

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24614020

研究課題名(和文) 肥満予防を目的とした肝転写因子の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of hepatic transcription factor as a target for obesity control

研究代表者

深澤 昌史 (FUKASAWA, Masashi)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20238439

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、培養細胞において肝転写因子ChREBP活性化抑制効果が示唆された乳酸菌代謝生産物質PS-B1を摂取させることで、高スクロース食を与えた肥満モデルマウスの肥満抑制効果がみられるかを検討した。その結果、通常飼料群に比べて高スクロース飼料群では体重、腸管脂肪、精巣上体脂肪及び肝重量の増加、FASN、ACC、L-PK等の糖・脂質代謝関連酵素の発現増強がみられたが、PS-B1摂取群ではPS-B1含有量に比例してこれら全てが抑制傾向にあった。これらの成果により、PS-B1は主にChREBPの活性を阻害することで脂質合成を抑制し、かつマウスにおいて肥満解消効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PS-B1 is fermented products using lactic acid bacteria, which showed inhibitory effect on hepatic transcription factor ChREBP-mediated gene expression in vitro. The present study evaluated the effect of PS-B1 on high sucrose diet-induced obesity in mice. The weight gain of overall body, liver, and visceral fat was reduced in the PS-B1 treated mice in a dose-dependent way. Besides, mRNA expression of hepatic glycolytic and lipogenic enzymes including L-PK, ACC, FAS etc. was significantly lower especially in 5% PS-B1-treated mice. The results of this study suggest that PS-B1 inactivates ChREBP-mediated gene expression, resulting in reduced fat synthesis and obesity in vivo.

研究分野：生化学

キーワード：脂質合成 乳酸菌生産物質 転写因子 肥満予防

1. 研究開始当初の背景

現代の恵まれた食生活環境下では、過剰に摂取された炭水化物が脂肪酸・中性脂肪として体内に蓄積され、肥満症、高血圧、高脂血症、糖尿病に代表される生活習慣病の原因となる。これらは個々の原因で発症するというよりも、肥満による内臓脂肪の蓄積が共通の原因であると考えられ、わが国の国民の健康を考える上で、肥満解消に関する研究の必要性が急速に増大しているのが現状である。

ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) は、肝臓における脂肪酸合成の約 60% を制御する重要な転写因子として同定された。ChREBP による転写を抑制することは生活習慣病予防に対する大きな可能性として期待されており、ChREBP の核内移行、あるいは転写能を安全に調節する物質・手段を見出すことは肥満予防の観点から重要である。

2. 研究の目的

本研究では、それまでの研究成果から、肝細胞由来細胞株を用いたレポーターアッセイにより ChREBP の転写活性を抑制する可能性が見出された、豆乳の乳酸菌代謝生産物質 PS-B1 による肥満抑制効果について、肥満モデルマウスを用いて検討を行った。尚、国民健康・栄養調査の結果から、我が国の肥満増加の原因は脂質や炭水化物の摂取量の増加ではなく、炭水化物の質の変化であることが推測されたため、高スクロース含有試料による肥満モデルマウス構築を採用することとした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

Lactobacillus 属を主とする乳酸菌の混合培養から調製した豆乳の発酵生産物質 PS-B1 を凍結乾燥したものを粉末飼料に混合し、PS-B1 含有飼料 (3%, 5%) を作製した。

(2) マウスの飼育

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (5 匹/群) に、高スクロース含有飼料を 60 日間与えた後、各群の平均体重が均等になるように 3 群に分けた。そのうち、さらに 4 週間高スクロース含有試料を与えたものを高スクロース対照群 (II 群)、高スクロース+3% または 5% PS-B1 含有飼料を 4 週間摂取させたものを治療群 (それぞれ III 群または IV 群) とした。また、飼育期間を通して通常飼料のみを与えた群を通常飼料群 (I 群) とした。飼育中は 2 回/週に体重と飼料残存量を計測した。飼育終了時に血清生化学マーカー測定用の採血、及び生化学的肝重量、腸管脂肪量、精巢上体脂肪量の計測を行った。摘出した肝臓は液体窒素にて凍結・保存した。尚、全ての動物実験は文部科学省・動物実験指針、及び

