

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16233

研究課題名(和文) 新たな指標の導入を目指した抗肥満活性評価・解析システムの実現

研究課題名(英文) Realization of an anti-obesity activity evaluation and analysis system aimed at introduction of new indices

研究代表者

海野 雄加 (Unno, Yuka)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：30433212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は国民の健康において深刻な問題だが、エネルギー収支を基準とした個人の生活習慣の改善に委ねられており、抗肥満活性の統一的基準は十分に確立されていない。そこで、研究代表者は培養細胞の評価システムを個体レベルでの肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げることで、抗肥満活性の統一的基準の確立を目指している。

本研究課題では、南極付近などの野菜が少なく肉中心の食生活で過ごす人々の健康を守るオイルとして昔から重宝されてきたクリルオイルから抗肥満効果が期待出来る脂溶性成分を探索した結果、新規活性成分を複数見出すことに成功した。見出した活性成分の作用機序に関しては培養細胞を用いて現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：Our research aims to establish a unified standard of measuring anti-obesity activity by refining a cultured cell evaluation system into a system that can predict elimination of obesity at the individual level.

In this research project, we are screening for lipophilic ingredients that may have anti-obesity effects from Krill oil, which has long been used as an oil to protect the health of people who consume a meat-centered diet with few vegetables, such as those living in Antarctica. We have successfully discovered several functional ingredients. The underlying mechanism of action of the components found is still under analysis using cultured cells.

研究分野：食生活学、分子細胞生物学

キーワード：肥満 脂肪細胞 脂質 機能性食品 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

世界で肥満人口は増加の一途を辿っている。肥満からより深刻な動脈硬化症や糖尿病などの疾患に繋がることが多く、肥満人口の減少は医療費増加を抑制する重要な国家的課題として認識されるようになってきた。また、肥満は健康面だけでなく精神面でも「痩せること」が望まれるが、個人の努力では往々にして解消されない。そこで、肥満を改善するのに効果的な機能性食品や抗肥満薬の創出が期待されている。近年の分子細胞生物学の発展により、脂肪組織の理解が進んできている。脂肪細胞は余剰エネルギーを貯蔵するだけの細胞という理解から、様々な生理活性物質を分泌し、脂肪組織外の組織とも連携して生体の恒常性に貢献することがわかった。肥満モデルマウスの肥満の原因が脂肪細胞由来タンパク質の異常であるというエポックメイキングな研究報告(1994年)の後、肥満研究を行う研究者人口が一段と増加した。しかしながら、現状の抗肥満薬としては薬効が脂肪組織・脂肪細胞の脂肪蓄積に直接関わっていない食欲抑制や消化吸収抑制などで、分子細胞生物学的手法を用いた肥満研究が抗肥満薬の創出を通じて肥満人口の減少に貢献しているとは言い難い。その原因として、個体における肥満という現象と分子細胞生物学研究で使用される培養細胞レベルでの隔たりがあり、機能性食品創出や創薬の現場で抗肥満成分の探索手法が確立されていないことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

培養細胞の評価システムを、個体レベルでの肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げることが目的である。そのために本研究では、培養細胞の評価システムを用いて、クリルオイルから活性成分を探索した。クリルオイルからの成分の分画と構造決定は脇本敏幸教授(北海道大学)に依頼した。

クリルオイルとは、海中に生息するプランクトン南極オキアミから得られるオイルであり、昔から南極付近などの野菜が少なく肉中心の食生活で過ごす人々の健康を守るオイルとして重宝されてきた。最近の疫学研究や肥満モデル動物を用いた研究から、クリルオイルがヒトや肥満モデル動物において内臓脂肪減少やエネルギー代謝の亢進を促すことが報告されている。この作用はリン脂質結合型の3脂肪酸によるものと考えられているが、活性成分や作用機序は未だ解明されていない。そこで本研究課題ではクリルオイルを題材として活性成分の探索を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1)脂肪細胞への分化誘導

