
過酸化脂質濃度 ( $\mu M$ )	$0.66 \pm 0.26$	$0.59 \pm 0.17$

TBARS; チオバルビツール酸反応物

mean ± S.E., \*p < 0.01

普通食を投与した場合、胸部大動脈の脂質沈着量はコントロール群と腐植物質群で有意な差は認められなかった。しかし、高脂肪食を投与した場合、腐植物質群における胸部大動脈への脂質沈着量はコントロール群よりも有意に減少していた。また、高脂肪食を投与した場合、腐植物質群のユーグロブリン分画中 PA 活性はコントロール群よりも有意に増加していた。

以上の成果より、天然資源物質の C3G、腐植物質、大和マナおよび結崎ネブカは脂肪細胞への油滴蓄積を抑制することが明らかとなった。しかし、脂肪細胞と共存させた血管内皮細胞の遊走能を有意に抑制したのは C3G と腐植物質のみであった。大和マナと結崎ネブカが脂肪細胞存在下における血管内皮細胞の遊走能に変化を来さなかった理由の一つとして、共培養液中 u-PA 活性に変化がなかったことが挙げられる。

血管内皮細胞の遊走能は血管新生に関与し、遊走能の低下は血管新生の抑制につながるから、これらの天然資源物質は肥満時の動脈硬化進展予防に有効と考えられた。そこで、ラットに高脂肪食と腐植物質を同時投与したところ、脂肪組織重量と血中トリグリセリド濃度は低下し、胸部大動脈への脂質沈着量は減少した。さらに血液中の線溶活性は上昇し、抗血栓性も増強した。

本研究で脂肪細胞と血管内皮細胞の共存下で生理活性物質を探索するという方法を確立した。この方法は肥満という生体環境により近づけて解析する方法であることから、国内外で非常にインパクトの高い研究手法

であると考えられる。また、この手法を用いて、肥満に伴う動脈硬化症の発症や進展を抑制する天然資源物質を見出すことができたことは本研究の大きな成果であり、今後の研究・開発につながるとともに、さらなる天然資源物質の解析が望まれる。また、今後の課題として、本研究で明らかにされた腐植物質の作用が、どのような成分によるものかを解明する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Tamura Y, Ueshima S, Matsuo O. (他 4 名、5 番目) Enzamin ameliorates adipose tissue inflammation with impaired adipocytokine expression and insulin resistance in db/db mice. *J Nutr Sci*. 2: 1-10, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/jns.2013.34>

Okada K, Ueshima S, Matsuo O. (他 10 名、2 番目) Lack of both 2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci*. 93(2-3):89-95, 2013.

DOI: [10.1016/j.lfs.2013.05.023](http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.05.023).

Kanno Y, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他 3 名、5 番目) Alpha2-antiplasmin regulates the development of dermal fibrosis in mice by prostaglandin F(2) synthesis through adipose triglyceride lipase/calcium-independent phospholipase A(2). *Arthritis Rheum*. 65(2):492-502, 2013.

DOI: [10.1002/art.37767](http://dx.doi.org/10.1002/art.37767).

Okada K, Ueshima S, Matsuo O. (他 4 名、2 番目) A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *J. Thromb Haemost*. 9(5):997-1006, 2011.

DOI: [10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x).

Okada K, Ueshima S, Matsuo O. (他 4 名、2 番目) A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *J. Thromb Haemost*. 9(5):997-1006, 2011.

DOI: [10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x).

Tamura Y, Okada K, Ueshima S, Matsuo O. (他 3 名、5 番目) Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus*. *J Thromb Thrombolysis*. 32(2):195-200, 2011.

DOI: [10.1007/s11239-011-0552-2](http://dx.doi.org/10.1007/s11239-011-0552-2).

〔学会発表〕(計 9 件)

岡田清孝、上嶋 繁、2-アンチプラスミン/プラスミノゲンアクチベータインヒビタタイプ1 遺伝子欠損マウスは高 IgE 産生を示す、第 91 回 日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日、鹿児島大学(鹿児島)

山下里奈、上嶋 繁、脂肪細胞存在下における血管内皮細胞の遊走能に及ぼすアントシアニンの影響、第 13 回 日本抗加齢医学会総会、2013 年 6 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

岡田清孝、上嶋 繁、松尾 理、新規合成ペプチドのプラスミノゲン活性化および血栓溶解に対する促進作用、第 90 回 日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、タワーホール船堀(東京)

山下里奈、上嶋 繁、血管内皮細胞の抗血栓性に影響する食物由来物質の探索、第 22 回 日本病態生理学会、2012 年 8 月 3 日、湯布院厚生年金病院(由布)

山下里奈、上嶋 繁、褐藻類由来成分の抗血栓効果についての検討、第 12 回 日本抗加齢医学会総会、2012 年 6 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

永井信夫、岡田清孝、上嶋 繁、松尾 理、虚血性脳傷害後に伴う血管透過性亢進の時間的および空間的な違いの検討、第 89 回 日本生理学会大会、2012 年 3 月 30 日、松本市総合体育館(長野)

勇井克也、山下里奈、上嶋 繁、脂肪細胞と血管平滑筋細胞の共存下におけるアントシアニンの効果、第 21 回 日本病態生理学会、2011 年 8 月 20 日、日本大学医学部(東京)

Tamura Y, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Potentiation of plasmin activity by enzamin, an extract of metabolite from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus* in vitro and in vivo, The XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011 年 7 月 26 日、京都国際会議場(京都)

Okada K, Ueshima S, Matsuo O, A new synthetic peptide (sp) enhances plasminogen activation by t-PA, The XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011 年 7 月 26 日、京都国際会議場(京都)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 海洋性腐植土の水性溶媒抽出物とその用途

発明者: 上嶋 繁、山下里奈、勇井克也、山本光章

権利者: 学校法人近畿大学、株式会社マリネックス

種類: 特許

番号: 特許出願 2011-168358

出願年月日: 2011 年 8 月 1 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上嶋 繁 (UESHIMA Shigeru)  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号：30193791

### (2) 連携研究者

松尾 理 (MATSUO Osamu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：40030879

岡田清孝 (OKADA Kiyotaka)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：20185432

山下里奈 (YAMASHITA Rina)  
近畿大学・農学部・助手  
研究者番号：90510876