長崎国際大学薬学部・実験動物施設ガイドラインに従った。

(3) RNA の抽出と定量的 PCR

摘出したマウス肝臓の内側右葉断片から、TRIZOL® 試薬を用いて Total RNA を抽出し、ReverTra Ace® qRT-PCR Kit によって cDNA を合成した。遺伝子発現の定量は、THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix 及び各遺伝子特異的プライマーを用いた Real-time PCR により、 β -actin の発現量を対照値として $\Delta\Delta Ct$ 法により比較し、通常飼料群での発現量を 1 としたときの相対量で表した。

4. 研究成果

(1) 体重増加に対する PS-B1 の効果

通常飼料群に対し、60 日間高グルコース飼料を与えた群では、10% 以上の体重増加がみられた。再編成後 4 週間の飼育では、5% PS-B1 含有試料を摂取させた IV 群において、対照群 (II 群) に比べて有意な体重増加の抑制が認められた (図 1)。尚、飼料の摂取量においては両者の間に有意差はなかった。

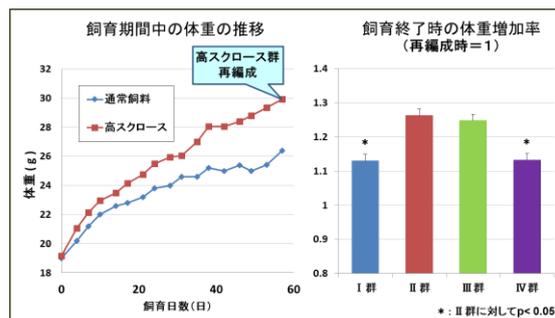


図 1 体重の推移と体重増加率の比較

(2) 肝重量増加に対する PS-B1 の効果

飼育終了時の肝臓を摘出したところ、対照群 (II 群) では明らかに肝臓が肥大し、脂肪肝の様相を示した。しかし、治療群では肝臓の肥大は抑制されており、IV 群 (5% PS-B1) では有意な肝重量増大の抑制がみられ、外観も I 群 (通常飼料) とほぼ同様であった (図 2)。

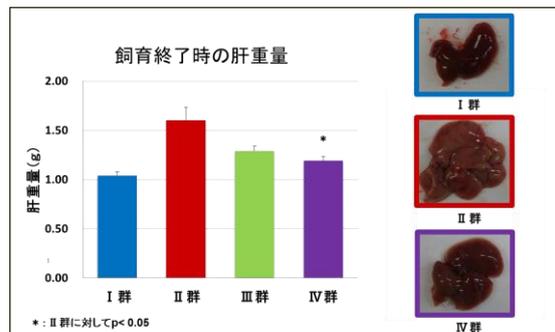


図 2 肝重量の測定結果

(3) 内臓脂肪蓄積に対する PS-B1 の効果

内臓脂肪に関しては、腸管と精巢上体の 2

個所から脂肪を採取して計測した。やはり治療群では内臓脂肪の蓄積は抑制され、IV群(5%PS-B1)では有意であった(図3)。

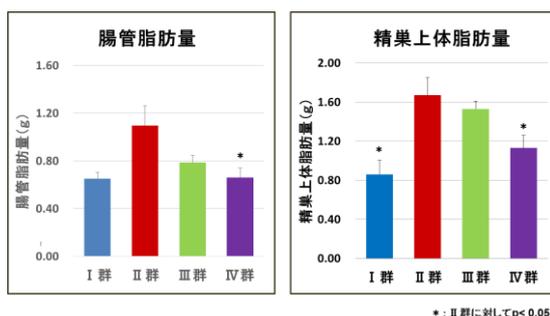


図3 内臓脂肪量の測定結果

(4) 血清生化学マーカーに対するPS-B1の効果

採取した血清を用いて、中性脂肪(TG)、総コレステロール、グルコース、インスリンの濃度測定を行った。グルコースとTGの濃度に全群で有意差はなかったが、総コレステロールとインスリンはI群(通常飼料)に対してII群(対照)で有意に増加しており、IV群(5%PS-B1)ではII群に対して有意な低下がみられた(図4)。

