

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591338

研究課題名(和文) 高脂肪食に対する嗜好性に関わる視床下部・脳内メカニズムの解明と医学応用

研究課題名(英文) Exploration of novel hypothalamic mechanism on fatty food preference and its application to clinical science on obesity-diabetes syndrome

研究代表者

益崎 裕章 (MASUZAKI, Hiroaki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00291899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的な高脂肪餌の摂取が食欲中枢の視床下部において小胞体ストレスを亢進させることにより、高脂肪餌への嗜好性をさらに高める悪循環の分子機構をマウス病態モデルで明らかにした。玄米含有餌を与えたマウスの解析から、玄米に特異的かつ高濃度に含有される生理活性物質、オリザノールが経口摂取後、脳に移行し、小胞体ストレスを軽減する分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。オリザノールは高脂肪食によって糖尿病を来したマウスの膵島(インスリン分泌細胞)における小胞体ストレスの亢進を緩和し、細胞の保護と機能回復に貢献することも明らかとなり、天然食品由来成分を活用する新たな医学応用の基盤が確立出来た。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated for the first time in mouse experiments that excess intake of fatty foods augments ER stress in hypothalamus, which in turn increases the preference for dietary fats, thereby making a self-adjusting circuit. Gamma-oryzanol is a unique bioactive substance exclusively and abundantly found in brown rice. We found that γ -oryzanol decreases ER stress in hypothalamus and attenuates the preference for dietary fat, thereby ameliorating high fat diet (HFD)-induced fuel dyshomeostasis. We also tested whether γ -oryzanol reduces ER stress and improves function and survival of pancreatic β -cells under high fat diet in mice. In pancreatic islets from HFD-fed diabetic mice, oral administration of γ -oryzanol improved glucose stimulated insulin secretion (GSIS) on following reduction of exaggerated ER stress and apoptosis. A line of novel findings may open a fresh avenue for natural food-based approach toward the prevention of obesity-diabetes syndrome.

研究分野：代謝学

キーワード：高脂肪食 視床下部 小胞体ストレス 食行動 嗜好性 分子シャペロン γ -オリザノール 肥満症

1. 研究開始当初の背景

肥満症の発症・進展には過栄養、身体運動量の低下、生体リズム障害、過剰ストレスなどが複合的に関与している。肥満は種々の健康障害の背景因子として大きなインパクトを与えることからその制御は臨床医学全体にとって極めて重要な課題であるが過剰な食欲や過体重に対する医療アプローチは未だ不十分である。研究代表者は脂肪細胞由来ホルモンのプロトタイプ、レプチンが担う視床下部シグナル伝達がマウスの摂食調節やエネルギー代謝の恒常性維持において中核的役割を果たし、高脂肪食がレプチン作用を可逆的、強力に阻害することを明らかにした (Diabetes 48: 1822, 1999, Diabetes 48: 1615, Diabetes 54: 2365, 2005, Cell Metabolism 5:395, 2007)。高脂肪食がレプチン抵抗性を引き起こす理由のひとつとして注目されているのが視床下部小胞体ストレスの亢進である (Ozcan L et al. Cell Metabolism 9:35-51, 2009)。ツニカマイシンのマウス脳室内投与により視床下部小胞体ストレスが上昇するとマウスの摂食量が増加すること、レプチンの外来性投与に反応しない高脂肪食肥満マウスに小胞体ストレスを軽減する低分子シャペロン、4フェニル酪酸 (4-PBA) を共投与すると摂食量が低下し、レプチン受容体シグナルが再活性化されることが報告された。しかし、高脂肪食がなぜ、視床下部の小胞体ストレスを亢進させるのか、その分子機構には未解明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景を踏まえ、本研究では (1) 高脂肪食による視床下部小胞体ストレス亢進の分子メカニズムを明らかにする、(2) 視床下部小胞体ストレス軽減による食の嗜好性変化 (行動変容) を解析する、(3) 視床下部小胞体ストレスを軽減させる天然食品を探索し、医学応用を目指す、という3つの課題を設定した。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食によって誘導される視床下部小胞体ストレスが高脂肪食嗜好性に関わる可能性の検証

