

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18949

研究課題名(和文) 免疫細胞の機能制御を標的とした食品因子の肥満関連疾患に対する総合的有用性評価

研究課題名(英文) Usefulness evaluation of food factors against obesity-related diseases via regulating immune cells functions.

研究代表者

吉田 裕樹 (Yoshida, Hiroki)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：90469411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、身近な食品因子が免疫細胞の機能制御を介して肥満関連疾患を予防・改善するか解析した。その結果、柑橘類フラボノイドのナリンゲニンは、高脂肪食誘導性肥満マウスにおいて、マクロファージ、CD8(+) T細胞、B細胞、好中球の脂肪組織への浸潤を抑制した。次に、免疫細胞機能に影響を与えるサイトカイン類の脂肪組織における発現変動を検証したところ、ナリンゲニンは、MCP-1、MCP-3、IL-6の発現量を抑制した。さらに、柑橘類フラボノイドのヘスペリジン製剤を用いて同様の実験を行ったところ、ヘスペリジンは、高脂肪食誘導性の脂肪組織へのマクロファージ浸潤を抑制した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the preventive and improvement effects of familiar food factors against obesity-related diseases via regulating immune cells functions. Naringenin, a citrus flavonoid, suppressed the infiltration of macrophages, CD8 (+) T cells, B cells and neutrophils into adipose tissue in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Naringenin also suppressed MCP-1, MCP-3 and IL-6 expression in adipose tissue. These molecules are cytokines that influence immune cells functions. In addition, we made clear that hesperidin preparation, another citrus flavonoid, suppressed macrophages infiltration into adipose tissue in HFD-induced obese mice.

研究分野：生化学、分子細胞生物学、医療薬科学

キーワード：肥満 免疫細胞 フラボノイド ナリンゲニン ヘスペリジン 食品 予防医療 セルフメディケーション

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 社会的背景

近年本邦では、肥満関連疾患である糖尿病などの生活習慣病が増加しており、国民医療費の増大と相まって、大きな社会問題となっている。したがって、これら疾患の予防法や改善法を開発することは重要である。

### (2) 肥満関連疾患の発症メカニズム

現在、肥満関連疾患は、全身の慢性炎症性疾患であると考えられている。肥満の内臓脂肪組織には、マクロファージなどの炎症性免疫細胞が浸潤し、脂肪細胞と免疫細胞の相互作用により、脂肪組織から大量の炎症性サイトカイン（アディポカイン）が分泌される。分泌された炎症性物質は、血流によって全身を巡り、個々の臓器や血管に影響を与え、最終的には糖尿病などの疾患の発症につながる。このような疾患発症メカニズムを鑑みた時、肥満初期の脂肪組織における免疫細胞機能を制御することは、疾患の予防法として有意であると考えられる。

### (3) 食品因子の機能性評価

我々の身近に存在するポリフェノール類などの食品因子は、抗酸化・抗炎症作用など多彩な薬理作用をもつことが示されており、生活習慣病の予防・改善への応用が期待されている。また、本邦で社会問題となっている生活習慣病患者の増加に対して、セルフメディケーションなどの予防医療が国家レベルで推進されており、この動きに合わせて、国民がサプリメントやハーブなどの健康食品や機能性食品を摂取する機会が増えている。しかしながら、これらの製品は利便性が高い反面、科学的な有効性や安全性に関する情報が乏しい現状にある。

我々はこれまでに、柑橘類フラボノイドによる脂肪細胞機能に対する影響を解析してきた。その結果、柑橘類フラボノイドのナリンゲニンが、脂肪細胞からの遊離脂肪酸の分泌抑制、脂肪組織・細胞における TLR2 発現量抑制などを介して、細胞組織・細胞の炎症を抑え、糖尿病病態（高血糖、インスリン抵抗性など）を予防することを明らかにした。また、ナリンゲニンは、肥満初期において、高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織へのマクロファージ浸潤を抑制することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

肥満の脂肪組織には、マクロファージだけでなく、他の炎症性免疫細胞も浸潤することが知られている。そこで、本研究では、高脂肪食誘導性肥満マウスに柑橘類フラボノイドを投与して、脂肪組織中の各種免疫細胞の量的変動を測定し、その作用機構を解明することを目的とした。本研究を通して、食品因子の有用性に関する科学的エビデンスの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪組織への免疫細胞浸潤の解析

