

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580193

研究課題名(和文)低酸素ストレス緩和を標的とした脂肪細胞の機能改善

研究課題名(英文)Amelioration of adipocyte function by targeting hypoxic stress

研究代表者

山崎 正夫 (Yamasaki, Masao)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪細胞の低酸素ストレス応答とその応答改善を標的とした食品成分による生活習慣病予防・改善効果について検証した。その結果、脂肪細胞は低酸素に反応してアディポネクチン産生抑制やその多量体化抑制を代表とするアディポカインの産生バランスの破綻を来すことが明らかとなった。一方で、このような低酸素ストレスはいくつかの食品成分で改善できることが明らかとなった。この研究成果は、生活習慣病予防や改善のための新たな分子標的を提案するものであり、食品機能性評価の新たな視点になることが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of hypoxia on the function of adipocytes and the ameliorative effect of food components on the hypoxic stress. Hypoxic stress elicited the disruption of homeostasis of adipokine production such as reduction of adiponectin production and its oligomerization. On the other hand, some food components were capable of ameliorating this hypoxic stress. Taken together, our results provide a novel target of life style diseases that can be a useful for the development of functional food.

研究分野：食品機能化学

キーワード：低酸素ストレス 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで食事脂肪酸の一種である共役脂肪酸の機能性に着目し、その一種である共役リノール酸が極めて強い肝がん細胞毒性効果を発揮することを示してきた。一方、生体内でのモデルを考えると培養実験においてがん細胞は平面的に増殖するが、生体内での固形腫瘍は3次的に『固まり』を作る。このため、*in vitro*での研究成果が*in vivo*では再現できないことがしばしば起こりうる。がん組織内では組織の増大に伴い血管から十分な酸素が得られない『低酸素状態』の部分が生じる。このような、『低酸素状態』は『低酸素ストレス』ともよばれ、がん細胞は低酸素センサータンパク質を起点として血管新生誘導、解糖系亢進などによりこのストレスを開閉する。申請者は特に低酸素ストレスによる血管新生誘導に着目し、共役リノール酸が低酸素センサータンパク質の安定化を阻害することで、血管新生誘導物質の産生を抑制することを世界に先駆けて見いだしてきた。また、多彩な脂肪酸の作用をスクリーニングし共役リノール酸が最も高い活性を有することが確認した。

一方、脂肪組織もその大きさを著しく変化する組織である。すなわち、脂肪組織の肥大は肥満であり、肥満が糖尿病増悪化等の肥満関連疾病につながることはよく知られている。このため、低酸素ストレスに対する応答は、脂肪組織においても起こりうるのではないかと考えた。事実、脂肪組織内には細密な血管ネットワークが存在することが知られており、『低酸素ストレス』の制御は脂肪組織の肥大化や脂肪細胞の機能調節に深く関与すると考えられる。そこで、申請者は脂肪細胞が低酸素ストレスに対してどのような応答をするか検討を進めてきた結果、脂肪細胞は低酸素ストレス下で脂質蓄積能が向上し、炎症反応と血管新生を惹起する可能性を明らかとした。脂肪組織内での炎症反応は、脂肪細胞からのサイトカイン(アディポカイン)の産生バランスを崩し、インスリン抵抗性の獲得、肝臓での脂肪酸合成の亢進などにつながることを知られている。このため、脂肪組織での低酸素ストレス緩和は『脂肪細胞の機能改善を通じて、肥満関連疾病の予防に貢献できる』ことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では脂肪細胞の低酸素ストレス応答抑制を標的とした食品成分の探索と作用機構解明を目指す。そこで、本研究においては低酸素ストレスが脂肪細胞の機能に及ぼす影響し、食品成分による低酸素ストレス緩和作用の探索を実施するとともに、肥満関連疾病予防へ向けた脂肪細胞の低酸素ストレス応答マーカータンパク質を探索する。メタボリックシンドロームを背景とする肥満関連疾病が喫緊の健康問題となっており、その人口は決して減少には転じていない。こ