高脂肪餌に対する嗜好性を評価するため、マウスに通常餌と高脂肪餌を同時に与え、餌の嗜好性をモニターした。また、生体で分子シャペロン (小胞体ストレス緩和剤) として機能する4フェニル酪酸 (4-PBA) を投与したマウス群において同様のモニタリングを実施した。このときのマウス視床下部の小胞体ストレスの程度を CHOP や ERDJ4 などの遺伝子発現レベルで評価した。

(2) 玄米に特異的かつ高濃度に含有される生理活性物質、 α -オリザノールの分子シャペロンとしての機能解析

HEK293 細胞レポーター・ジーンアッセイ系を用いて α -オリザノールがツニカマイシンに

よって誘導される小胞体ストレス応答性領域の転写活性を抑制する可能性を検証した。また、胎児マウス大脳皮質由来神経細胞初代培養系を用いて α -オリザノールがツニカマイシンによって誘導される小胞体ストレス関連分子の遺伝子発現を抑制する可能性を検証した。

(3) 経口摂取された α -オリザノールが脳に移行し、視床下部小胞体ストレスを軽減し、高脂肪食嗜好性を緩和する可能性の検証

α -オリザノールをガバージュにてマウス胃内に投与し、1時間後に解剖して脳を含む体内の主要臓器における α -オリザノールの体内分布を HPLC 法にて解析した。また、高脂肪食肥満マウスに α -オリザノールを給餌し、高脂肪餌に対する嗜好性をモニターし、STAT3 リン酸化を指標とする視床下部のレプチン信号伝達や CHOP や ERDJ4 などの小胞体ストレス関連遺伝子群の発現レベルを評価した。

(4) α -オリザノールが慢性的な高脂肪食摂取に伴う膵島機能不全と関連する小胞体ストレスを軽減し、細胞保護や機能回復に貢献する可能性の検証

マウス単離膵島や細胞株の MIN6 細胞培養系を用いて、 α -オリザノールがインスリン産生細胞 (膵島) に直接的に作用し、小胞体ストレスを軽減する可能性を検証した。また、膵島機能不全を来した高脂肪食肥満・糖尿病マウスに対して α -オリザノールを摂取させ、慢性的な高脂肪食摂取で観察される細胞のアポトーシスやグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) 能の低下を経口摂取した α -オリザノールが改善する可能性を検証した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食によって誘導される視床下部小胞体ストレスが高脂肪食嗜好性に関わる可能性の検証

高脂肪餌に対する嗜好性を評価するため、マウスに通常餌と高脂肪餌を同時に与え、餌の嗜好性をモニターした。C57/B6 マウスはヒトと同様、高脂肪食に対する嗜好性が極めて強く、通常餌と高脂肪餌を同時に給餌して選択させると約 95% の割合で高脂肪食を嗜好し、肥満を来した。一方、生体で分子シャペロン (小胞体ストレス緩和剤) として機能する4フェニル酪酸 (4-PBA) を投与したマウス群において同様のモニタリングを実施したところ、高脂肪餌を選択する割合が約 20% 軽減され、小胞体ストレスの程度を反映する CHOP や ERDJ4 などの小胞体ストレス関連遺伝子群の発現レベルは通常餌を摂

取しているマウスのレベルと同等まで低下していた。以上の結果から、高脂肪食を摂取することで上昇する視床下部の小胞体ストレスは高脂肪食嗜好性を強化する悪循環を形成していることが示唆された。

(2) 玄米に特異的かつ高濃度に含有される生理活性物質、 γ -オリザノールの分子シャペロンとしての機能解析

HEK293細胞レポーター・ジーンアッセイ系を用いて γ -オリザノールがツニカマイシンによって誘導される小胞体ストレス応答性領域の転写活性を抑制する可能性を検証した結果、 γ -オリザノールが生細胞において分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。胎児マウス大脳皮質由来神経細胞初代培養系においては、 γ -オリザノールがツニカマイシンによって誘導される小胞体ストレス関連分子の遺伝子発現を有意に抑制することが示され、 γ -オリザノールが神経系細胞における小胞体ストレスを軽減する効果が示唆された。

