

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504010

研究課題名(和文) 生体イメージング法による県特産果実由来機能性成分の探索と生理機能の検証

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of food ingredients derived from regional goodies by in vivo imaging technique

研究代表者

井原 勇人 (IHARA, HAYATO)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師

研究者番号：00223298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1. 梅酢に含まれる各種ヒドロキシ桂皮酸の内、カフェ酸がインスリン抵抗性惹起因子レジスチン遺伝子発現を有意に、かつ濃度依存的に低下させることを明らかにした。またカフェ酸の濃度依存的にレジスチン・レポーター遺伝子発現が抑制された。これをヌードマウス皮下に移植し、カフェ酸投与後数日間でレジスチン遺伝子発現抑制傾向が見られた。

2. 県特産物由来機能性成分(特許出願中につき成分は未開示)について、高脂肪食に混餌しC57BL/6マウスを用いて検討を行った。3%混餌群では、摂取後1週間で高脂肪食群に比し有意に体重増加抑制効果が見られ、1%、3%混餌群と濃度依存的にUCP-1遺伝子発現が上昇した。

研究成果の概要(英文)：1. Examined the effects of hydroxycinnamic acids on gene expression of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. Among them, caffeic acid significantly reduced resistin, which causes insulin resistance state, gene expression dose dependently. In addition, caffeic acid also reduced resistin-reporter gene expression in stable adipocytes. After transplantation of these stable cells into inguinal fat pads of nude mice, administration of caffeic acid also reduced the reporter-gene expression in vivo.

2. We have examined effects of another compound (patent pending) derived from regional goodies on high fat diet (HFD)-induced weight gain. C57BL/6 mice fed an HFD with this compound (3% w/w) significantly led to a reduced weight gain only after 1-week period compared with HFD-fed mice, and led to an induction of UCP-1 gene expression in inguinal fat pads.

研究分野：分子病態生理学、脂肪細胞の分子イメージング

キーワード：抗肥満効果 機能性食品成分 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

代表申請者 井原は、これまでメタボリック症候群発症の主な原因の1つと考えられている脂肪組織における悪玉のアディポカイン遺伝子発現増強の分子機構について、研究してきた。悪玉アディポカインのうち1)肥満と心血管系疾患発症を結びつける血栓危険因子 PAI-1 が、脂肪細胞分化に伴い核内受容体型転写因子 PPAR γ によって発現増強すること2)赤ワインに多く含まれる抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールが脂肪細胞分化を抑制し、インスリン抵抗性惹起物質レジスチン遺伝子発現を抑制することを明らかにしてきた。また、3)培養蛍光顕微鏡を用いてレスベラトロールの脂肪蓄積に与える影響とアポトーシス誘導に関してライブセルイメージング法で解析する研究も行なってきた。これらの研究の経緯と背景から、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者が明らかにしてきた県特産果実由来梅酢ポリフェノールの構成成分に関して、メタボリック症候群発症に深く関与する悪玉のアディポカイン遺伝子発現を指標に、生体イメージング可視化技術を新しい切り口として、その発現抑制有効成分について生体内で同定する事、及びその有効成分の分子作用メカニズムについて解明する事により、機能性素材の有用性の科学的エビデンスを検証しようとするものである。梅酢ポリフェノールだけではなく、その他の県特産果実(もも、柿、山椒等)由来機能性素材についても、生体イメージング法により探索・同定し、その有用性を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

生体イメージング可視化技術により、県特産果実由来機能性成分の探索・同定ができるかどうかを、ヌードマウスに悪玉アディポカイン・レポーター導入細胞を移植する系、を中心に検討を行った。また、その生理機能の検証のため、成分投与前後における血液生化学的解析及び分子作用機序の解析を行った。

4. 研究成果

1. 梅酢に含まれるヒドロキシ桂皮酸(クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸)の悪玉アディポカイン遺伝子発現に与える影響の

解析:

- (1) ヒドロキシ桂皮酸の内在性悪玉アディポカイン遺伝子発現に与える影響；各種ヒドロキシ桂皮酸を 100 μ M の濃度で培養脂肪細胞 3T3-L1 細胞に添加した。抽出した Total RNA を用いてリアルタイム PCR にて種々のアディポカイン遺伝子発現を検討した。血栓危険因子の PAI-1 遺伝子発現は、クマル酸 (100 μ M) 添加群、レスベラトロール添加群共に、コントロール群と差がなく、またアディポネクチン遺伝子発現は、減少傾向が見られるものの、顕著な減少は見られなかった。インスリン抵抗性惹起因子レジスチン遺伝子発現については、クマル酸添加により低下傾向が見られた。さらにフェルラ酸添加群では、コントロール群に比し減少する傾向が見られたが、濃度依存性が見られなかった。一方カフェ酸添加群では、Day 3 においてインスリン抵抗性惹起因子レジスチン遺伝子発現を有意に、かつ濃度依存的に低下させることが明らかとなった。
- (2) インスリン抵抗性惹起因子遺伝子プロモーター領域/ルシフェラーゼレポーターベクターの作成と安定発現株の構築：マウスインスリン抵抗性惹起因子レジスチン遺伝子の -1912bp から+232bp、-1478bp から+232bp、-997bp から+232bp、3種類の転写調節領域を PCR 法により増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクター pGL4.20 に連結した。このうち転写活性が一番高かった、の pResistin -997 ベクターを用いて以下の安定発現株作成を行った。pResistin -997 ベクターをトランスフェクション後に、ピューロマイシン耐性株の安定発現株を得た。選別された安定発現株においても、内在性のレジスチン mRNA 発現抑制が見られたように、カフェ酸の濃度依存的にレジスチン・レポーター遺伝子発現が抑制された。
- (3) レポーター安定発現株移植による *In vivo* イメージングによる検討：前年度作成したレジスチン/ルシフェラーゼレポーター安定発現株のうち、発現の強いものを選びヌードマウスの腹側皮下脂肪に 10^6 cells 移植した。移植後 24 時間目から、5 日間にわたって、カフェ酸を腹腔内投与し、時間経過に伴うレジスチン遺伝子の発現をモニターした。撮像の条件等や、また安定発現株の成着とレ