C57BL/6J マウス(8週齢、雄)を標準食群、高脂肪食群、高脂肪食+フラボノイド群に分け、2~11週間飼育した。高脂肪食+フラボノイド群には、柑橘類フラボノイドのナリンゲニンまたはヘスペリジンを投与した。投与期間終了後、精巣上体周囲脂肪組織を摘出した。摘出した脂肪組織は、細断した後、コラゲナーゼ処理を行い、遠心分離して免疫細胞が含まれる間質血管系画分(SVF)を得た。SVF細胞を各種免疫細胞(マクロファージ、CD4(+) T細胞、CD8(+) T細胞、B細胞、好中球、制御性 T細胞)の標識マーカーで染色した後、フローサイトメーターで免疫細胞数を測定した。

### (2) 脂肪組織のサイトカイン発現量の解析

マウスから摘出した精巣上体周囲脂肪組織を細断後、ホモジナイズし、RNA抽出試薬でTotal RNAを得た。その後、逆転写反応によりcDNAを合成し、引き続きリアルタイムPCRを行って各種サイトカイン類(MCP-1、MCP-3、Mip-1a、Mip-2、IL-6、TNF-aなど)の発現量を測定した。

### (3) 経口グルコース負荷試験(OGTT)およびインスリン負荷試験(ITT)

OGTTでは、空腹時血糖値を測定した後、ブドウ糖液を経口投与し、その後2時間まで血糖値を経時的に測定した。一方、ITTでは、試験前血糖値を測定した後、インスリンを腹腔内投与し、その後2時間まで血糖値を経時的に測定した。

### (4) 脂肪細胞(培養細胞)のサイトカイン発現量の解析

3T3-L1脂肪前駆細胞を常法の分化誘導剤を用いて成熟脂肪細胞に分化させた。成熟脂肪細胞にフラボノイドを添加した後、RNA抽出、逆転写反応、リアルタイムPCRを行い、各種サイトカイン類の発現量を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ナリンゲニンによる脂肪組織への免疫細胞浸潤に対する影響

マウス脂肪組織への各種免疫細胞の浸潤に対するナリンゲニンの効果を検証するために、フローサイトメトリーを行った。その結果、標準食と比較して、高脂肪食の摂取は、脂肪組織へのマクロファージ、CD8(+) T細胞、B細胞、好中球の浸潤を増加させた。一方、CD4(+) T細胞、制御性 T細胞の数は減少した。ナリンゲニンの投与は、高脂肪食誘導性のマクロファージ、CD8(+) T細胞、B細胞、好中球の浸潤を抑制し、CD4(+) T細胞と制御性 T細胞の減少を回復させた(表1)。

免疫細胞	HFD	HFD+Nar
マクロファージ		
CD4(+) T細胞		
CD8(+) T細胞		
B細胞		
好中球		
制御性T細胞		

表1. 脂肪組織における免疫細胞の量的変動 (HFD: 高脂肪食(標準食群に対する変動), HFD+Nar: 高脂肪食+ナリンゲニン群(高脂肪食群に対する変動))

## (2) ナリンゲニンによる脂肪組織・細胞のサイトカイン発現量に対する影響

マウス脂肪組織において、免疫細胞の機能制御に關与する各種サイトカインの発現量変動を測定するためにリアルタイムPCRを行った。その結果、高脂肪食の摂取は、MCP-1、MCP-3、IL-6の発現量を増加させた。ナリンゲニンの投与は、これらのサイトカイン発現量増加を抑制した。また、3T3-L1成熟脂肪細胞にナリンゲニンを添加してサイトカイン発現量を確認したところ、同様の結果が得られた。

## (3) ヘスペリジン製剤による脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対する影響

一般にも市販されているヘスペリジン製剤の脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対する影響を測定したところ、ヘスペリジン製剤は、高脂肪食誘導性のマクロファージ浸潤を抑制した。また、脂肪組織中のMCP-1発現量も抑制されることを確認した。

