

令和元年6月25日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03039

研究課題名(和文)健康長寿社会の実現への寄与が期待される食品成分の機能解析と分子作用機構解明

研究課題名(英文) Examination of a function and molecular mechanism protecting lifestyle-related diseases by the food-derived components.

研究代表者

井上 裕康 (INOUE, Hiroyasu)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：40183743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生活習慣病予防効果が期待できるレスベラトロールについて核内受容体PPARを介した機能解析を行った。cAMP分解酵素阻害剤あるいは産生酵素活性化剤をレスベラトロールとともに摂取したマウスでは、レスベラトロールによるPPAR活性化が増強された。さらに、ヒト動脈硬化モデルのApoE欠損マウスを用いた解析から、レスベラトロールはPPAR依存的に抗動脈硬化作用を有する可能性を明らかにした。また、マウス新生仔由来の初代培養心筋細胞に、拍動を維持した状態でレスベラトロール刺激を行った解析から、レスベラトロールは心筋に作用し、PPAR依存的に心臓の機能維持に関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ポリフェノールをはじめとした、日常的に摂取できる様々な食品機能成分の生活習慣病予防効果が注目されている。本研究では、植物ポリフェノール・レスベラトロールの効果に注目し、核内受容体PPAR活性化という新しい評価法を用いて、その作用機序の解明を行った。本研究によって明らかとなったレスベラトロールの機能制御は、健康長寿社会を目指した新しい食生活の提案における科学的エビデンスとなる成果であり、食品機能成分を活用した健康維持、疾病予防、健康寿命延伸の実現に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the function of protecting lifestyle-related diseases of the food-derived components such as resveratrol via PPAR, a nuclear receptor. Intake of resveratrol in combination with rolipram, phosphodiesterase inhibitor, or forskolin, adenylate cyclase activator, enhanced decrease of plasma triglyceride and induction of hepatic PPAR-responsive gene expression in wild-type, but not PPARalpha-knockout (KO) mice. These results suggest that PPARalpha activation by resveratrol are enhanced by cAMP. We also found that long-term intake of resveratrol reduces lipid accumulation and macrophage infiltration in aorta of apoE KO, but not apoE/PPARalpha double KO mice, and that resveratrol PPARalpha-dependently attenuates the progression of atherosclerosis. Moreover, by the examination in primary cultured cardiomyocytes derived neonatal mice, we provide the possibility that resveratrol PPARalpha-dependently associates to homeostasis of the cardiac functions.

研究分野：食品機能化学

キーワード：PPAR レスベラトロール cAMP 動脈硬化症 心臓

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日常の食生活を通して、健康の維持および生活習慣病予防に努めることは、健康長寿社会を実現するために重要である。種々の食品機能成分による代謝改善効果については数多くの研究がなされているものの、それらの成分の摂取がどのような機構で、どのような分子が制御を受けて機能を発揮するのか、分子栄養学の視点で検証することは難しい。その理由の1つは食品機能成分の作用は、薬剤に比較して弱いことに起因している。このことは副作用が少ないという長所である一方で、効果が現れるまでに長い時間を必要とし、科学的検証を困難にしている。私達は核内受容体 PPAR 活性化を指標とした食品機能成分の新しい評価系を確立している。PPAR は脂質代謝、糖代謝、細胞増殖や分化等に関連して作用し、生活習慣病に対する薬剤標的たんぱく質として認知されている。私達は、様々な食品成分の中にも薬剤に比べて活性は弱いものの、PPAR を活性化する分子が存在するを見出している。これらの成分を低濃度で長期間摂取することで、生体内で弱く PPAR が活性化され脂質代謝等が改善されることが生活習慣病予防に繋がると考えている。

