

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501024

研究課題名(和文) 内臓脂肪組織における免疫システムの改善を介した食品成分の食餌性肥満軽減機構の解明

研究課題名(英文) Improvement of immune system by food components in visceral adipose tissues of diet-induced obese mice

研究代表者

小堀 真珠子 (Kobori, Masuko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：50353941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食餌性肥満の内臓組織における免疫細胞の増加や活性化が生活習慣病への進行を促進することが明らかになっている。本研究では、ケルセチンを高脂肪、高ショ糖、コレステロール食である西洋型食に添加してマウスに摂取させることにより、ケルセチンが精巣周囲脂肪組織への免疫細胞の増加と活性化を抑制することを明らかにした。DNAマイクロアレイ解析、RT-PCR及び組織染色等の結果から、ケルセチンは西洋型食で誘導されるマクロファージ、T細胞等の免疫細胞の増加や活性化を広く抑制すると共に、CD4+/CD8+ T細胞のバランスを改善し、炎症に関わるTNF等の発現を抑制して、脂肪組織の炎症を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue inflammation plays a pivotal role in the development of metabolic diseases. In this study, we examined the effect of quercetin on the accumulation and activation of immune cells in epididymal adipose tissues of a high fat, high sucrose and high cholesterol Western diet-induced obese mice. DNA microarray, RT-PCR and histological analyses showed that supplementation with quercetin suppressed the accumulation and activation of immune cells, such as macrophages, lymphocytes and mast cells, in the epididymal adipose tissues of mice fed a Western diet. Quercetin improved the ratio of CD4+/CD8+ T lymphocytes in mice fed a Western diet. Quercetin is suggested to suppress the inflammation through reducing the expression of TNF and other inflammatory cytokines in the adipose tissues in diet-induced obese mice.

研究分野：食品機能

キーワード：ケルセチン 肥満 内臓脂肪蓄積 免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 食餌性肥満の内臓脂肪組織でT細胞のバランスやマスト細胞の湿潤・活性化等の免疫細胞の働きが、更なる肥満やメタボリックシンドロームへの進展に関与することが明らかになりつつある。しかし、食品成分による肥満やメタボリックシンドローム予防に関して、脂肪組織のT細胞やマスト細胞等を介した作用メカニズムの研究はこれまで行われていない。

(2)研究代表者らは、これまでに野菜、果物等の食品中に広く存在するフラボノイドのケルセチンが、マウスに高脂肪、高コレステロール、高シヨ糖食である西洋型食で誘導される肥満及びメタボリックシンドロームに関連する諸症状の軽減に極めて有効であることを明らかにした。西洋型食にケルセチンを添加して長期間摂取させることより、体重及び内臓脂肪重量の増加は抑制され、血糖値、血中脂質濃度及び血中インスリン濃度等は改善された。

(3)また申請者らはフラボノイドのフィセチンが、喘息の悪化等に関与する活性化T細胞の接着刺激によるマスト細胞活性化を抑制することを明らかにして、フラボノイドが食餌性肥満に加えてアレルギー抑制に有効であることを示している。

2. 研究の目的

(1)脂肪蓄積抑制効果を示すフラボノイドのケルセチンが、西洋型食によりマウスの内臓脂肪組織で変動する遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにする。

(2)また、ケルセチンが内臓脂肪組織中の各種免疫担当細胞及びそのバランスに及ぼす影響を明らかにする。

(3)免疫細胞の活性化に及ぼすケルセチンの抑制効果を明らかにする。

これらの結果から、内臓脂肪組織におけるケルセチンの免疫システム改善効果を明らかにする。

3. 研究の方法

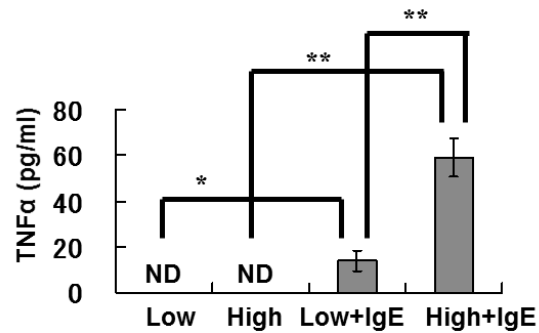
(1) 肥満による高血糖と免疫システムとの関係を明らかにするため、高濃度のグルコースを含む培地で HMC-1 及び LAD2 ヒトマスト細胞を培養し、グルコースが炎症性サイトカインの発現や、活性化に及ぼす影響を検討した。