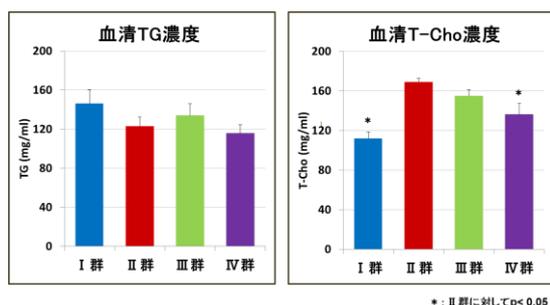


図4 血中TGと総コレステロールの測定結果

(5) 脂質合成関連遺伝子の発現に対するPS-B1の効果

肝臓より調製したRNAを用い、解糖系、脂質合成系、各種肝転写因子、インスリンシグナル関連の遺伝子を選定して定量的RT-PCRを行った。特に脂質合成系の遺伝子であるACCやFASNの発現はII群(対照群)で更新していたが、III群(3%PS-B1)またはIV群(5%PS-B1)で有意な抑制がみられた(図5)。また、肝型ピルビン酸キナーゼ(LPK)においても治療群では抑制がみられたことから、少なくともこれらに共通な転写因子ChREBPの転写活性が抑制されていることが示唆された。

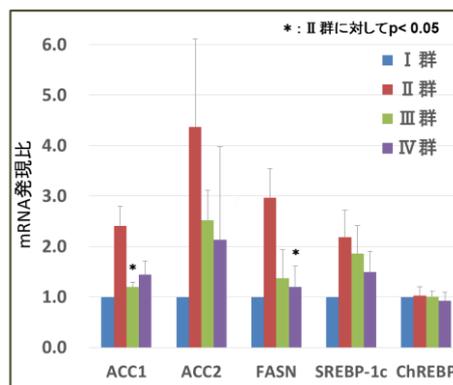


図4 TG合成に関する遺伝子の定量的RT-PCR

(6) 成果のまとめ

本研究により、乳酸菌代謝生産物質PS-B1に、体脂肪の蓄積を原因とする肥満に対して抑制的に作用する可能性があることが示された。またそのメカニズムは、解糖・脂質合成系代謝酵素遺伝子の発現抑制によるものであり、少なくとも転写因子ChREBPの活性化に対する阻害作用によるものであることが示唆された。今後はPS-B1が示す肥満抑制作用を分子レベルで詳細に検討することで、肥満予防・治療に向けた応用研究のみならず、グルコースシグナリングと糖代謝のさらなる解明が期待できる。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 戸田聡美, 深澤昌史, 三浦良子, 野嶽勇一, 榊原隆三, 高スクロース食摂取に対する豆乳の乳酸菌発酵物PS-B1の影響 - 糖質代謝に関して -, 日本食生活学会第52回大会(埼玉)2016年6月4日 埼玉
- ② 戸田聡美, 三浦良子, 深澤昌史, 射場仁美, 榊原隆三, 野嶽勇一, 高スクロース食摂取に対する豆乳の乳酸菌発酵物PS-B1の影響, 日本食生活学会第51回大会 2015年11月21日 岡山
- ③ 深澤昌史, 野嶽勇一, 千布将平, 本間詞子, 三浦良子, 榊原隆三, 豆乳の乳酸菌発酵物PS-B1摂取による肥満抑制効果, 第30回日本薬学会九州支部会 2013年12月7-8日 佐世保

[産業財産権]

○取得状況(計1件)

名称: 乳酸菌生産物質の製造方法及び乳酸菌生産物質並びにアレルギー性皮膚炎抑制剤
 発明者: 本田英俊, 榊原隆三, 深澤昌史, 野嶽勇一他
 権利者: 同上
 種類: 特許

番号：2015-177748
取得年月日：2015年10月8日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 昌史 (FUKASAWA, Masashi)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：20238439

(2) 研究分担者

榊原 隆三 (SAKAKIBARA, Ryuzo)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：30127229

野嶽 勇一 (NODAKE, Yuichi)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：30332282