マウスに与える通常餌、高脂肪餌の炭水化物の一部を等カロリーの玄米粉末あるいは白米粉末で置換した餌を作成してマウスに与えたところ、炭水化物の一部を玄米粉末で置換した餌を同時に給餌されたマウスのグループにおいてのみ、高脂肪餌に対する嗜好性が顕著に軽減され、結果的に高脂肪食肥満や糖・脂質代謝異常が顕著に改善することが明らかとなった。このとき、炭水化物の一部を玄米粉末で置換した餌を同時に給餌されたマウスの視床下部では小胞体ストレスの程度を反映するCHOPやERDJ4などの小胞体ストレス関連遺伝子群の発現レベルが通常餌を摂取しているマウスのレベルと同等まで低下していた。

視床下部における小胞体ストレス関連遺伝子群の発現レベルの低下は高脂肪餌マウスに γ -オリザノールを与えた場合も同様の結果が得られたことから、経口摂取された γ -オリザノールが生体において分子シャペロンとして機能し、高脂肪食摂取により上昇する視床下部の小胞体ストレスを緩和して高脂肪食嗜好性を減弱させる効果を有することが示唆された。

(3) 経口摂取された γ -オリザノールが脳に移行し、視床下部小胞体ストレスを軽減し、高脂肪食嗜好性を緩和する可能性の検証

γ -オリザノールをガバージュにてマウス胃内に投与し、1時間後に解剖して脳を含む体内の主要臓器における γ -オリザノールの体内分布をHPLC法にて解析した結果、 γ -オリザノールは最も高濃度で脳に分布し、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織、膵臓の順に、一定濃度の分布が観察された。高脂肪食肥満マウスに γ -オリザノールを給餌し、STAT3リン酸

化を指標とする視床下部のレプチン信号伝達について特異的リン酸化抗体を用いたウェスタン・ブロットで評価した結果、10%程度に減弱していたシグナルは対照マウス(通常餌給餌群)の50%程度に改善していた。CHOPやERDJ4などの小胞体ストレス関連遺伝子群の発現レベルも有意に低下していることが明らかとなった。

(4) γ -オリザノールが慢性的な高脂肪食摂取に伴う膵島機能不全と関連する小胞体ストレスを軽減し、細胞保護や機能回復に貢献する可能性の検証

マウス単離膵島、および、細胞株のMIN6細胞培養系を用いて、 γ -オリザノールがインスリン産生細胞(膵島)に直接的に作用し、小胞体ストレスを軽減する可能性を検証した結果、ツニカマイシンやパルミチン酸によって誘導された小胞体ストレスを γ -オリザノールが有意に低下させることが明らかとなった。また、MIN6細胞のアポトーシスを有意に抑制することが示された。

膵島機能不全を来した高脂肪食肥満・糖尿病マウスに対して γ -オリザノールを摂取させ、慢性的な高脂肪食摂取で観察される膵島細胞のアポトーシスやグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)能の低下を経口摂取した γ -オリザノールが改善する可能性を組織切片を用いた免疫組織化学、蛍光抗体法で検証した結果、小胞体ストレスのマーカー、アポトーシスのマーカーの明らかな低下が認められ、インスリン染色輝度の上昇とグルカゴン染色輝度の低下が確認された。

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12件)

C.Kozuka, S.Sunagawa, R.Ueda, S. M.Higa, H.Tanaka, C. Shimizu-Okabe, S. Ishiuchi, C.Takayama, M.Matsushita, M.Tsutsui, J.Miyazaki, S.Oyadomari, M.Shimabukuro, H. Masuzaki
Gamma-oryzanol protects pancreatic β -cells against endoplasmic reticulum stress in male mice
Endocrinology 156:1242-1250, 2015
査読有

M. Shimabukuro, M. Higa, R. Shiroma-Kinjo, K. Yamakawa, H. Tanaka, C.Kozuka, K. Yabiku, S. Taira, M. Sata, H. Masuzaki
Effects of Brown Rice Diet on Visceral Obesity and Endothelial Function: The BRAVO Study
British J Nutr 111:310-320, 2014