(2)C57/BL6J マウスにコントロール食、西洋型食(高脂肪、高シヨ糖、コレステロール食)または 0.05%ケルセチン含有高コレステロール食を 18 週間摂取させた後、グルコース、インスリン、アディポサイトカイン等の生活習慣病と関連の深い血中成分を測定した。ま

た精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ及び RT-PCR 法により測定すると共に、組織染色を行った。CD4+及び CD8+ T細胞のバランスはフローサイトメーターを用いて測定した。

4. 研究成果

(1)肥満による高血糖と免疫システムとの関係を明らかにするため、高濃度のグルコースが HMC-1 及び LAD2 ヒトマスト細胞に及ぼす影響を検討した結果、グルコースは HMC-1 細胞において炎症性サイトカインである TNF 及び IL-1 等の発現を誘導した。また LAD2 細胞において IgE 抗体及び抗原で誘導される脱顆粒及び TNF の放出を促進した(図 1)。高濃度のグルコースは HMC-1 細胞及び LAD2 細胞において TNF や他の炎症性サイトカインの発現に関わる ERK, JNK 及び MAP キナーゼの活性化を促進した。



ND: Not Detectable

図 1 グルコースは IgE 抗体及び抗原のクロスリンクによる LAD2 ヒトマスト細胞のからの TNFα の放出を誘導する

LAD2 細胞は高濃度又は低濃度のグルコースを含む培地で 1 日培養した後、IgE 抗体及び抗原添加して培養し、培養液中の TNFα の濃度を ELISA 法で測定した。

(2)ケルセチンの内臓脂肪組織における免疫システム改善効果を明らかにするため、マウスにコントロール食、西洋型食及び 0.05%ケルセチン含有西洋型食を 18 週間自由摂取させた後、精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を DMA マイクロアレイを用いて網羅解析した。0.05%ケルセチン含有西洋型食を 18 週間摂取したマウスでは、西洋型食を摂取したマウスに比べて、体重、内臓脂肪組織、血中グルコース濃度、血漿インスリン濃度が低下する。また、炎症性サイトカインであり、アディポサイトカインである TNF の血中濃度も低下する。更に、アディポサイトカインのうち、レプチンの血中濃度が有意に低下した。精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現解析の結果は、西洋型食により変動する遺伝子発現をケルセチンが抑制して、コントロールの遺伝子発現に近づけることが明らかになった(図 2)。

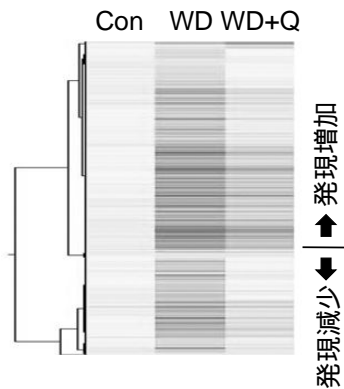


図2 ケルセチンは西洋型食で誘導される精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現変化を抑制する

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、西洋型食で有意に発現変化した遺伝子。それぞれ、Con: コントロール、WD: 西洋型食、WD+Q: 0.05%ケルセチン添加西洋型食を摂取したマウス精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現。色の濃さは発現の強さを示す。

このとき、西洋型食により有意に発現変動した遺伝子について、パスウェイ解析を行った結果、西洋型食により、主として免疫・血液細胞の機能や炎症反応に関わる遺伝子発現が変動していることが明らかになった(表1)。

表1 西洋型食により精巣周囲脂肪組織で変動が予想される疾患に関わる反応及び生物学的機能のトップ5

疾患に関わる反応及び生物学的機能
Cellular movement (細胞運動)
Immune Cell Trafficking (免疫細胞交通)
Cell-to-Cell Signaling and Interaction (細胞間シグナル伝達と相互作用)
Hematological System Development and Function (血液システムの発達と機能)
Inflammatory response (炎症反応)