ポーター遺伝子発現の減少等の問題点が見られ、正確な定量的評価はできないものの、カフェ酸投与により発現抑制傾向が見られた。

- (4) Gene Chip を用いたアディポカイン関連遺伝子発現の網羅的解析： Gene Chip を用いてカフェ酸 100 μ M 投与群 vs. コントロール群で比較検討を行った。脂肪細胞分化に関連する転写因子 PPAR γ や C/EBP α 等の発現は抑制傾向にあった。また、各種アディポカイン（レジスチン、アディポネクチン、Rbp4、レプチン、Sfrp5、IL-6、TNF α ）遺伝子について検討したところ、既に分かっているレジスチンは発現抑制されたが、善玉であるアディポネクチン、Rbp4 は抑制傾向であり、むしろ分化抑制に伴うアディポカイン分泌の低下を示唆している可能性が考えられた。他のアディポカインについても発現解析を行ったが、レプチン、sfrp5、IL-6、TNF α などは発現が弱く、Gene Chip を用いた結果からはハッキリとしたことは言えない。Real-Time PCR 法で解析する必要があると思われた。

2. 県特産物由来機能性成分の検討：

和歌山県特産物に含まれる機能性成分についても検討し、高脂肪食負荷による肥満に対して抑制効果があることを見出した。

- (1) 新たな機能性成分（特許出願中につき成分の詳細は未開示）の検討：肥満を誘導する高脂肪食に新規機能性成分を混合し、高脂肪食及び普通食を対照として、体重増加に与える影響について検討したところ、高脂肪食+1%機能性成分混餌群では高脂肪食群に比し、摂取後6週目から有意に体重抑制効果が見られた。さらに3%混餌群では、摂取開始ご1週間で高脂肪食群に比し有意に体重増加抑制効果が見られた。摂取カロリーは3%混餌群で若干減少したが、他の各群では差がなかった。
- (2) ベージュ化を示唆する遺伝子発現：この体重減少の背景にあるメカニズムとして、食欲抑制によるもの、脂質の吸収阻害によるもの、脂肪組織における余剰エネルギーの燃焼、が考えられるが、摂取カロリーがほぼ差がないことから、の可能性はあまりなく、と が考えられた。そこで、の可能性を検討する

ため、機能性成分の鼠頸部皮下組織における遺伝子発現に与える影響を検証した。白色脂肪組織中に褐色脂肪様細胞が誘導されるベージュ化において、蓄積脂肪を熱産生によって消費する熱産生タンパク質 UCP-1 遺伝子発現が上昇する事が知られている。この遺伝子発現上昇を検討したところ、1%、3%混餌群と濃度依存的に UCP-1 遺伝子発現が上昇した。このことから、少なくともこの機能性成分は熱産生タンパク質発現を促進し蓄積脂肪を熱産生によって消費することで、体重増加抑制作用を示すものと考えられた。

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 6 件)

1. Kobayashi Y., Yasuoka Y., Omori Y., Nagahama H., Sanada T., Muto J., Suzuki T., Homma Y., Ihara H., Kubota K., Mukai T.; Annual variation in the atmospheric radon concentration in Japan. *J. Environmental Radioactivity* **146**, 110-118, 2015
2. 岸田邦博、鈴木雅也、井原勇人、尾崎嘉彦；ラット肝臓脂質代謝関連遺伝子発現に与えるカンキツリモノイドの影響 *日本食品保蔵科学会誌* **41**, 51-58, 2015
3. Azizi F., Amouzegar A., Mehran L., Alamdari S., Subekti I., Vaidya B., Poppe K., San Luis T. Jr., Akamizu T.; Screening and management of hypothyroidism in pregnancy: results of an Asian survey. *Endocr J.* **61**(7), 697-704, 2014 Epub 2014. May 14
4. Inaba H., Moise L., Martin W., De Groot AS., Desrosiers J., Tassone R., Buchman G., Akamizu T., De Groot LJ. ; Epitope recognition in HLA-DR3 transgenic mice immunized to TSH-R protein or peptides. *Endocrinology.* **154**(6), 2234-43., 2013. doi: 10.1210/en.2013-1033. Epub 2013 Apr 16.
5. Takagi T, Furuta H, Miyawaki M, Nagashima K, Shimada T, Doi A, Matsuno S, Tanaka D, Nishi M, Sasaki H, Inagaki N, Yoshikawa N, Nanjo K, Akamizu T.; Clinical and functional characterization of the Pro1198Leu ABCC8 gene mutation

associated with permanent neonatal diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* 4(3), 269-73., 2013. doi: 10.1111/jdi.12049. Epub 2013 Mar 11

