

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660103

研究課題名(和文) 乳脂肪球皮膜の代謝症候群抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) inhibitory effect of milk fat globule membrane on metabolic syndrome

研究代表者

東 徳洋 (azuma, norihiro)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：30151062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳脂肪球皮膜(MFGM)摂取による代謝症候群抑制効果を *in vivo*ならびに *in vitro*で検証した。

MFGMには、マクロファージの泡沫化抑制ならびにアポトーシス誘導による、二段構えで動脈硬化を予防する効果が示唆され、マウスの介入試験からは、体重増加の抑制、肝臓の中性脂肪、血中遊離脂肪酸濃度増加の有意な抑制効果が示され、さらには脂肪組織内の炎症性サイトカインTNFの発現抑制、血中グルコース濃度上昇抑制が認められた。

これらのことから、MFGMには肥満による慢性炎症、延いてはインスリン抵抗性の改善が期待され、代謝症候群抑制食品候補としての可能性が示されたものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The effect of inhibiting metabolic syndrome by ingestion of milk fat globule membrane (MFGM) was examined *in vivo* and *in vitro*.

MFGM showed the effect of preventing arteriosclerosis in two stages by suppressing foaming of macrophages and inducing apoptosis in it. The mouse intervention study with MFGM showed significant suppression effect of suppression of weight gain, liver triglyceride and increase of blood free fatty acid concentration. In addition, suppression of the expression of the inflammatory cytokine such as TNF- α in adipose tissue and suppression of blood glucose concentration increase were observed.

From these facts, MFGM is expected to improve chronic inflammation due to obesity and insulin resistance, and it was shown that MFGM could be a candidate for metabolic syndrome suppression foods.

研究分野：食品生化学

キーワード：乳脂肪球皮膜 肥満 生活習慣病 代謝症候群 慢性炎症 脂肪細胞 マクロファージ TNF

1. 研究開始当初の背景

近年ライフスタイルの欧米化に伴って、日本においても肥満を中心とするメタボリックシンドロームやそれに伴う合併症が大きな社会問題となっており、この、いわゆる生活習慣病に、副作用を伴わない食品による対応が求められている。日本では飲乳習慣が浅く、欧米で普及している乳製品でもなじみのないものが多い。その代表格のバターミルクはバター製造の際の副産物であり、さわやかな飲料として古くから飲まれているものである。それに含まれる乳脂肪球皮膜(MFGM)は乳脂肪の合成・脂肪滴形成や分泌に関与する膜タンパクで構成されていることから、MFGM 摂取により脂肪吸収の抑制、脂肪細胞の肥大化の抑制を介したメタボリックシンドロームの抑制に寄与する可能性が期待される。これにより、乳製品摂取によるメタボリックシンドロームに対する漠然とした不安感も解消できるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

MFGM を構成する、乳科学的には PAS4 とよばれている膜糖タンパク質は、マクロファージの酸化 LDL の取り込みや脂肪細胞の脂肪酸取り込みに関与する細胞膜受容体(CD36)と同一分子である。また、マクロファージ自身が分泌する、マクロファージアポトーシス抑制因子(apoptosis inhibitor of macrophage (AIM))の受容体が CD36 であることも明らかにされている。これらのことから、MFGM あるいはそれを含むバターミルクを摂取することにより、吸収された MFGM 分解産物とこれらの受容体機能が競合することで、動脈硬化等も含む、いわゆるメタボリックシンドローム抑制効果があるのではないかという作業仮説をたてた。本研究の目的はメタボリックシンドローム対策の食品(素材)候補として MFGM あるいはバターミルクにその可能性を探るものである。バター製造の際の副産物であるバターミルクは他の乳製品とともに太古から食されているものであり、食品(素材)としての安全性は既に保証されている。

3. 研究の方法

(1) MFGM の肥満予防効果

① 細胞培養系

脂肪前駆細胞であるマウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞はデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンを含む分化誘導培地で培養することで脂肪細胞へと分化する。これを検定細胞として用い、分化誘導培地に、経口投与による消化のモデルとしてペプシン処理を施した MFGM を添加することにより脂肪細胞への分化、ならびに分化した脂肪細胞における脂肪滴の蓄積の影響を調べた。分化した脂肪細胞に蓄積した脂肪滴は、ホルマリンで固定後、Oil Red O 染色により顕鏡観察するとともに、イソプロパノールに

