

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350124

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム予防を目的とした新たな大豆イソフラボンの免疫細胞への効果

研究課題名(英文)Effect to an immune cell of new soy isoflavone for the purpose of the metabolic syndrome prevention

研究代表者

首藤 恵泉 (SHUTO, Emi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：10512121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの発症機構に、免疫細胞であるT細胞が根本的な病態をコントロールしていることが報告され、様々な生活習慣病は慢性炎症から生じているという概念が注目されていることから、メタボリックシンドロームの発症に関わるT細胞を介した慢性炎症ターゲットとし、新たなメタボリックシンドロームの発症機構を解明することを試みた。

脂質エネルギー比45%のWestern食による食餌誘導性肥満マウスを用いてエクオールを投与し検討したところ、精巣上体脂肪におけるマクロファージの分化極性がM2優位となること、また、高脂肪食により障害されたインスリンシグナルを改善させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Because it was reported that the T cell which was an immune cell controlled the basic condition of a patient, and the concept that various lifestyle diseases produced from chronic inflammation attracted attention of onset mechanism of the metabolic syndrome, I did it with the chronic inflammation target through a T cell concerned with the onset of the metabolic syndrome and tried that I elucidated onset mechanism of new metabolic syndrome.

After giving it, and examining Equol using a diet induced obesity mouse by the Western food of 45% of lipid energy ratios, I found that the differentiation polarity of the macrophage in the epididymis fat became the M2 predominance, and improve an insulin signal affected by a high-fat diet.

研究分野：栄養免疫

キーワード：メタボリックシンドローム 慢性炎症 大豆イソフラボン

1. 研究開始当初の背景

日本人男性の2人に1人、女性では5人に1人がメタボリックシンドロームあるいはその予備群であるとされている。メタボリックシンドロームは、糖尿病や脳梗塞等の重篤な疾患に進展する基礎疾患であり、世界的にも重要な健康問題となっている。エネルギー過剰状態によって引き起こされる内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは、脂肪組織において TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインの発現が亢進するとともに、インスリン抵抗性が誘導され糖尿病の発症につながる。また、動脈硬化巣において血管内皮下へのマクロファージやリンパ球の浸潤および炎症性サイトカインである IL-6 の発現亢進などが見られることから、慢性疾患の発症に炎症が深く関与していることが明らかとなり、糖尿病や肥満といったメタボリックシンドロームだけでなく、これまで炎症が関与していると思われなかった心血管疾患、骨粗鬆症、癌、アルツハイマー病などの神経変性疾患、自己免疫疾患などの基盤病態に、炎症性サイトカインや免疫細胞が深く関与することが報告され、様々な生活習慣病は慢性炎症から生じているという概念が注目されている。これら炎症性サイトカインは、肥大化した脂肪細胞よりもむしろそこに浸潤してきたマクロファージに由来しており免疫細胞の T 細胞が肥満・メタボリックシンドロームの根本的な病態制御機構を司るという衝撃的な報告がなされた (*Nature Medicine*,15;911-920,921-929,930-939,2009)。これは、脂肪組織に浸潤した T 細胞が炎症性マクロファージの分化を調節し、脂肪組織および全身の慢性炎症を決定づけることを示したものである。また、肥満は2型糖尿病や心疾患の発症リスクを高めることが多数報告されているが、実際には肥満していても3人に1人は代謝的に異常が見られない。最近、肥満していても代謝的異常の

ない人は、白血球細胞数など炎症反応を示す指標の上昇が見られず、抗炎症作用のあるアディポネクチン濃度が高いことが報告された (*J Clin Endocrinol Metab*,98:E1610-1619,2013)。これは、炎症が生体内の代謝において大きな鍵を握っていることを示しており、近年注目されている慢性炎症に関する基礎研究を裏付ける衝撃的な臨床データである。