の統計的な結果は、肥満そのものの改善がいかに困難であるかを物語っている。肥満によってもたらされる疾病の多くに、脂肪細胞の機能異常が関わっており、脂肪細胞の機能改善は疾病の予防に繋がると考えられる。本研究では、肥満に伴って生じる脂肪組織内の低酸素ストレスを食品成分により緩和することによって、脂肪細胞の機能を改善し肥満関連疾病の予防に貢献することを目的とする。また、肥満関連疾病の予防に向けた新規な低酸素ストレスバイオマーカー開発へつなげる事も目標として掲げる。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞における低酸素ストレスの誘導とアディポカイン産生測定

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 はヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより購入した。細胞は10%仔牛血清、パントテン酸カルシウム、D-ビオチン含有DMEM培地を用いて継代した。分化成熟時には、コンフルエントに達するまで培養した 3T3-L1 細胞を insulin、3-Isobutyl-1-methylxanthine、dexamethasone 含有継代培地で48時間処理後、insulin 含有継代培地に切り替え成熟をスタートした。成熟開始後10-12日目の細胞を解析に用いた。人為的に細胞を低酸素状態にするために、定温型自動 O₂/CO₂細胞培養装置を用いて 37℃、1%O₂、5%CO₂の培養環境で細胞を培養した。以下これを低酸素培養条件とし、20%O₂条件下を通常酸素培養条件とする。タンパク発現解析においては上清回収あるいは細胞を溶解後、SDS-PAGE および native-page に供し、ウェスタンブロット解析によりアディポネクチンの解析を行った。食品成分の添加はいずれも低酸素ストレス誘導の24時間前から行った。

(2) *In vivo*における抗生活習慣病作用の検証

*In vitro*でアディポカイン産生バランスの改善が認められた食品成分として、ブルーベリー葉が見いだされた。そこで、高脂肪高炭水化物食摂取による肥満モデル動物を用いて、ブルーベリー葉熱水抽出物(BLEx)の抗生活習慣病効果を評価した。実験食として AIN-93G を基本として通常食、30%高脂肪+20%高シヨ糖食を調製した。7週齢雄の C57BL/6 マウスを2群に分け、それぞれ通常食と高脂肪高炭水化物食を4週間給餌した。4週間後、高脂肪高炭水化物食を給餌した群をさらに3群に分け、0, 1, 3% BLEx 含有食を4週間給餌した。また、6週間飼育後に経口グルコース負荷試験(OGTT; 1.5 g/kg)を実施し、その2週間後に屠殺を行い、血清、各臓器を解析した。経口グルコース試験を行う12時間前から絶食をさせた。採血は尾採血によって行った。回収した血液から血清を調製し、血清脂質パラメーターの解析と血糖値およびインスリン値を測定した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞を分化成熟後に低酸素条件下におき、0-6 時間の間で HIF-1 α 発現量を検討したところ、HIF-1 α 発現量は時間依存的に増加しており、低酸素処理開始後の 2~3 時間後にはピークに達した。なお、培地を通常保存している際は酸素濃度が 8 mg/L 程度であったが、本研究においては低酸素条件下に移行する際に、培地のみを 24 時間低酸素条件下でプレインキュベートしており、この時、酸素濃度は 2 mg/L 程度まで低下していることを確認した。従って本条件では低酸素条件が確立できており、本条件下で脂肪細胞に対して低酸素ストレスが誘導できていることが確認できた。また、低酸素ストレスの誘導に伴って、GADD153 の発現を指標とした小胞体ストレスの誘導が認められた。

次に、低酸素条件においてアディポネクチンの発現および培養上清中への産生について検討した。培養上清中へのアディポネクチンは 24 時間の低酸素処理によって低下傾向が認められた。通常酸素および低酸素下でのそこで、アディポネクチン産生に対する共役リノール酸およびトコトリエノールの影響を SDS-PAGE 後のウエスタンブロットにより検討した。その結果、低酸素下および通常酸素下のいずれにおいても共役リノール酸はアディポネクチンの発現量を著しく亢進させることが明らかとなった。一方、明確な濃度依存性は認められず、逆に高濃度では効果が消失する傾向も認められた。アディポネクチンは血清中では 3, 6, 12 あるいはそれ以上の多量体として存在していることが知られている。そこで次に細胞内および培養上清に分泌されるアディポネクチンを native-page 後のウエスタンブロットによって解析することによって、多量体の存在状態について評価を実施した。

