

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850092

研究課題名(和文) 肥満改善効果を有する新規脂肪分解促進因子AIMを標的とする食品成分の探索

研究課題名(英文) Search for food derived constituents targeting AIM on anti-obesity

研究代表者

細谷 孝博 (Hosoya, Takahiro)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30506572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、現代の代表的な疾病である肥満に着目し、近年脂肪滴を融解する作用として発見されたAIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) を標的とした抗肥満作用を有する食品由来成分を探索することとした。アッセイは、マウスマクロファージ由来細胞を用いたスクリーニング系を構築した。野菜や果実を含む25種類の抽出物について、AIMの発現増強をスクリーニングしたが、増強サンプルを見出すことはできなかった。次に、食品に含まれる成分として、30種類の化合物についてスクリーニングを行ったところ、数種類の化合物にAIM増強活性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is a secreted protein, which is produced and secreted specifically by macrophages. The expression in vivo is markedly increased with obesity progression in mice. Thus, regulation of AIM could be therapeutically applicable for metabolic syndrome. Since the AIM decreases the accumulated lipid droplet in adipocytes, we screened of food-derived constituents for AIM up-regulation effects. We used real time RT-PCR methods with 96-well plate format for the screening of 25 food extracts and 30 food derived constituents. Unfortunately, we could not find the up-regulated AIM sample in any food extracts. Next, we tested the the food derived constituents at 10 μ M and 100 μ M on AIM expression in J774.1 macrophage-like cells. Among them, quercetin (17), 8-prenylnarigenin (21), and isoxanthohumol (24) exhibited the up-regulation effects of AIM expression in J774.1 cells at 100 μ M with high cell viability.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗肥満活性 AIM スクリーニング 食品由来成分

1. 研究開始当初の背景

肥満は、現代の代表的な生活習慣病の一つであり、今後も増加することは確実で、非常に重要な疾患である。また、“肥満であること”は、様々な疾病を引き起こす危険性が高まるため、“肥満を予防すること”や“肥満を改善すること”は、種々疾病の予防医学の観点からも重要である。

近年の研究において、AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) が脂肪細胞に貯まった脂肪滴を融解し、脂肪細胞の大きさを著しく縮小することが報告された。これは、今まで研究されてきた標的とは全く異なり、新たな標的として、肥満改善作用を示す。本研究では、この AIM の発現を増強することで、蓄積した脂肪を融解するこれまでにない化合物を天然食品資源より探索することを目的とした。

2. 研究の目的

肥満は、糖尿病、心筋梗塞、高血圧、高脂血症、狭心症や脳卒中などの様々な疾病との関係が言われており、この肥満を予防もしくは改善することが、様々な生活習慣病を予防することができる可能性を秘めている。肥満は、現代を代表的する疾患の一つであり、今後も増えるとされていることから、抗肥満作用を有する成分への関心が高まっている。

こうした中、2010年、東京大学の宮崎らが、脂肪細胞に貯まった脂肪滴を減少させる因子として、AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) を脂肪分解促進因子として同定し、これまでに研究されてきた標的とは全く異なる肥満改善因子を報告した (Kurokawa, J. et al. *Cell Metabol.* **2010**, *11*, 479-492)。論文で報告されたメカニズムを図1に示す。

AIM は肥満に伴い、血中の濃度が上昇し、脂肪細胞表面の CD36 を介してエンドサイトーシスで取り込まれる

取り込まれた AIM は、FAS (脂肪酸合成酵素) を阻害する

FAS が阻害されることにより、脂肪細胞に貯まった脂肪滴が融解する

脂肪細胞の大きさが縮小する

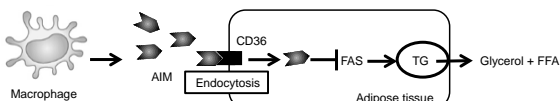


図 1. AIM による脂肪分解のメカニズム

これらは、通常レベルで起こることであるが、肥満症では、この AIM が機能しないか処理が追いつかないため、AIM による脂肪滴の融解が遅れることで脂肪滴が貯まるとされる。従って、この AIM が脂肪滴の減少に必須であり、肥満改善の新たな標的として有用であることが示された。このことは、マウスを

用いた *in vivo* の実験においても証明されており、AIM 非発現マウスでは、正常のマウスより脂肪細胞が大きくなり、脂肪を蓄積した。また、AIM 非発現マウスに AIM タンパクを注射すると、肥満が抑制されることが分かり、体内の AIM を増やすことが、抗肥満に重要であることが *in vivo* 実験でも示された。