私達はこれまでに、食品機能成分としてレスベラトロールに注目し、以下のことを明らかにした。1) ある種の癌細胞等でレスベラトロールがプロスタグランジン合成の律速酵素・誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現を抑制すること(J. Biol. Chem. 1998)、2) COX-2の発現はPPAR $\gamma$ 活性化によってフィードバック制御されること(J. Biol. Chem. 2000)、3) 葡萄及び生薬・虎杖根に含まれるポリフェノールのレスベラトロールが、PPARの3つのサブタイプ $\alpha$ 、 $\beta/\delta$ 、 $\gamma$ を選択的に活性化し、 $\alpha$ 活性化に依存した脳保護効果をもつこと(Neurosci. Lett. 2003)、4) レスベラトロール4量体バチカノールCはSIRT1を活性化しないが、PPAR $\alpha$ 、 $\beta/\delta$ を活性化すること(Nutr. & Metab. 2010)、5) マウスにレスベラトロールを4週間摂取させると肝臓で脂質代謝関連遺伝子群の発現が誘導され、さらに40週以上レスベラトロールを添加することで、脂肪組織及び肝臓への脂肪蓄積が改善されること、6) レスベラトロールの摂取とともに運動を負荷すると筋肉での遺伝子発現誘導が見られること、7) ヒト培養血管内皮細胞で、低濃度レスベラトロールの1週間処理でeNOS, SIRT1, オートファジー関連タンパク質が誘導されること(Br. J. Nutr. 2013)、8) タイム油成分カルバクロール(J. Lipid Res. 2010)、レモングラス油成分シトラール(Biochim. Biophys. Acta 2010)、パラ油成分シトロネロールとゲラニオール(Biosci. Biotech. Biochem. 2011)も、レスベラトロールと同様にPPAR活性化とCOX-2発現抑制効果を持つことを報告してきた。

一方で、PPAR は主に肝臓で、 $\beta/\delta$ はマクロファージ、脂肪組織等で、 $\alpha$ は心臓、骨格筋、神経系など、様々な組織で発現しており、それぞれ代謝調節等の役割を担っている。生体でのレスベラトロールによるPPAR活性化を介した代謝改善効果は、栄養条件によって異なっており、臓器間での相互作用が重要であると考えられる。全身臓器・組織の協調的代謝調節の乱れが生活習慣病発症の一因になると考えられるが、食品機能成分の生活習慣病予防効果を解明する場合においても、全身の各臓器・組織での代謝の相違と相互作用の分子機序を解明することが重要と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、健康長寿社会の実現への寄与が期待される食品機能成分の作用機構を、PPAR活性化を土台にして、肝臓、脂肪組織、骨格筋、心臓、血管、マクロファージ等における組織間の相互作用の観点から、私達が長く機能解析の研究を続けているレスベラトロールについて、以下に示す解明を行う。

レスベラトロールは、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性化を介して、寿命延長や生活習慣病予防効果を持つことが報告され、世界的に注目されている。一方、レスベラトロールの新たな分子標的として、cAMPを分解するホスホジエステラーゼ(PDE)阻害が報告された。私達はこれまでに、レスベラトロールによるPPAR活性化が、PDE活性の阻害によるcAMP減少の抑制によって増強されることを培養細胞系で見出した。そこで、生体においてもcAMPを増加させた条件でPPAR活性化が増強されるのかを検討することとした。

一方で、レスベラトロールは、適度な赤ワイン消費と心血管疾患の発生率が負の相関性を示す、いわゆる「フレンチパラドックス」に関わる分子として注目されてきたが、心臓および血管への作用の分子機構は十分に明らかにされていない。そこで、レスベラトロール処理を行った心筋細胞や、レスベラトロール摂取させたマウスの血管を用いて作用を検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) まず、PDE阻害剤であるロリプラムを用い、cAMPの分解を抑制した条件で実験を行った。野生型マウス(雄性8~10週齢、C57BL/6J)またはPPAR欠損型マウスを各々4群に分け、普通食(AIN93G)、レスベラトロール0.04%(Res)、ロリプラム0.0005%(Ro)、レスベラトロール0.04%+ロリプラム0.0005%(Res+Ro)のいずれかを自由摂取させた。4週間後に血液と肝臓を採取し、血漿を用いて生化学パラメーターの解析を行った。肝臓からRNAを抽出して、定量RT-PCR法により遺伝子の発現変動を解析した。次に、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であ

ホルスコリン 0.002%を、ロリプラムの代わりに添加して、cAMP を増加させた条件で同様の検討を行った。

(2) ヒト動脈硬化症発症モデルの apoE 欠損マウス (8-9 週齢、雄性) を 2 群に分け、普通食もしくは 0.05%レスベラトロール食を自由摂取させた。3 か月後に血液および大動脈を採取し、血漿バイオマーカーの測定、大動脈の染色および遺伝子発現の解析を行った。さらに、PPAR 活性化の関与を調べるために、apoE/PPAR 二重欠損マウスを作製し、同様の条件で検討を行った。