コントロール及び西洋型食を摂取したマウスの精巣周囲脂肪組織で有意の発現変動した遺伝子をパスウェイ解析した。

(3)西洋型食は、マクロファージや単球、顆粒球の増殖や活性化等に関わる遺伝子発現を増加させた他、T細胞、B細胞及びマスト細胞の関わる遺伝子発現を増加させた。ケルセチンはそのうち、マクロファージ、顆粒球、T細胞、B細胞及びマスト細胞に関わる多くの遺伝子発現を有意に抑制した。

そこで、精巣周囲脂肪組織を用いて、マクロファージのマーカーである Mac2 を染色した結果、西洋型食によるマクロファージの増加がケルセチンにより抑制された(図3)。

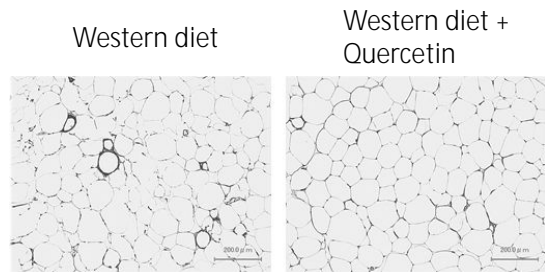


図3 ケルセチンは西洋型食で誘導される精巣周囲脂肪組織のマクロファージの増加を抑制する

西洋型食またはケルセチン添加西洋型食を18週間摂取したマウスの精巣周囲脂肪組織において、マクロファージを抗 Mac2 抗体で染色した。

さらに、RT-PCR法を用いて、炎症を抑制する M2 マクロファージを含めたマクロファージのマーカー遺伝子の発現を測定した結果、ケルセチンは西洋型食で誘導される M1 及び M2 マクロファージのマーカー遺伝子の発現を共に抑制することが明らかになった。これらことから、ケルセチンは炎症抑制に作用する M2 マクロファージ等も含めて、マクロファージやT細胞等の増加や活性化を抑制すると考えられた。

一方、フローサイトメーターを用いて CD4+ 及び CD8+ T細胞のバランスを測定した結果、西洋型食による肥満マウスで増加する CD8+ エフェクターT細胞の割合を、ケルセチンが抑制することが明らかになった。

(4)パスウェイ解析により、西洋型食で活性化または増加することが予想される制御因子を検討した結果、TNF やコレステロールを含めた複数の制御因子が見いださ、これらのうちの多くがケルセチンにより抑制されることが明らかになった。さらに、RT-PCRの結果はケルセチンが西洋型食で誘導される TNF の発現を強く抑制することを示していた。

ケルセチンは、西洋型食で誘導されるマクロファージ、T細胞、マスト細胞等の免疫細胞の増加や活性化を広く抑制すると共に、CD4+/CD8+ T細胞のバランスを改善し、炎症に関わる TNF 等の発現を抑制して、炎症を抑制すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Masuko Kobori, Yumiko Takahashi, Yukari Akimoto, Mutsumi Sakurai, Izumi Matsunaga, Haruno Nishimuro, Katsunari Ippoushi, Hideaki Oike, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. Journal of Functional Foods

15, 551-560 (2015). 査読有
doi:10.1016/j.jff.2015.04.006

Kanji Nagai, Tatsunobu Fukushima, Hideaki Oike and Masuko Kobori, High glucose increases the expression of proinflammatory cytokines and secretion of TNF α and β -hexosaminidase in human mast cells. European Journal of Pharmacology 687(1-3), 39-45 (2012). 査読有
doi:10.1016/j.ejphar.2012.04.038

〔学会発表〕(計1件)

山内優輝、高橋弓子、秋元由香里、大池秀明、一法師克成、小堀真珠子、ケルセチンが西洋型食で誘導される脂肪組織の免疫システムに及ぼす影響、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014.3.28 神奈川

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/introduction/chart/0304/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀 真珠子 (KOBORI MASUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号: 5 0 3 5 3 9 4 1