本研究では、マウスマクロファージ由来細胞 (J774.1) における AIM の発現量を real time-PCR 法によりスクリーニングし、AIM 発現量を増加させる食品成分を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. アッセイサンプルの 774.1 細胞への細胞毒性

マウスマクロファージ由来細胞 (J774.1) を 96 穴プレートに播種し、24 時間前培養した。培地を取り除き、各濃度に調整した培地と交換し、24 時間作用させた。培地を取り除き、MTT 含有培地と交換し、2 時間 37°C で静置した。2 時間後、培地を除去し、DMSO を添加し、550 nm の吸光度を測定した。サンプル未処理 (DMSO のみを添加) の値を 100% とし、サンプルを処理した値を比較し、細胞生存率を求めた。

3-2. スクリーニング

マウスマクロファージ由来細胞 (J774.1) を 96 穴プレートに播種し、24 時間前培養した。培地を取り除き、各濃度に調整した培地と交換し、24 時間作用させた後、RNA 抽出、逆転写反応、および real time RT-PCR を行った。real time RT-PCR は、SYBER Green 検出系 (Thermal Cycler Dice Real Time System、タカラバイオ株式会社; SYBR Premix Ex Taq II、タカラバイオ株式会社) にて行い、AIM の発現量 (mAIM-f : GAGGACACATGGATGGAATGT、mAIM-r : ACCCTTGTGTAGCACCTCCA) を測定した。また、ハウスキーピング遺伝子として、GAPDH (mGAPDH-f : AACCTTGGCATTGTGGAAGG、mGAPDH-r : ACACATTGGGGGTAGGAACA) を用い、

Ct 法によりサンプル未処理 (DMSO のみを添加) の値を 1 とし、サンプルを処理した値の相対的発現量を求めた。

3-3. 3T3-L1 による脂肪細胞分化抑制試験

マウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を 96 穴プレートに播種し、24 時間前培養した。培地を取り除き、分化誘導培地にて各濃度に調整した培地と交換し、48 時間作用させた。その後、分化培地にて各濃度に調整した培地と交換し、48 時間作用させた。48 時間作用後、再び分化培地にて各濃度に調整した培地と交換し、48 時間作用させた。サンプル作用後、培地を取り除き、WST-8 含有培地と交換し、3 時間 37°C で静置した。上清を別の 96 穴

レートに移し、460 nm の吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。細胞は、PBS で洗浄し、ホルマリンにて固定した。その後、60%イソプロパノールにて洗浄後、Oil Red O 溶液により脂肪滴の染色を行った。細胞を水にて洗浄した後、2-プロパノールを添加し、Oil Red O を溶解させ、520 nm の吸光度を測定した。サンプル未処理 (DMSO のみを添加) の値を 100% とし、サンプルを処理した値と比較し、脂肪滴の蓄積率を求めた。

4. 研究成果

4-1. スクリーニング系の確認

本研究では、細胞内の AIM の発現量の変化を real time RT-PCR にて直接測定することとした。現在、real time RT-PCR は、96 穴プレートフォーマットによるアッセイが可能であり、スクリーニングに向いていると判断し、取り入れた。RNA 抽出および cDNA の作製は、タカラバイオ株式会社のキットを用いることとし、real time RT-PCR は、SYBER Green 検出系にて行った。種々検討を行い、最終的に研究方法 (3-2. スクリーニング) に示した通りに決定した。本研究では、AIM の発現量が、1.5 倍に増強したものを活性ありとした。

4-2. 食品抽出物ライブラリー

野菜や果実を含む 25 種類について、メタノールを用いた成分の抽出を行った。得られた抽出物について、10 および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度における J774.1 細胞への細胞毒性試験および J774.1 細胞での AIM 発現増強スクリーニングを行ったが、AIM の発現量が 1.5 倍以上を示したサンプルはなかった。従って、食品抽出物については、この時点で終了した。

4-3. 食品含有成分ライブラリー

食品中に含まれるとの報告のある成分について、食品含有成分ライブラリーを作製した。化合物 30 種類について、10 および 100 μM の濃度における J774.1 細胞への細胞毒性試験、J774.1 細胞での AIM 発現増強スクリーニングを行ったところ、細胞毒性を示さず、AIM の発現を 1.5 倍以上に上げるサンプルを見出した。化合物 15~30 の結果を図 2 に示した。化合物 1~16、18~20、22、23、25~29 については、相対的発現量が 1 ± 0.2 倍であったため、活性なしと判断した。化合物 17 は、100 μM で 1.5 倍、化合物 21 は、10 μM および 100 μM でそれぞれ 1.3 倍および 1.9 倍、化合物 24 は、10 μM および 100 μM でそれぞれ 1.3 倍および 1.8 倍、化合物 30 は、10 μM および 100 μM でそれぞれ 1.2 倍および 1.9 倍であった。これら化合物 (17、21、24、30) の構造を、図 3 に示した。