2. 研究の目的

これまで我々は、栄養と免疫機能、特に大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンと T 細胞機能に関する研究を行ってきた。CD4⁺ヘルパー T 細胞は、INF- γ を産生する Th1 細胞と IL-4 を産生する Th2 細胞の2つの細胞集団に分化することが知られている。これまでの我々の研究で、大豆イソフラボンの主成分であるゲニステインは Th1 細胞由来の IFN- γ と Th2 細胞由来の IL-4 によるサイトカイン産生抑制に関するシグナル伝達経路に作用し (Sakai T, et al. *J Nutr Sci Vitaminol*,52:293-296,2006)、ダイゼインから腸内細菌によって代謝され産生されるエクオールは Th2 細胞から産生される IL-13 依存性のメカニズムで抗原特異的 IgE 抗体産生を上昇させる (Sakai T, et al. *J Nutr Sci Vitaminol*,56:72-76,2010) ことを見出した。これまでの研究より、大豆イソフラボンは構造が類似していても免疫機能に及ぼす影響は異なる可能性があることを示唆しており、本研究ではエクオールに着目することとした。本研究では、肥大した脂肪組織における慢性炎症に着目し、大豆イソフラボンによる脂肪組織に浸潤する T 細胞やマクロファージの機能およびそのメカニズムについて明らかにすることにより、食品機能成分による新たなメタボリックシンドロームの予防および治療の応用研究に貢献するとともに、新たなメタボリックシンドロームの発症機序を

解明する基礎的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

食餌誘導性肥満マウスを用いて、エクオールによるT細胞への効果とマクロファージの分化極性 (M1 と M2) およびそのメカニズムについて明らかにする。4週齢の雄 C57BL/6J マウスを、コントロール群とエクオール投与群に分け、脂質エネルギー比 45% (Western 食) の高脂肪食で 12-23 週飼育した。エクオールは 20mg/kg/day となるように調整し、毎日経口投与を行った。

(1) エクオール投与開始 7 週目に経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を行った。18 時間の絶食後、ブドウ糖 1.5g/kg 体重を経口投与した。0、15、30、60、120 分後に尾静脈より血液を採取し、血糖値を測定した。また、エクオール投与開始 8 週目にインスリン負荷試験 (ITT) を行った。6 時間の絶食後、インスリン 0.75U/kg 体重を腹腔内投与し、同様に測定した。

(2) 解剖前日に、ALOKA ラシータ (日立アロカメディカル株式会社) を用いて体組成を測定した。解剖時に採取した血清より、T-Cho、TG、NEFA を酵素学的に測定した。

(3) 採取した精巢上体脂肪は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、total RNA (2µg) から cDNA を合成した。mRNA の発現量解析は、real-time PCR 法により定量を行った。さらに、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定後パラフィン切片を作成し、HE 染色および免疫染色を行った。画像解析には、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE 社) を使用した。

(4) 精巢上体脂肪におけるマクロファージの分化極性を検討するため、コラゲナーゼ type I を用い SV fraction を分離した。細胞表面マーカーを染色するため、F4/80-FITC

(BioLegend), F4/80-PE (CALTAG LABO-RATORIES), CD45-PerCP (BioLegend), LY6c-APC (BioLegend), CD11c-APC (BioLegend), CD206-PE (BioLegend) を用いた。細胞内の Arg-1 を標識するため、4% パラホルムアルデヒドにて細胞を固定し、0.1% サポニンを用いて膜透過処理後、Arg-1-FITC (R&D SYSTEMS) を用いて染色した。Guava easy cyte™ Flow Cytometers (Merck Millipore) により解析を行った。

(5) エクオール投与開始 12 週目に 18 時間の絶食後、インスリン 0.75U/kg 体重を腹腔内投与し、投与 15 分後に採取した腓腹筋を用いてインスリンシグナルについて検討するためにウエスタンブロッティングを行った。

データは、平均±標準誤差として示した。群間の統計的有意差 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) は多重比較検定 Bonferroni を用いて統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食により肥満したマウスにおいてエクオールによる糖代謝への影響について検討するために、エクオール投与開始後 7 週目に OGTT を行ったところ、エクオール投与による有意な差は見られなかったが、15 分値と 30 分値に減少傾向が見られた。一方、エクオール投与開始後 8 週目に ITT を行ったところ、高脂肪食摂取により障害されたインスリン感受性が、エクオール投与により有意に改善した。さらに、AUC について検討した

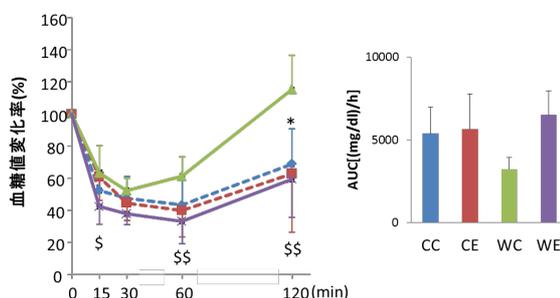


図 1 エクオール投与における糖代謝への影響

ところ、エクオール投与により有意な増加が認められた。(図1)