(3) 生後 1-2 日齢の新生仔マウス (C57BL/6J または PPAR 欠損型) から心臓を採取し、コラゲナーゼ/トリプシン処理後に心筋細胞を回収して培養を開始した。細胞塊に心臓特有の拍動が確認できたら、拍動を維持した状態で 10 $\mu$ M レスベラトロールにより刺激した。7 日後に細胞を回収し、遺伝子発現変動を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウスでは、レスベラトロールをロリプラムとともに摂取させると、ロリプラム単独摂取群に比べ、血漿トリグリセリドの減少傾向が認められた。さらに、肝臓の PPAR 応答遺伝子の発現は、レスベラトロールとロリプラムを併用した群で有意な誘導が見られた。一方、欠損型ではそのような誘導が認められなかった。以上より、ロリプラムによって cAMP の分解を抑制した条件では、マウスにおいても、レスベラトロールによる PPAR 活性化が増強されることが明らかとなった。

次に、ホルスコリンを用いて同様の実験を行った。レスベラトロールとホルスコリン併用群において有意差はないものの、血漿トリグリセリドの減少の傾向が認められた。さらに、肝臓の PPAR 応答遺伝子の発現は、レスベラトロールとホルスコリンを併用した群で有意な誘導が、PPAR 依存的に認められた。以上より、ホルスコリンの併用によって、ロリプラムの結果と同様に、レスベラトロールによる PPAR 活性化が増強されることが示された。

以上のように、生体においても、培養細胞系と同様に、cAMP を介してレスベラトロールによる PPAR の活性化が増強されることが明らかとなった。これまでの結果を踏まえ、私達はレスベラトロールの作用について次のような仮説を考えている。レスベラトロールが PPAR を直接活性化すると、脂質代謝が亢進し、ATP の増加、そして cAMP の減少が生じる。その結果、PPAR 活性化が抑制するように調節される。一方でレスベラトロールは同時に、PDE 阻害活性を持っているため、cAMP の減少を抑制することで、PPAR を持続的に活性化すると考えられる。このような PPAR の活性化が、レスベラトロールを長期的に摂取した場合の効果に関与する分子機構であると考えられる。

(2) apoE 欠損マウスにおいて、レスベラトロール群では血漿中の総コレステロール濃度、non-HDL コレステロール濃度と動脈硬化指数 non-HDL/HDL 比は、いずれもコントロール群に対して有意に減少した。さらに大動脈の脂肪沈着を Oil red O 染色により比較したところ、大動脈全体およびヒトでの動脈硬化好発部位の弓部の相対的脂肪沈着面積が、レスベラトロール群で有意に低値であった。大動脈起始部切片の HE および Oil red O 染色では、コントロール群で血管壁の肥厚と肥厚部分への脂肪沈着が観察されたが、レスベラトロール群では抑制傾向が認められた。さらに、マクロファージ特異的抗体 Mac-2 の免疫組織染色によって、レスベラトロール群で血管壁の肥厚および脂肪沈着部分へのマクロファージ浸潤の抑制が観察された。一方、ApoE/PPAR 二重欠損マウスでは、このようなレスベラトロールの効果は認められなかった。また、レスベラトロール群では血管の弛緩に関わる内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の遺伝子発現が、PPAR 依存的に誘導された。以上より、レスベラトロールは動脈硬化の進展を抑制し、その効果は PPAR 依存的である可能性が示唆された。

(3) 心臓特有の拍動を維持した状態で、レスベラトロールによる刺激を行うことができた。野生型マウス新生仔由来の初代培養心筋細胞では、脂質代謝に関連する PPAR 応答遺伝子等の有意な発現誘導が認められた。さらに、心筋のオートファジー、活性酸素消去に関わる遺伝子の発現誘導が認められた。一方、PPAR 欠損マウス新生仔由来の心筋細胞では、多くの遺伝子でこのような変化は観察されなかった。以上より、レスベラトロールは心臓に作用し、上記遺伝子の発現を誘導することで心臓の機能維持に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