その結果、上図に示す通り低酸素条件において細胞内のアディポネクチンの 3 量体および 6 量体の発現量は低い傾向にあり、共役リノール酸は低酸素、通常酸素いずれにおいても発現を増強させた。低酸素条件において、

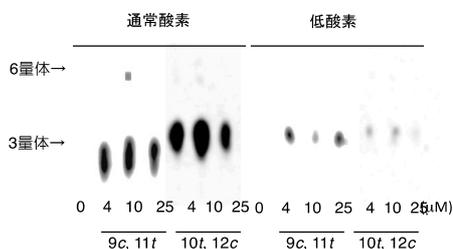


図 低酸素下における細胞内アディポネクチンの解析

培養上清中におけるアディポネクチンレベルへの影響は 9c, 11t-共役リノール酸の方が 10t, 12c-共役リノール酸よりも強く、4 μ M においてもその効果は十分に認められた。培養上清中のアディポネクチンは細胞内に比べて多量体のレベルが高く、12, 18 量体と思わ

れるバンドが認められた)。通常酸素、低酸素いずれの条件においても 9c, 11t-共役リノール酸はすべての分子量でのアディポネクチン産生を亢進する傾向にあった。一方、10t,

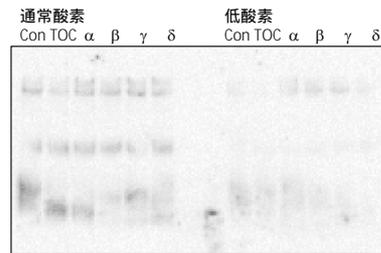


図 トコトリエノールがアディポネクチン多量体化に与える影響

Toc: α -トコフェロール
 α , β , γ , δ : トコトリエノール

12c-共役リノール酸の作用は喪アディポネクチン産生への影響の結果とは矛盾しており、現在その理由について検討中である。アディポネクチンの発現が低酸素条件で低下することはすでに報告されており、脂肪細胞に対する低酸素ストレスは炎症誘発やインスリン抵抗性につながる脂肪細胞の機能悪化をもたらす要因になっていると考えられた。共役リノール酸は低酸素条件下でアディポネクチン産生を回復させ、低酸素条件での脂肪細胞の機能悪化を抑制できることが示された。

次にこれまでガン細胞において低酸素ストレス緩和作用が報告されているトコトリエノールの有用性を検証した。ここでも図に示す通り、低酸素状態においてアディポネクチンの産生は低下し、特に多量体化アディポネクチンの産生は著しく低下していた。一方で、トコトリエノールの添加によって、低酸素状態で低下した多量体化アディポネクチン産生は回復する傾向が認められた。なお、同族体間の比較も行ったが、現在までのところ明確な活性強度の差異は認められておらず、さらに検証を進めていく予定である。

(2) アディポネクチン産生亢進を指標として、食品成分の機能性スクリーニングをしたところ、宮崎県で現在機能性素材として注目を集めているブルーベリー葉の熱水抽出物にアディポネクチン産生亢進作用が認められた。面白いことにこの効果は 6.25 μ g/mL という比較的低濃度でピークを迎え、それ以上の濃度では効果が薄いことが明らかとなった。また、アディポネクチン産生亢進作用は結果的に多量体アディポネクチン産生亢進作用をもたらしており、結果的に質・量ともに有益な効果をもたらすことが明らかとなった。さらに、ブルーベリー葉のアディポネクチン産生亢進メカニズムの解明を進めたところ、遺伝子発現やタンパク質発現に影響するのではなく、細胞内でのアディポネクチン分解を抑制することが作用機序であることが示唆された。