## (4) ヘスペリジン製剤による糖尿病病態に対する影響

ヘスペリジン製剤の糖尿病病態(高血糖、インスリン抵抗性)に対する効果を確認するために、マウスを用いてOGTTおよびITTを行った。その結果、ヘスペリジン製剤の投与は、グルコース負荷後の過血糖状態およびインスリン抵抗性の改善が確認された。

### <引用文献>

- Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, Kai H. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF-alpha in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 9;394(3): 728-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.060.
- Yoshida H, Watanabe W, Oomagari H, Tsuruta E, Shida M, Kurokawa M. Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2013 Jul;24(7):1276-84. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.
- Yoshida H, Watanabe W, Ishida A,

Watanabe W, Narumi K, Atsumi T, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Nov 7;454(1):95-101. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.038.

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Yoshida H, Tshako R, Atsumi T, Narumi K, Watanabe W, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin interferes with the anti-diabetic actions of pioglitazone via pharmacodynamic interactions. *J Nat Med.* 2017 Apr;71(2):442-448. doi: 10.1007/s11418-016-1063-4.

[学会発表](計 9件)

吉田裕樹, 津波古梨花, 松田直也, 出山由貴, 井上美菜, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: 高脂肪食負荷マウスにおけるインスリン抵抗性および脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対する糖転移ヘスペリジンの作用, 日本薬学会第138年会, 2018.3.25-28, 金沢.

吉田裕樹, 津波古梨花, 松田直也, 出山由貴, 井上美菜, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: 高脂肪食負荷マウスにおける肥満関連病態に対する糖転移ヘスペリジンの影響, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.12.6-9, 神戸.

津波古梨花, 吉田裕樹, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: 高脂肪食誘導性肥満初期におけるマウス脂肪組織への免疫細胞浸潤に対するナリンゲニンの影響, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.12.6-9, 神戸.

吉田裕樹, 津波古梨花, 松田直也, 出山由貴, 井上美菜, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: 高脂肪食誘導性肥満マウスのインスリン抵抗性およびマクロファージ浸潤に対する糖転移ヘスペリジンの影響, 第34回和漢医薬学会学術大会, 2017.8.26-27, 福岡.

津波古梨花, 吉田裕樹, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: 高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織への免疫細胞浸潤に対するナリンゲニンの影響, 日本薬学会第137年会, 2017.3.24-27, 仙台.

津波古梨花, 吉田裕樹, 渥美聡孝, 鳴海恵子, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: ナリンゲニンとピオグリタゾンの食品医薬品相互作用の解析, 第33回日本薬学会九州支部大会, 2016.12.3-4, 鹿児島.

吉田裕樹, 津波古梨花, 渥美聡孝, 鳴海恵子, 渡辺渡, 杉田千泰, 黒川昌彦: ピオグリタゾンの薬効に対するナリンゲニンの影響とその機構解析, 日本薬学会第136年会, 2016.3.26-29, 横浜.

吉田裕樹、渥美聡孝、鳴海恵子、津波古梨花、渡辺渡、杉田千泰、黒川昌彦：柑橘類フラボノイドのナリンゲニンと糖尿病治療薬ピオグリタゾンの相互作用解析、第32回日本薬学会九州支部大会、2015.11.28-29、延岡。

吉田裕樹：脂肪細胞・組織の機能制御を介した柑橘類フラボノイドの肥満関連疾患に対する有用性評価、第32回和漢医薬学会学術大会、2015.8.22-23、富山。(招待講演)

〔記事〕

柑橘類フラボノイドのナリンゲニンに肥満関連疾患予防の可能性、Medical Tribune、2015.11.5. Vol.48, No.45.

〔アウトリーチ〕

吉田裕樹：高校生のための薬学基礎，宮崎県立高鍋高等学校 進路ガイダンス，2017.9.15，宮崎。

〔ホームページ〕

九州保健福祉大学 薬学部薬学科 生化学講座ホームページ：  
<http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)  
九州保健福祉大学・薬学部・講師  
研究者番号：90469411

(2) 研究協力者

黒川 昌彦 (KUROKAWA, Masahiko)  
九州保健福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：80186527

渡辺 渡 (WATANABE, Wataru)  
九州保健福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：50399218

杉田 千泰 (SUGITA, Chihiro)  
九州保健福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号：70632694