中田理恵子, 井上裕康. レスベラトロール研究の進展. 生化学 90, 529-532 (2018)

山上小百合, 中田理恵子, 有沢玲, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 井上裕康. レスベラトロールの心血管系に対する効果とその作用機構. 脂質生化学研究 59, 54-56 (2017)

〔学会発表〕(計 17 件)

山上小百合, 堀徳江, 本郷翔子, 井上裕康, 中田理恵子. 心血管系機能に対するレスベラトロール摂取の効果. 日本家政学会第 71 回大会 (2019 年)

多森由紀, 中田理恵子, 龍田七星, 本郷翔子, 井上裕康. cAMP を介したレスベラトロールによる PPAR 活性化. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会 (2019 年)

堀徳江, 中田理恵子, 山上小百合, 多森由紀, 萩成美, 本郷翔子, 井上裕康. マウス由来初代培養心筋細胞に対するレスベラトロールの効果と PPAR 活性化の関与. 第 91 回日本生化学会大会 (2018 年)

中田理恵子, 内藤由莉, 木村素子, 本郷翔子, 井上裕康. 運動とレスベラトロールによる骨格筋代謝改善効果. 第 91 回日本生化学会大会 (2018 年)

井上裕康, 堀徳江, 中田理恵子. マウス由来初代培養心筋細胞に対するレスベラトロールの効果. Food Congress 2018 (2018 年)

中田理恵子, 内藤由莉, 本郷翔子, 井上裕康. レスベラトロールと運動による骨格筋代謝改善効果. Food Congress 2018 (2018 年)

堀徳江, 山上小百合, 本郷翔子, 中田理恵子, 井上裕康. マウス由来培養心筋細胞に対するレスベラトロールの効果. 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 (2018 年)

中田理恵子, 山上小百合, 有沢玲, 堀徳江, 本郷翔子, 井上裕康. レスベラトロールの心血管系に対する効果と PPAR 活性化の関与. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)

井上裕康, 中田理恵子. 身体機能維持効果が期待できる食用植物由来成分の機能性評価. 第 5 回奈良まほろば産学官連携懇話会 (2017 年) 招待講演

山上小百合, 中田理恵子, 有沢玲, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 井上裕康. レスベラトロールの心血管系に対する効果とその作用機構. 第 59 回脂質生化学会 (2017 年)

龍田七星, 中田理恵子, 川西彩代, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 井上裕康. レスベラトロールによる PPAR 活性化と cAMP の関与. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 (2017 年)

山上小百合, 中田理恵子, 有沢玲, 本郷翔子, 井上裕康. レスベラトロールによる抗動脈硬化作用と PPAR 活性化の関与. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 (2017 年)

中田理恵子, 山上小百合, 古田美咲, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 矢内隆章, 山本玲子, 高田良二, 井上裕康. 動脈硬化モデルマウスを用いたレスベラトロールの血管系への効果の検討. 日本ビタミン学会第 68 回大会 (2016 年)

山上小百合, 中田理恵子, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 井上裕康. 動脈硬化症モデルマウスにおけるレスベラトロール摂取の効果. 日本家政学会第 68 回大会 (2016 年)

中田理恵子, 本郷翔子, 山上小百合, 古田美咲, 滝澤祥恵, 井上裕康. 食品成分と運動による骨格筋代謝改善効果と作用機構. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年 5 月 武庫川女子大学) 招待講演

山上小百合, 中田理恵子, 伊藤有里加, 本郷翔子, 滝澤祥恵, 矢内隆章, 上原琢磨, 山本玲子, 高田良二, 井上裕康. ApoE 欠損マウスを用いたレスベラトロールによる抗動脈硬化作用の検討. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年)

滝澤祥恵, 中田理恵子, 本郷翔子, 山上小百合, 古田美咲, 井上裕康. レスベラトロールによる cAMP を介する PPAR 活性化のフィードフォワード制御. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年)

〔図書〕(計 1 件)

中田理恵子, 井上裕康. 建帛社, 非栄養素の分子栄養学. 2017. 244(184-194).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中田 理恵子

ローマ字氏名: NAKATA, rieko

所属研究機関名: 奈良女子大学

部局名：生活環境科学系

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90198119

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。