査読有

M. Ishida, M. Shimabukuro, S. Yagi, S. Nishimoto, C. Kozuka, D. Fukuda, T. Soeki, H. Masuzaki, M. Tsutsui, M. Sata

MicroRNA-378 regulates adiponectin expression in adipose tissue: A new plausible mechanism

PROS ONE 9:e111537, 2014

査読有

S. Taira, M. Shimabukuro, M. Higa, K. Yabiku, C. Kozuka, R. Ueda, S. Sunagawa, Y. Ohshiro, M. Doi, E. Kawamoto, Y. Nakayama, H. Nakamura,

T. Iha, S. Nakachi, T. Tomoyose, T. Ikema, K. Yamakawa, H. Masuzaki
Lipid Deposition in Various Sites of Skeletal Muscle and Liver Exhibits a Positive Correlation with Visceral Fat Accumulation in Middle-Aged Japanese Men with Metabolic Syndrome

Intern Med 52:1561-1571, 2013

査読有

M. Shimabukuro, M. Higa, K. Yamakawa, H. Masuzaki, M. Sata.

Migliitol, α -glycosidase Inhibitor, Reduces Visceral Fat Accumulation and Cardiovascular Risk Factors in Subjects with the Metabolic Syndrome: A randomized comparable study

Int J Cardiol 167:2108-2113, 2013

査読有

C. Kozuka, K. Yabiku, C. Takayama, M. Matsushita, M. Shimabukuro, H. Masuzaki

Natural Food based Novel Approach toward Prevention and Treatment of Obesity and Type 2 Diabetes: Recent Studies on Brown Rice and γ -Oryzanol

Obes Res Clin Pract 7:e165-e172, 2013

査読有

M. Shimabukuro, C. Kozuka, S. Taira, K. Yabiku, N. Dagvasumberel, M. Ishida, S. Matsumoto, S. Yagi, D. Fukuda, K. Yamakawa, M. Higa, T. Soeki, H. Yoshida, H. Masuzaki, M. Sata.

Ectopic Fat Deposition and Global Cardiometabolic Risk: New Paradigm in Cardiovascular Medicine

J Med Invest 60:1-14, 2013

査読有

M. Ham, J-W. Lee, A H Choi, H. Jang, G. Choi, J. Park, C. Kozuka, D. D. Sears, H. Masuzaki, J. B. Kim.

Macrophage Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Stimulates Proinflammatory Responses with Oxidative Stress

Mol Cell Biol (MCB) 33:2425-2435, 2013 査読有

C. Kozuka, K. Yabiku, S. Sunagawa, R. Ueda, S. Taira, H. Ohshiro, T. Ikema, K. Yamakawa, M. Higa, H. Tanaka, C. Takayama, M. Matsushita, S. Oyadomari, M. Shimabukuro, H. Masuzaki

Brown rice and its components, γ -oryzanol, attenuate the preference for high fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice

Diabetes 61:3084-3093, 2012

査読有

M. Shimabukuro, H. Masuzaki, M. Sata
Intensive Glucose Lowering in Cardiovascular Risk Reduction: Unsolved Questions

Circ J 76:593-595, 2012

査読有

A. Shiota, M. Shimabukuro, D. Fukuda, T. Soeki, H. Sato, E. Umetsu, Y. Hirata, H. Kurobe, H. Sakaue, Y. Nakaya, H. Masuzaki, M. Sata.

Activation of AMPK-Sirt1 Pathway by Telmisartan in White Adipose Tissue: A Possible Link to Anti-metabolic Effects

Eur J Pharmacol 692:84-90, 2012

査読有

Shiota, M. Shimabukuro, D. Fukuda, T. Soeki, H. Sato, E. Uematsu, Y. Hirata, H. Kurobe, N. Maeda, H. Sakaue, H. Masuzaki, I. Shimomura, M. Sata.