マウス胎児由来 3T3-L1 繊維芽細胞は、トリプシン処理により剥離し、35 mm 細胞培養ディッシュに 50,000 個で播種した。コンフルエントの状態から培養培地にて 2 日間、さらに分化誘導培地 (insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10% 非動化ウシ血清を含む DMEM 培地) にて 3 日間培養することで、細胞内に中性脂肪を貯めた成熟脂肪細胞へと分化させた。

### (2) Oil-Red O 染色

35 mm 細胞培養ディッシュにて分化させた脂肪細胞は終末分化の指標である脂肪滴蓄積を Oil-Red O 染色法により評価した。

### (3) AdipoRed 染色と脂肪蓄積量の定量

3T3-L1 細胞は 96 穴平底黒色プレートに 1 ウェル当たり 300 個の細胞数で播種をした。分化誘導培地にて脂肪細胞へと分化させ、中性脂肪特異的な蛍光色素 (AdipoRed) にて染色し、その蛍光強度はプレートリーダーにて測定し解析した。

### (4) 細胞免疫染色

3T3-L1 細胞は 8 ウェルチェンバーに播種し分化誘導培地にて脂肪細胞へと分化させた。抗 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) 抗体、または、抗 CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) 抗体は Alexa594 標識 2 次抗体と共に免疫染色し、免疫染色陽性細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。BODIPY で中性脂肪を染色した細胞は、共焦点顕微鏡 FV10i と高精細 3D 画像解析ソフトウェアを組み合わせることで、脂肪滴の数と体積を数値化し解析した。

### (5)リアルタイム PCR 解析

培養脂肪細胞から RNeasy (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現変化を解析した。

## 4. 研究成果

3T3-L1 前駆脂肪細胞はクリルオイル含有 DMEM 培地で培養することで、細胞接触阻害に関係なく処理後約 8 時間で脂肪滴を形成させた。その後クリルオイル含有培地で処理 6 日後には、通常の方法で分化させた脂肪細胞と比較して脂肪滴が微小ながら数が多いなどのユニークな特徴をした成熟脂肪細胞へと分化させた、その作用は濃度依存性があった(図 1・2)。

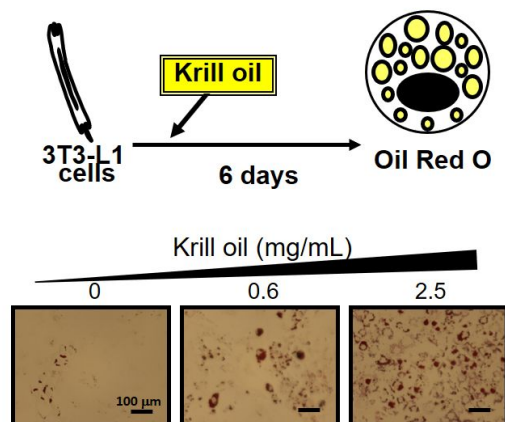


図1：クリルオイルによる脂肪分化

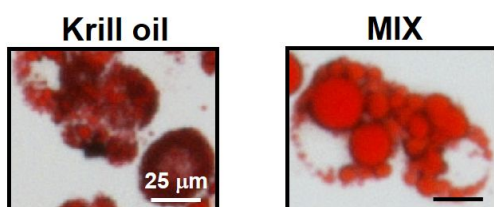


図2：微小な脂肪滴で構成された脂肪細胞

細胞免疫染色による解析より、クリルオイルは脂肪細胞分化の過程で PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  を発現させ核へと集積させた。この作用は、オリーブオイルや亜麻仁オイルなどでは見せず、つまり、クリルオイルに含まれる特有の成分によるものと考えた。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞へと分化を誘導する成分には、抗糖尿病薬であるチアゾリジン誘導体やインドメタシンが知られている。さらに、チアゾリジン誘導体は前駆脂肪細胞に働き褐色（ブラウニング）化を促すことが報告されている。そこでクリルオイルに含まれる分化誘導を促す成分が、抗肥満効果に繋がるものと推測し、成分の探索を行った。