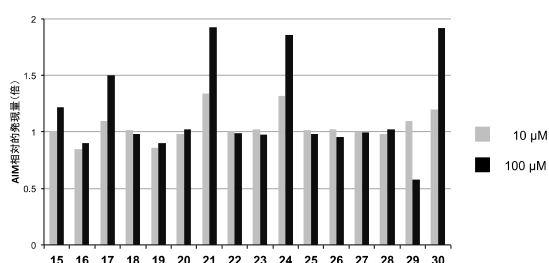


図 2. 化合物 15~30 の AIM の相対的発現量 (倍). 濃度は、10 μM および 100 μM を示す

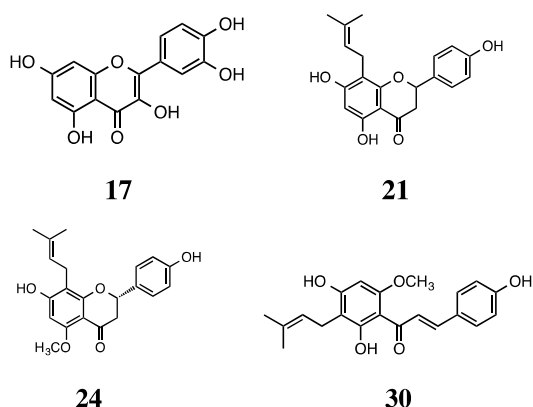


図 3. 化合物 17, 21, 24, 30 の化学構造

同時にスクリーニングを行った naringenin (20) と 21 を比較すると、21 は 20 の 8 位にプレニル基が結合した構造であるが、AIM の発現増強活性を認めた。従って、フラバノン骨格において、構造内のプレニル基の存在が、活性発現に重要であることが示唆された。

本研究では、転写レベルでの AIM の発現増強は認められたが、タンパクレベルでの確認はできていないため、今後、タンパクレベルでの AIM の発現量を確認する予定である。

前述のスクリーニングにおいて、AIM の発現を増強する活性が見られた化合物 17、21、24、30 の 3T3-L1 細胞での脂肪細胞分化抑制試験を行った。長期間の作用では、化合物 21、24、30 の 100 μM において、3T3-L1 細胞への細胞毒性 (50%~100%) を認めた (図 4 (B))。細胞毒性を示さない 10 μM において、いずれの化合物も、脂肪細胞分化抑制活性は示さなかった (図 4 (A))。

本研究では、J774.1 細胞および 3T3-L1 細胞の共培養における評価ができていないが、3T3-L1 では、AIM が発現していないという報告があることから、J774.1 細胞および 3T3-L1 細胞の共培養における評価を行った場合、脂肪滴の減少が認められれば、AIM 発現による結果であると結論付けることができる。今後、これら細胞の共培養における評価を行う予定である。

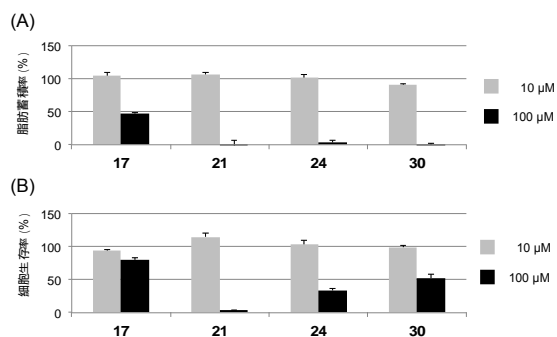


図4. 化合物 17、21、24、および 30 の 3T3-L1 細胞へ作用。(A) 脂肪蓄積率(%)、(B) 細胞生存率(%)。

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2件)(査読有り)

S. Yoshida, T. Hosoya, S. Inui, H. Masuda, S. Kumazawa: Component analysis of wasabi leaves and an evaluation of their anti-inflammatory activity. *Food Sci. Technol. Res.*, 21, 247-253, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 孝博 (TAKAHIRO HOSOYA)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30506572