Telmisartan Ameliorates Insulin Sensitivity by Acting the AMPK/SIRT1 Pathway in Skeletal Muscle of Obese db/db Mice

Cardiovasc Diabetol 11:139, 2012

査読有

〔学会発表〕(計 21件)

第128回 西日本 整形・災害 外科学会 学術集会

特別講演：メタボリックシンドローム：病態解明の進歩・運動器との関わり

平成26年11月23日(沖縄コンベンションセンター 沖縄県 宜野湾市)

発表者：益崎 裕章

第35回 日本肥満学会 シンポジウム1：肥満症診療の現状と未来

講演：エビゲノム制御を肥満症に活かす

アプローチ

平成 26 年 10 月 24 日 (フェニックス シーガイア・リゾート コンベンションセンター 宮崎県 宮崎市)
発表者: 益崎 裕章

BIO JAPAN 2014: World Business Forum

玄米由来 有効成分を活用した メタボ・糖尿病 予防の分子栄養学的アプローチ
平成 26 年 10 月 15 日 (パシフィコ横浜 横浜市 西区)
発表者: 益崎 裕章

第 101 回 日本消化器病学会 四国支部 例会
特別講演: 内分泌・代謝・生活習慣 から見た 消化器の役割と病態的意義
平成 26 年 6 月 14 日 (松山市 総合コミュニケーションセンター 愛媛県 松山市)
発表者: 益崎 裕章

第 14 回 日本 抗加齢医学会 総会
シンポジウム: アンチエイジング に必要な 糖・脂質管理 とは 加齢とメタボリックシンドローム
平成 26 年 6 月 7 日
(大阪国際会議場 大阪市)
発表者: 益崎 裕章

第 57 回 日本糖尿病学会 年次学術集会
教育講演: メタボリック・シンドローム
平成 26 年 5 月 24 日
(大阪国際会議場 大阪市)
発表者: 益崎 裕章

第 57 回 日本糖尿病学会 年次学術集会
シンポジウム: インスリン抵抗性の新展開: アディポサイトカイン から 慢性炎症まで高脂肪食と視床下部 炎症による 食嗜好性変化
平成 26 年 5 月 22 日
(大阪国際会議場 大阪市)
発表者: 益崎 裕章

第 36 回 日本造血細胞移植学会 総会
教育講演 7: メタボリックシンドロームの現在: 造血幹細胞 移植医療に対する内分泌・代謝学 からのメッセージ
平成 26 年 3 月 8 日 (沖縄コンベンションセンター 沖縄県 宜野湾市)
発表者: 益崎 裕章

第 48 回 糖尿病学の進歩 (日本 糖尿病学会) 教育講演 (糖尿病診療に必要な知識)
メタボリックシンドロームと糖尿病: up to date

平成 26 年 3 月 7 日 (札幌コンベンションセンター 札幌市)
発表者: 益崎 裕章

第 40 回 九州代謝・栄養研究会
特別講演分子栄養学をメタボ予防に活かす試み: 沖縄クライシス からのヒント
平成 26 年 3 月 7 日 (土) (沖縄県 市町村自治会館 沖縄県 那覇市)
発表者: 益崎 裕章

第 49 回 糖尿病学の進歩
専門医 単位更新のための 指定講演 (AL-1-4) 2 型糖尿病とメタボリックシンドローム: 病態解明と治療の展望
平成 26 年 2 月 20 日 (金) (ホテルグランヴィア岡山: 岡山市)
発表者: 益崎 裕章

第 23 回 臨床 内分泌代謝 Update in Nagoya (日本 内分泌学会)
Meet the Expert 1 (肥満症: 病態解明と診療をめぐる最近の動向)
平成 26 年 1 月 25 日
(名古屋 国際会議場 名古屋市 熱田区)
発表者: 益崎 裕章

第 34 回 日本肥満学会
シンポジウム: 栄養素とエネルギー代謝 玄米有効成分による食事嗜好性の調節機構と医療応用
平成 25 年 10 月 11 日
(東京国際フォーラム 東京都 千代田区)
発表者: 益崎 裕章