クリルオイルからの成分の分画と構造決定は脇本教授（北海道大学）が行い、その分画を用いたスクリーニングの結果、3T3-L1 細胞の脂肪分化を誘導する脂溶性成分を複数見出し、その一つを脂質 AD-1 と名付けた。脂質 AD-1 で分化した脂肪細胞は微小な脂肪滴を多く含んでいた。また、通常分化誘導培地にて脂肪分化をさせる際に、脂質 AD-1 を同時に加えると、分化した脂肪細胞の数は増大するが、細胞に蓄積される中性脂肪量は顕著に減少した。つまり、脂質 AD-1 による褐色（ブラウニング）化が期待できると考えた。現在、脂質 AD-1 による遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法により解析している。脂質 AD-1 によるその他の作用機序は、科学研究費補助金（2017 年度より基盤研究(C)）の研究課題「脂溶性食品成分によるミトコンドリア機能覚醒と抗肥満効果の解明」におい

て継続して解析中である。脂質 AD-1 を‘たき台’として、試験管内で脂肪細胞に影響を与える食品成分が個体の肥満を抑制する効果があるかを検証する意義は、機能性食品や抗肥満薬創製の新たな道筋を開拓することにある。脂質 AD-1 の発見は、肥満における学術研究の新たな切り口による進展だけでなく、学術研究の枠を超えた新機能性食品創製へと発展できると期待したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Unno Y, Sato Y, Nishida S, Nakano A, Nakano R, Ubagai T, Ono Y. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide influences adipokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mediators Inflamm.* (2017) in press  
査読有り

Sato Y, Unno Y, Kawakami S, Ubagai T, Ono Y. Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *J. Med. Microbiol.* 66, 203-212, (2017)  
査読有り

DOI: 10.1099/jmm.0.000394.

〔学会発表〕(計 8 件)

海野雄加、永川茂、佐藤義則、鴨志田剛、西田智、上田たかね、祖母井庸之、斧康雄、Immunonutrition としての各種不飽和脂肪酸の好中球機能に及ぼす影響、第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会 第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、2017 年 4 月 8 日（新宿・東京）

海野雄加、山本由奈、高槻修人、矢澤一良、脇本敏幸、斧康雄、クリルオイル由来脂溶性成分による抗肥満効果の解明、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日（仙台・宮城）

海野雄加、佐藤義則、永川茂、鴨志田剛、西田智、上田たかね、祖母井庸之、斧康雄、LPS は脂肪細胞とマクロファージの共培養系で MIP2 産生を促進する、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19-20 日（仙台・宮城）

海野雄加、脇本敏幸、矢澤一良、斧康雄、Krill oil は 3T3-L1 前駆脂肪細胞に微小な脂肪滴を形成する、第 21 回アディポサイエンス・シンポジウム - 日本肥満学会、2016 年 8 月 20 日（豊中・大阪）

**Unno Y**, Akuta T, Ida T, Sawa T, Ono Y, Akaike T, The function of 8-nitroguanosine as a unique signal molecule via induction of HO-1 expression in 3T3-L1 adipocytes, The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan / The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide  
2016年5月20-22日(仙台・宮城)

**海野雄加**、佐藤義則、西田智、中野竜一、中野章代、永川茂、上田たかね、鴨志田剛、祖母井庸之、斧康雄、アディポカイン発現に対する多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* 由来リポ多糖の影響、  
第90回日本感染症学会総会・学術講演会  
2016年4月15-16日(仙台・宮城)

**海野雄加**、佐藤義則、西田智、中野竜一、中野章代、永川茂、上田たかね、鴨志田剛、祖母井庸之、斧康雄、脂肪細胞のアディポカイン発現に対するグラム陰性桿菌由来リポ多糖の影響  
第89回日本細菌学会総会  
2016年3月28日(大阪・大阪)

**海野雄加**、佐藤義則、西田智、中野竜一、中野章代、永川茂、上田たかね、鴨志田剛、祖母井庸之、斧康雄、アディポカイン発現に対する多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* 由来リポ多糖の影響  
第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会  
2015年10月23日(札幌・北海道)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

**海野 雄加 (UNNO YUKA)**

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：30433212