より染色された脂肪を抽出し、吸光測定により定量した。

また、リアルタイム PCR により、アディポカインや脂肪酸代謝因子等の発現を調べることで脂肪細胞への分化、脂肪蓄積に対する MFGM の影響を評価した。

② マウス介入試験

雄の C57BL/6J マウス 4 週齢を用いて、3 群に分け、1 群を普通食群 (CON 群)、2 群を高脂肪食群 (HF 群)、3 群を高脂肪食+MFGM 群 (MFGM 群) として 8 週間飼育を行った。体重推移の変化、各種血漿成分濃度、肝臓および各脂肪組織の重量、肝臓の中性脂肪の定量、肝臓凍結切片の oil red O 染色による脂肪蓄積の観察、糞中中性脂肪の定量を行い、肥満に起因する症状に対する MFGM 摂取の効果の検討を行った。

(2) MFGM による慢性炎症の抑制効果

肥満に伴い脂肪組織へマクロファージが浸潤し、そこで活性化されたマクロファージが産生する炎症性サイトカイン TNF α により引き起こされる慢性炎症に対する MFGM 摂取の影響について、細胞培養系ならびに高脂肪食肥満誘導炎症モデルマウスを用いて調べた。

① 細胞培養系

RAW264.7 マクロファージおよび 3T3-L1 細胞から誘導した脂肪細胞を用いて、それぞれ単独培養ならびに共培養系において MFGM による慢性炎症の抑制効果を検討した。

RAW264.7 細胞を LPS で刺激した後、ペプシン処理 MFGM を添加培養して 24 時間後の培養上清の TNF- α の濃度を ELISA により測定した。

脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞(分化誘導 8 日目)に、24 時間の血清飢餓状態を経て、ペプシン処理 MFGM を添加培養した。48 時間後に培養上清を回収し、ELISA により上清中の MCP-1 の濃度を測定した。

共培養系においては、ペプシン処理 MFGM の添加培養上清中の TNF- α と MCP-1 の濃度を測定した。

② 炎症モデルマウス介入試験

雄の C57BL/6J マウス 4 週齢を用いて、4 か月間高脂肪食を与え、肥満由来慢性炎症モデルマウスを作製した。慢性炎症モデルマウスを 2 群に分け、1 群を高脂肪食群 (HF 群)、2 群を高脂肪食群+MFGM 群 (MFGM 群) として、さらに 2 か月間飼育を行った。飼育中の体重および摂食量を測定し、飼育終了時に解剖を行い、体重推移の変化、各種血清成分濃度変化、各脂肪組織重量の測定、リアルタイム PCR による脂肪細胞中の炎症性サイトカイン遺伝子発現の定量等を行い、肥満由来の慢性炎症に対する抑制効果の検討を行った。

(3) 動脈硬化抑制効果

ヒト単球由来の THP-1 細胞は PMA

(phorbol-12-myristate-13-acetate) 処理によりマクロファージに分化する。その段階で、酸化 LDL、あるいは酸化 LDL 種の PAz-PC (1-Palmitoyl-2-Azelaoyl phosphocholine) を取り込ませて泡沫化細胞とし、それを検定細胞として用いた。泡沫化細胞にペプシン処理 MFGM を添加し、アポトーシスの誘導をヘキストによる核染色後、蛍光顕微鏡で観察した。アポトーシス特徴的な形態を示す核断片を持つ細胞の数を計測し、ペプシン処理 MFGM の泡沫化細胞の AIM によるアポトーシス抑制に対する抑制効果（ひいては動脈硬化の抑制効果）を評価した。また、酸化 LDL 取り込みによるマクロファージの泡沫化誘導時に、ペプシン処理 MFGM 添加培養により泡沫化への影響についても調べた。