次に、ブルーベリー葉熱水抽出物を高脂肪高炭水化物食摂取肥満モデル動物に投与し、

生活習慣病予防効果を評価した。その結果、3%ブルーベリー葉熱水抽出物含有食摂取によって、脂肪組織重量は低下する傾向が認められ、体重の増加も抑制する傾向にあった。さらに、顕著であった脂肪肝は組織形態レベルでは改善する傾向にあり、肝臓トリグリセリドおよびコレステロールレベルは低下した。さらに本試験では、経口グルコース負荷試験によって II 型糖尿病に対する改善作用についても評価した。高脂肪高炭水化物食によって顕著な空腹時血糖の上昇とインスリン抵抗性の誘発が認められたが、3%ブルーベリー葉熱水抽出物含有食摂取によって、空腹時血糖値の有意な低下と、経口グルコース負荷後の血中グルコース濃度-時間曲線下面積の有意な減少が認められ、II 型糖尿病の改善作用が期待された。

以上の結果より、脂肪組織における低酸素ストレスの発生と、それに応答することで生じる脂肪細胞の低酸素ストレスは結果的にアディポカイン産生バランスの破綻をもたらすことにより、肥満関連疾患に増悪的に働くことが示唆された。この知見は、肥満関連疾患の予防や改善を目的とした機能性食品開発のための新たな標的の提案につながるものであり、肥満関連疾患発症のより深い理解にも貢献できることが期待される。また、本研究では脂肪細胞以外の脂肪組織構成細胞として繊維芽細胞を用い、線維化に対する影響を評価したが、低酸素ストレスの顕著な影響は認められなかった。今後、細胞間相互作用における低酸素ストレスの影響についても評価が必要と考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

M. Yamasaki, C. Motonaga, M. Yokoyama, A. Ikezaki, T. Kakihara, R. Hayasegawa, K. Yamasaki, M. Sakono, Y. Sakakibara, M. Suiko, K. Nishiyama. Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by jacaranda seed oil derived fatty acids. (査読有) *J Oleo Sci*, 62, 925-932 (2013). doi: 10.5650/jos.62.925

山崎正夫: 共役脂肪酸の機能性食品成分への応用に関する研究(総説)(査読有), *日本栄養・食糧学会誌* 66, 241-248, 2013 doi: 10.4327/jsnfs.66.241

M. Yamasaki, Y. Mine, M. Nishinura, S. Fujita, Y. Sakakibara, M. Suiko, K. Morishita, K. Nishiyama. Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. (査読有) *Cell Biol Int* 37, 742-747 (2013) doi: 10.1002/cbin.10101

H. Tsuda, H. Kunitake, R. Kawasaki-Takaki, K. Nishiyama, M. Yamasaki, H. Komatsu, C. Yukizaki. Antioxidant Activities and Anti-Cancer Cell Proliferation Properties of Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* Miq),

Shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and Blueberry Cultivars. (査読有) *Plants* 2, 57-71 (2013) doi: 10.3390/plants2010057

R. Kijima, T. Honma, J. Ito, M. Yamasaki, A. Ikezaki, C. Motonaga, K. Nishiyama, T. Tsuduki. Jacaric acid is rapidly metabolized to conjugated linoleic acid in rats. (査読有) *J Oleo Sci*. 62, 305-312 (2013) doi: 10.5650/jos.62.305

M. Yamasaki, T. Yanagita. Adipocyte response to conjugated linoleic acid (Review). (査読有) *Obesity Res Clin Prac* 7, e235-e242 (2013) doi: 10.1016/j.orcp.2013.04.002

山崎有美, 安藤美子, 山崎正夫, 立花宏文, 山田耕路: オキナワモズク由来フコイダンの細胞運動阻害作用(査読有), *日本食品科学工学会誌* 60, 357-361 (2013) doi: 10.3136/nskkk.60.357

T. Hashiguchi, Y. Sakakibara, T. Shimohira, K. Kurogi, M. Yamasaki, K. Nishiyama, R. Akashi, M.C. Liu, M. Suiko. Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana*. (査読有) *J. Biochem* 155, 91-97 (2014) doi: 10.1093/jb/mvt102.