(2) 血清 T-Chol では変化は見られなかったが、血清 TG および NEFA においてエクオール投与による有意な減少が見られた。

(3) エクオール投与による炎症関連遺伝子の発現量への影響について検討するため、23 週間飼育した後、精巢上体脂肪において、マクロファージのマーカである Emr-1 の遺伝子発現について検討したところ、標準食に比して Western 食を摂取することにより Emr-1 の発現が有意に増加したが、エクオール投与により有意に減少することを見出した。なお、この遺伝子発現量は標準食とほぼ同程度まで減少させることができた。同様に、単球・マクロファージの遊走化因子である MCP-1 について検討したところ、有意差は見られないものの Emr-1 と同様の傾向が得られた。(図2)

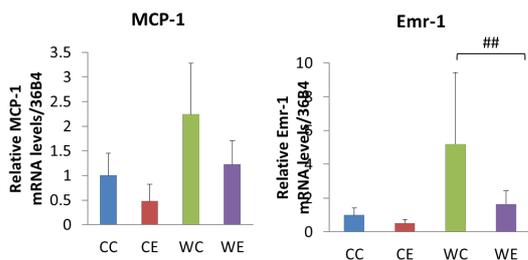


図2 エクオール投与による遺伝子発現量への影響

精巢上体脂肪における組織切片において脂肪細胞の肥大化について検討するために、HS オールインワン蛍光顕微鏡を用いて、H.E 染色を行い、画像撮影および面積測定を行った。コントロール群では、肥大した脂肪細胞が多く見られたのに対し、エクオール投与群においては小型の細胞が多く見られた。さらに、細胞面積の計測を行ったところ、エクオール投与によりヒストグラムが全体的に左にシフトしており、面積の小さい細胞が多かった。(図3)

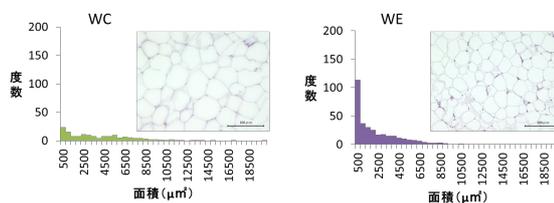


図3 エクオール投与による精巢上体脂肪の組織学的評価

精巢上体脂肪においてマクロファージのマーカである F4/80 による免疫染色を行ったところ、エクオール投与によりマクロファージの浸潤が抑制された。同様に、MCP-1 による免疫染色を行ったところ、エクオール投与により MCP-1 の浸潤が抑制された。

(4) 精巢上体脂肪におけるマクロファージの分化極性を検討するため、M1 マクロファージとして CD45⁺F4/80⁺LY6c⁺ および CD45⁺F4/80⁺CD11c⁺、M2 マクロファージとして CD45⁺F4/80⁺CD206⁺、CD45⁺F4/80⁺Arg-1⁺ および CD45⁺F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺ の割合について、フローサイトメトリー法を用いて測定したところ、エクオール投与により M2 マクロファージである CD45⁺F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺ が有意に増加することを見出した。

(5) エクオールがインスリン抵抗性を改善するエクオール投与によるインスリンシグナルへの影響について検討することを試みた。Western 食による食餌誘導性肥満マウスを用いて、エクオール投与 12 週後に腓腹筋における Akt のリン酸化について検討した。その結果、標準食群においてエクオール投与による変化は認められなかったが、Western 食においてエクオール投与により Akt のリン酸化が有意に上昇することを見出した。つまり、Western 食により障害されたインスリンシ

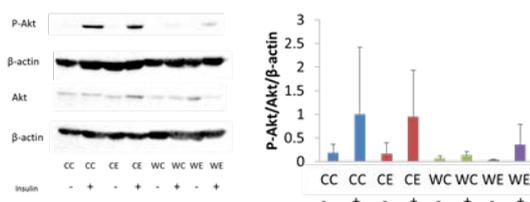


図4 エクオール投与によるインスリンシグナルへの影響

グナルを、エクオールが有意に回復させることを示唆している。(図4)

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 7 件)