6. Ihara H., Ogawa M., Magata Y.; Live-cell imaging study on anti-adipogenic and apoptotic effects of a polyphenolic resveratrol during adipocyte differentiation. *Annals of Nutrition and Metabolism* 63 (suppl.) p1716, 2013

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Kunihiro Kishida, Ken Takeshima, Yoshihiko Ozaki, and Hayato Ihara; The effects of dietary cinnamic acid and p-coumaric acid on glucose and lipid metabolism in normal rats fed a high-sucrose diet. The Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2015. Mar 2015, Boston USA
2. 南 のどか, 小林由布香, 安岡由美, 大森康孝, 長濱裕幸, 武藤潤, 真田哲也, 鈴木俊幸, 本間好, 井原勇人, 久保田和人, 向高弘; 日本における大気中ラドン濃度の年変動について 日本保健物理学会 第48回研究発表会 2015. 7.02 ~ 03 (首都大学東京荒川キャンパス)
3. 井原勇人 「分子イメージング法を用いた機能性食品成分の生理機能の解析」農林水産物等の健康機能に関する研究会 (招待講演) 2014.12.3. 関西広域連合事務局 大阪国際会議場
4. Hayato Ihara, Kunihiro Kishida, Mikako Ogawa, and Yasuhiro Magata; Live-cell imaging study of anti-adipogenic and apoptotic effects of a polyphenolic compound resveratrol during adipocyte differentiation. The Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2014. April 2014, San Diego USA.
5. Kunihiro Kishida, Masaya Suzuki, and Hayato Ihara; Dietary p-coumaric acid modulates hepatic gene expression involved with lipid metabolism in rats. The Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2014. April 2014, San Diego USA.
6. 後藤美加子, 安岡由美, 長濱裕幸, 武藤潤, 井原勇人, 向高弘「和歌山における大気ラドン濃度変動」第51回アイソトープ放射線研究発表会 2014 東京 日本アイソトープ協会
7. 井原勇人, 岸田邦博, 小川美香子, 間賀田泰寛 「ライブセルイメージング法によるレスベラトロールの生理機能解析」第13回 分子予防環境医学研究会 2014 和歌山
8. 岸田邦博, 鈴木雅也, 井原勇人 「p-クマル酸によるラット肝臓脂質代謝関連遺伝子発現の変動」第13回 分子予防環境医学研究会 2014 和歌山
9. Hayato Ihara, Mikako Ogawa, Yasuhiro Magata; Live-cell imaging study on anti-adipogenic and apoptotic effects of a polyphenolic resveratrol during adipocyte differentiation, IUNS 20th International Congress of Nutrition 2013, Granada, Spain
10. 井原勇人 「分子イメージング法による機能性食品成分の生理機能の解析」地域イノベーション戦略支援プログラム 平成25年度シンポジウム 招待講演 2013 和歌山
11. 井原勇人 「光イメージング法による機能性食品成分の生理機能の解析」医農連携セミナー in 和医大(招待講演) 2013 和歌山県立医科大学
12. 井原勇人, 小川美香子, 間賀田泰寛 「レスベラトロールによる脂肪細胞分化抑制とアポトーシス誘導のライブセルイメージング」第86回 日本生化学会大会 2013 横浜
13. 井原勇人, 小川美香子, 間賀田泰寛 「レスベラトロールによる脂肪細胞分化抑制とアポトーシス誘導のライブセルイメージング」第67回日本栄養・食糧学会大会 2013 名古屋
14. 井原勇人 「レスベラトロールによる脂肪細胞分化抑制とアポトーシス誘導のライブセルイメージング」第36回 日本基礎老化学会 2013 大阪
15. Saki Nakamura (他8名), Hayato Ihara, and Takahiro Mukai: Sinusoidal model for the annual variation of atmospheric radon concentration in Japan, 第2回 G-EVER国際シンポジウム/第1回 IUGS・日本学術会議国際ワークショップ 2013仙台

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: 血中パラメーター改善剤
発明者: 我藤伸樹, 門脇昭夫, 井原勇人
権利者: 和歌山県立医大/中野 BC (株)
種類: 特許

番号：特願 2014-218294
出願年月日：平成 26 年 10 月 27 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

井原 勇人 (IHARA, Hayato)
和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師
研究者番号：00223298

(2)研究分担者

赤水 尚史 (AKAMIZU, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20231813

岸田 邦博 (KISHIDA, Kunihiro)
近畿大学・生物理工学部・講師
研究者番号：30412703