Y. Ishida, M. Yamasaki, C. Yukizaki, K. Nishiyama, H. Tsubouchi, A. Okayama, H. Kataoka. Carnosol, rosemary ingredient, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via glutathione depletion; proteomic approach using fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis. (査読有) *Human Cell* 27, 68-77 (2014) doi: 10.1007/s13577-013-0083-6.

M. Yamasaki, S. Soda, Sakakibara, M. Suiko, and K. Nishiyama. The importance of 1,2-dithiolane structure in α -lipoic acid for the downregulation of cell surface β 1-integrin expression of human bladder cancer cells. (査読有) *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 1939-1942 (2014) doi: 10.1080/09168451.2014.943647.

M. Yamasaki, M. Nishinura, Y. Sakakibara, M. Suiko, K. Morishita, K. Nishiyama. Delta-tocotrienol induces apoptotic cell death via depletion of intracellular squalene in ED40515 cells. (査読有) *Food Funct* 5, 2842-2849 (2014) doi: 10.1039/c4fo00635f.

M. Yamasaki, M. Iwase, K. Kawano, Sakakibara, M. Suiko, M. Ikeda and K. Nishiyama. Alpha Lipoic Acid suppressed migration and invasion via downregulation of cell surface β 1-integrin expression in bladder cancer cells. (査読有) *J Clin Biochem Nutr* 54, 18-25 (2014) doi: 10.3164/jcbin.13-57.

K. Imamura, M. Asai, T. Matsumoto, Y. Yamasaki, I. Kamei, T. Hattori, M. Kishimoto, S. Niisaka, M. Kubo, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Suppressing effect

of cordycepin on the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells.(査読有) Biosci Biotechnol Biochem (in press) doi:10.1080/09168451.2015.1008977

[学会発表](計 20 件)

共役脂肪酸の抗ガン活性に関する研究：山崎正夫 第17回 生物機能研究会(東海大学：熊本県・熊本市) 2013年7月20日

Proteomic Approach to Antioxidative Effects of Food Factors Using Fluorescence Labeled Difference Gel Electrophoresis. Yoichi Sakakibara, Takako Iwata, Katsuhisa Kurogi, Masao Yamasaki, Kazuo Nishiyama, Masahito Suiko The 12th Human Proteome Organization World Congress (HUPO2013) (Pacífico Yokohama, 神奈川県・横浜市) 2013.9.16
Anti-cancerous effect of conjugated fatty acids : Masao Yamasaki 13 mo Convegno Italo-Giapponese sulla Scienza e Tecnologia Di Miyazaki 2013 (宮崎大学：宮崎県・宮崎市) 2013.10.11

ブルーベリー葉抽出物によるアディポネクチン産生・分泌への影響：松山勇介、甲斐孝憲、亀長浩蔵、竹下正彦、菊池幸治、松浦靖、柚木崎千鶴子、西山和夫、山崎正夫 第34回日本肥満学会(東京国際フォーラム；東京都・千代田区) 2013年10月11日

ブルーベリー葉熱水抽出物の抗酸化活性と消化管吸収作用：今村公紀、松浦靖、窄野昌信、國武久登、山崎正夫、柚木崎千鶴子、下位香代子、榊原啓之 平成25年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(九州大学：福岡県・福岡市) 2013年10月19日

脂肪組織を標的にした γ -リノレン酸の抗炎症作用：中村崇弘、山崎正夫、西山和夫 平成25年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(九州大学：福岡県・福岡市) 2013年10月19日

脂肪細胞の低酸素ストレス応答に対するCLAの影響：柿原知加、古賀絢子、野口佐紀、西山和夫、山崎正夫 第4回機能油脂懇話会、第15回CLA懇話会(明治大学：東京都・千代田区) 2013年11月2日

ナノエマルション化共役リノール酸がマクロファージのNitric oxide産生に及ぼす影響：金崎寿敏、木下和昭、山本建次、濱山真吾、清水正高、西山和夫、山崎正夫 第4回機能油脂懇話会、第15回CLA懇話会(明治大学：東京都・千代田区) 2013年11月2日