- (1) Kobayashi H, Mitani M, Minatogawa Y, Hayashi S, Nakamoto M, Shuto E, Nii Y, Sakai T. Extracts of *citrus Sudachi* peel attenuate body weight gain in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J. Med. Invest.* 64:20-23, 2017. 査読有
- (2) Sakai T, Ohhata M, Kusaka Y, Matsumoto M, Fujii M, Oda A, Nakamoto A, Taki T, Nakamoto M, Shuto E. Brazilian green propolis promotes weight loss and reduces fat accumulation in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Biol. Pharm. Bull.* 40:391-395, 2017. 査読有
- (3) Nishi T, Shuto E, Ogawa M, Ohya M, Nakanishi M, Masuda M, Katsumoto M, Yamanaka-Okumura H, Sakai T, Takeda E, Sakaue H, Taketani Y. Excessive dietary phosphorus intake impairs endothelial function in young healthy men: a time- and dose-dependent study. *J Med Invest.* 62:167-172, 2015. 査読有
- (4) Nakamoto A, Shuto E, Tsutsumi R, Nakamoto, Nii Y, Sakai T. Vitamin A Deficiency Impairs Induction of Oral Tolerance in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 61:147-153, 2015. 査読有
- (5) Sakai T, Taki T, Nakamoto A, Tazaki S, Arakawa M, Nakamoto M, Tsutsumi R, Shuto E. Dietary Ribonucleic Acid Suppresses Inflammation of Adipose Tissue and Improves Glucose Intolerance that is Mediated by Immune Cells in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat. *J Nutr Sci Vitaminol.* 61:73-78, 2015. 査読有
- (6) Hosaka T, Sasaga S, Yamasaka Y, Nii Y, Edazawa K, Tsutsumi R, Shuto E, Okahisa N, Iwata S, Tomotake H, Sakai T. Treatment with buckwheat bran extract prevents the elevation of serum triglyceride levels and fatty liver in KK-A(y) mice. *J Med Invest.* 61:345-352, 2014. 査読有
- (7) Tsutsumi R, Yoshida T, Nii Y, Okahisa N, Iwata S, Tsukayama M, Hashimoto R, Taniguchi Y, Sakaue H, Hosaka T, Shuto E, Sakai T. Sudachitin, a polymethoxy-lated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr Metab (Lond).* 11:32, 2014. 査読有

[学会発表](計 6 件)

- (1) 楊曉琳、中本真理子、酒井徹、首藤恵泉、篠原尚子、秦明子、南川貴子、田村綾子、市原多香子、桑村由美、船木真理 徳島県男性勤労者の大豆発酵食品摂取は血清 IL-6 濃度を定価させる 第 63 回日本栄養改善学会 2016 年 9 月 7-9 日 リンクステーションホール青森(青森県青森市)
- (2) 三谷麻実、中本真理子、首藤恵泉、酒井徹 スダチチンの免疫調節作用-卵白アルブミン免疫マウスモデルでの検討- 第 63 回日本栄養改善学会 2016 年 9 月 7-9 日 リンクステーションホール青森(青森県青森市)
- (3) 國松真由香、首藤恵泉、三谷麻実、中本真理子、酒井徹 食餌誘導性肥満マウスにおけるエクオールエウの効果 第 70 回日本栄養食糧学会 2016 年 5 月 13-15 日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

- (4) 楊曉琳、中本真理子、酒井徹、首藤恵泉、篠原尚子、秦明子、安芸菜奈子、小杉知里、四釜洋介、坂東由記子、南川貴子、市原多香子、田村綾子、桑村由美、船木真理 徳島県勤労者における大豆製品摂取と炎症マーカーとの関連 第70回日本栄養食糧学会 2016年5月13-15日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- (5) 中本真理子、酒井徹、首藤恵泉、秦明子、安芸菜奈子、小杉知里、四釜洋介、坂東由記子、南川貴子、市原多香子、田村綾子、桑村由美、船木真理 徳島県勤労者におけるイソフラボン摂取とアレルギー 第70回日本栄養食糧学会 2016年5月13-15日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- (6) 三谷麻実、中本真理子、首藤恵泉、酒井徹 スダチチンの免疫調節作用-卵白アルブミン免疫マウスモデルでの検討- 第70回日本栄養食糧学会 2016年5月13-15日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

首藤 恵泉 (SHUTO, Emi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：10512121