第 67 回 日本栄養・食糧学会 大会
シンポジウム (ネスレ 栄養科学会議) 天然食品を活用した新しいメタボリックシンドローム予防のアプローチ
平成 25 年 5 月 25 日 (名古屋大学 東山キャンパス豊田講堂 愛知県 名古屋市)
発表者: 益崎 裕章

第 56 回 日本糖尿病学会 年次学術集会
Diabetes Controversy 6 境界型に対する糖尿病薬の使用
平成 25 年 5 月 17 日
(ホテル日航 熊本 熊本県 熊本市)
発表者: 益崎 裕章

第 86 回 日本内分泌学会 学術総会
シンポジウム 19: 栄養と内分泌・代謝 天然食品を活用した新規 糖代謝メカニズムの解明と臨床応用
平成 25 年 4 月 27 日
(仙台国際センター 宮城県 仙台市)

発表者：益崎 裕章

第 23 回 日本老年医学会 九州地方会
特別講演：超高齢化時代を見据えた メタボリック シンドローム予防と治療戦略
平成 25 年 3 月 9 日
(九州大学百年講堂 福岡市)
発表者：益崎 裕章

第 62 回 日本体質医学会 総会
シンポジウム：Common Disease の体質と環境 メタボ先進県、沖縄から食と生活習慣を考える
平成 24 年 11 月 4 日 (大阪国際会議場 大阪市)
発表者：益崎 裕章

第 33 回 日本肥満学会
教育講演 13
肥満症と脂質代謝異常
平成 24 年 10 月 12 日 (ホテルグランヴィア京都 京都府 京都市)
発表者：益崎 裕章

第 112 回 日本循環器病学会九州地方会
教育セッション講演：
メタボリックシンドローム診療をめぐる最近のトピックス
平成 24 年 6 月 30 日 (沖縄コンベンションセンター 沖縄県 宜野湾市)
発表者：益崎 裕章

- ② 第 12 回 日本抗加齢医学会 総会
シンポジウム 1：医食同源：食のセンシングとメタボエイジング
日本屈指のメタボ県、沖縄から健康長寿復興を目指す食と新しい医療を考える
平成 24 年 6 月 22 日 (パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市)
発表者：益崎 裕章

〔図書〕(計 1 件)
健康長寿 に貢献する玄米有効成分 ~
分子栄養学の最新知見 ~
医師たちが認めた『玄米』のエビデンス
(キラジェンヌ)
(著書：分担執筆) 177-194, 2015
発表者：益崎 裕章

〔産業財産権〕
出願状況 (計 4 件)

組成物及び飲食物 (国際特許)
発明者代表：益崎 裕章
権利者：同上
国際出願番号：PCT/JP 2013/08410

基礎出願番号：特願 2012-280303
特許公開：2014 年 6 月 26 日
公開番号：13F088-PCT

高脂肪食への嗜好性を軽減させるための医薬組成物、飲食品組成物または飲食品添加物
発明者代表：益崎 裕章
権利者：同上
出願番号：特願 2012-005883,
出願日：2012 年 1 月 16 日、琉球大学
特許公開：2013 年 7 月 25 日
公開番号：2013-144656

-オリザノール含有機能性食品と糖尿病改善医薬
発明者代表：益崎 裕章
権利者：同上
出願番号：特願 2013-9341,
出願日：2013 年 1 月 22 日、琉球大学

組成物及び飲食物
発明者代表：益崎 裕章
権利者：同上
出願番号：特願 2012-280303
出願日：2012 年 12 月 21 日、琉球大学、
沖縄県、九州大学 他

〔その他〕

琉球大学 医学部 第二内科研究室
公 式 ホ ー ム ペ ー ジ：
<http://www.ryudai2nai.com/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
益崎 裕章 (MASUZAKI, Hiroaki)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00291899

(2) 研究分担者
高山 千利 (TAKAYAMA, Chitoshi)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60197217

島袋 充生 (SHIMABUKURO, Michio)
徳島大学大学院 医歯薬学研究部 心臓
血管病態医学分野・特任教授
研究者番号：60271144

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
松下 正之 (MATUSHITA, Masayuki)
小塚 智沙代 (KOZUKA, Chisayo)