脂質ナノエマルションの抗がん作用に関する研究：木下和昭、金崎寿敏、茨木佳代、板倉祥子、山本建次、清水正高、窄野昌信、山崎正夫、西山和夫 第68回日本栄養・食糧学会大会(酪農学園大学：北海道・江別市) 2014年5月31日

脂肪組織の線維化抑制を標的とした肥満関連疾患予防：早瀬川倫太郎、西山和夫、山崎正夫 2014年度生物機能研究会(九州地区国立大学九重共同研修所：大分県・玖珠郡九重町) 2014年7月12日

ブルーベリー葉抽出物(BLEx)のアルコール性肝障害抑制作用：山崎楓、河村由樹、西山和夫、甲斐孝憲、亀長浩蔵、竹下正彦、菊池幸治、松浦靖、柚木崎千鶴子、山崎正夫 2014年度生物機能研究会(九州地区国立大学九重共同研修所：大分県・玖珠郡九重町) 2014年7月12日

Cordycepinによる抗炎症作用のメカニズム解明：今村健太、浅井桃子、菅本和寛、松本朋子、山崎有美、亀井一郎、服部貴博、岸本正興、新坂誠司、西山和夫、山崎正夫 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会(シーガイア：宮崎県・宮崎市) 2014年8月22日

脂質ナノエマルションの抗がん作用に関する研究：木下和昭、山本建次、濱山真吾、清水正高、西山和夫、山崎正夫 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会(シーガイア：宮崎県・宮崎市) 2014年8月22日

脂肪細胞の低酸素ストレスを標的とした機能性食品成分探索：柿原知加、古賀絢子、西山和夫、山崎正夫 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会(シーガイア：宮崎県・宮崎市) 2014年8月22日

δ -トコトリエノールによる成人T細胞性白血病致死効果：山崎正夫、西村海里、榊原陽一、水光正仁、森下和広、西山和夫 19th JSOFF(鹿児島大学：鹿児島県・鹿児島市) 2014年11月9日

ブルーベリー葉抽出物によるアディポネクチン産生調節機構：松山勇介、甲斐孝憲、亀長浩蔵、松浦靖、柚木崎千鶴子、奥澤亜美、坂下真実、森田直樹、西山和夫、山崎正夫 日本食品科学工学会西日本支部大会(九州大学：福岡県・福岡市) 2014年12月6日

炎症性腸疾患の病態改善を目標とした共役リノール酸ナノエマルションの応用：○金崎寿敏、木下和昭、山本建次、濱山真吾、清水正高、西山和夫、山崎正夫 日本食品科学工学会西日本支部大会(九州大学：福岡県・福岡市) 2014年12月6日

ブルーベリー葉抽出物(BLEx)のアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害抑制作用：山崎楓、河村由樹、長友宏賢、菅本和寛、甲斐孝憲、亀長浩蔵、竹下正彦、菊池幸治、松浦靖、柚木崎千鶴子、江藤敏治、西山和夫、山崎正夫 日本農芸化学会2015年度(平成27年度)大会(岡山大学：岡山県・岡山市) 2015年3月27日

共役リノール酸ナノエマルションによる炎症性腸疾患の病態改善作用：金崎寿敏、木下和昭、山本建次、濱山真吾、清水正高、西山和夫、山崎正夫 日本農芸化学会2015

年度（平成27年度）大会（岡山大学：岡山
県・岡山市）2015年3月27日

ブルーベリー葉抽出物によるインスリン
抵抗性改善作用：松山勇介、早瀬川倫太郎、
濱田健作、甲斐孝憲、亀長浩蔵、松浦靖、
柚木崎千鶴子、西山和夫、山崎正夫 日本農
芸化学会2015年度（平成27年度）大会（岡
山大学：岡山県・岡山市）2015年3月28日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/nishiyama_yama
saki/](http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/nishiyama_yama
saki/)

6．研究組織

(1)研究代表者

山崎 正夫（YAMASAKI Masao）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060