4. 研究成果

(1) MFGM の肥満予防効果

① 細胞培養系

ペプシン処理 MFGM の脂肪細胞への添加培養において 50mg/mL 濃度で細胞内脂肪含量が 70%以下に抑えられたことから、MFGM には脂肪滴蓄積抑制作用があることが示唆された。リアルタイム PCR の結果、アディポサイトカイン（アディポネクチン、レプチン、ペリリピン）、脂肪酸代謝因子（PPAR α 、CPT-1、ACOX、SRE BP1）、脂肪酸合成因子である FAS の発現も MFGM 添加によって抑制されることが示された。さらに脂肪細胞の分化を制御する転写因子（C/EBP α 、PPAR γ ）の発現を見たところ、これらの発現が MFGM 添加によって有意に抑えられていることが明らかになった。しかし、肥大化した脂肪細胞においては脂肪滴蓄積の改善効果は観察されなかった。

② マウス介入試験

HF 群と比較して MFGM 群で有意に体重の減少が見られ、腎臓周囲・腸間膜周囲・精巣周囲の脂肪組織すべてにおいての重量が有意に減少した。また、肝臓においても中性脂肪濃度および遊離脂肪酸濃度の有意な減少が認められたが、糞中においては有意な差は認められなかった。血漿中の中性脂肪濃度および遊離脂肪酸濃度においても有意な差は認められなかった。よって、摂取された MFGM は、脂肪酸の β -酸化を促す等、吸収された脂質代謝に影響を及ぼすのみならず、脂肪細胞への分化・脂肪組織の肥大化を抑制した可能性が示唆された。

(2) MFGM による慢性炎症の抑制効果

① 細胞培養系

単独培養において、LPS 刺激マクロファージでは、MFGM の添加により濃度依存的に TNF- α の産生が抑制され、3T3-L1 脂肪細胞では、MFGM ペプシン分解産物の添加により濃度依存的に MCP-1 産生が抑制された。

共培養時の TNF- α の産生量は、MFGM ペプシン分解産物の添加濃度が 100 μ g/mL の時

に抑制傾向がみられたが、MCP-1 産生量の変化はみられなかった。ただし、共培養については再現性に乏しく、再検討を要する。

② 炎症モデルマウス介入試験

肥満由来慢性炎症モデルマウスの HF 食群と比較して MFGM 食群において有意な体重の変化は認められなかったが、内臓脂肪量には有意な減少が認められた。内臓脂肪における遺伝子発現量に関しては、炎症性サイトカイン TNF- α に有意な減少が認められた。血清分析においてもインスリン抵抗性の指標となるグルコース濃度の減少傾向が認められ、遊離脂肪酸濃度においては有意な減少が認められた。これらのことから脂肪組織における液性因子を介した慢性炎症ひいてはインスリン抵抗性が抑制されることが示唆された。

(3) 動脈硬化抑制効果

泡沫化細胞にペプシン処理 MFGM を添加培養し、核染色をした結果、アポトーシスをおこなっている細胞の割合がペプシン処理 MFGM 未添加の値と比較して 50、100 μ g/mL 添加で有意に増加した。一方、同条件で泡沫化前のマクロファージでも効果を検証したところ、ペプシン処理 MFGM を 100 μ g/mL 添加した時にも有意差は得られなかったことから、ペプシン処理 MFGM の添加により泡沫化細胞が選択的にアポトーシスに誘導されたことが分かった。泡沫化誘導時に、ペプシン処理 MFGM 添加培養することにより脂質の蓄積が有意に抑制され、RT-PCR により泡沫化の指標である AIM の発現抑制が認められた。このように、MFGM には二段構えで動脈硬化を予防する効果がある可能性が示唆された。

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 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

①廣瀬 彰人、高脂肪食摂取マウスにおける乳脂肪球皮膜摂取による脂質代謝への影響
日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 28 日 札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

②廣瀬 彰人、肥満誘導慢性炎症モデルマウスにおける乳脂肪球皮膜摂取の影響
日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 18 日 京都女子大学（京都府・京都市）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 徳洋 (AZUMA, Norihiro)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：30151062

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

廣瀬 彰人 (HIROSE, Akito)