

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11753

研究課題名(和文) -トコフェロールの脂肪組織に対する抗炎症効果とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Anti-inflammatory effects of delta-tocopherol on mouse adipocytes and adipose tissues

研究代表者

清瀬 千佳子 (Kiyose, Chikako)

神奈川工科大学・健康医療科学部・教授

研究者番号：50272745

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)：ビタミンE同族体に脂肪組織の炎症誘導を抑制する事が出来るかどうかについて検討を行った。その結果、脂肪細胞を使った研究では、炎症誘導した脂肪細胞がビタミンE、特に -トコフェロールを添加する事で炎症性サイトカインの遺伝子発現を有意に低下させた事を明らかにした。そこで、ラットにビタミンE同族体を摂取させた後、リポポリ多糖を腹腔内に投与して炎症を誘導した所、ラットの腎臓周囲脂肪のIL-1の遺伝子発現を -トコフェロールを摂取する事で抑制する傾向が見られた。以上の結果より、 -トコフェロールは脂肪組織の炎症誘導を阻害できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人において罹患率が右肩上がりの生活習慣病の発症を抑制する事は非常に重大な課題である。その発症には肥満から来る肥大化した脂肪組織が炎症誘導される事が明らかになっており、その炎症誘導を抑制する事が生活習慣病の発症予防には重要である。ビタミンEはすでにサプリメントとして広く利用されているが、 -トコフェロールのサプリメントはほとんどなく、さらに抗炎症作用の効果をうたったサプリメントはない。今回、in vivoの途中まで -トコフェロールの効果を論証できたので、さらに検討を続ける事で抗炎症効果をもつビタミンEサプリメントが開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study aim was to evaluate the anti-inflammatory effect of vitamin E analogs on mice adipocytes and rat adipose tissues induced inflammation. Consequently, it was found that -tocopherol inhibited increased gene expression of the inflammatory cytokines, IL-1, IL-6, and iNOS in co-cultured 3T3-L1 cells and RAW264.7 cells. Subsequently, I used male SD strain rats, which were divided into four groups: high-fat and high-sucrose diet (C), high-fat and high-sucrose diet +LPS intraperitoneal administration (LPS), LPS+ -tocopherol (800mg/kg diet), and LPS+ -tocopherol (800mg/kg diet) groups. The rats were fed for 4 weeks. After 4 weeks, each rat was administered LPS (1mg/kg body weight) intraperitoneally. Consequently, it was found that -tocopherol tended to inhibit increased gene expression of IL-1 in perirenal adipose tissues of rats. Therefore, these results suggest that -tocopherol has an anti-inflammatory effect on adipose tissues induced inflammation by LPS.

研究分野：食品機能学、分子栄養学

キーワード：ビタミンE -トコフェロール 脂肪組織 抗炎症作用 抗肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満とは、体内に白色脂肪が過剰に蓄積した状態を指し、疾病を意味するものではない。しかし、BMI と総死亡リスクの間には U 字型の相関が見られ、BMI が 23~25 の範囲が最もリスクが低く、痩せ過ぎ、もしくは太り過ぎでは総死亡リスクが高まると報告されている。実際には、肥満が 2 型糖尿病や脂質異常症、心疾患のみならず、各種ガンの発症に関連していると示唆されている。従って、肥満を改善する事は、それに起因する様々な生活習慣病の発症を抑える事が出来る可能性が推察できる。では、なぜ肥満が様々な生活習慣病を引き起こすのだろうか。1 つの作用機序だけでは説明できないが、少なくとも肥満状態における慢性的な炎症反応の誘起がその引き金になっていると推察されている。肥満状態では中性脂肪が脂肪細胞に蓄積する事で、サイトカインや遊離脂肪酸等のアディポサイトカインが産生され、血中へ分泌し、それらが様々組織に輸送される事で、インスリン抵抗性や脂肪肝等の生活習慣病の引き金になると考えられている。(図 1)。従って、申請者は脂肪細胞の炎症誘導を抑制する事が生活習慣病発症予防につながるのではないかと考えた。

ビタミン E は脂溶性ビタミンの一種で、クロマン環に飽和型のフィチル側鎖が結合した

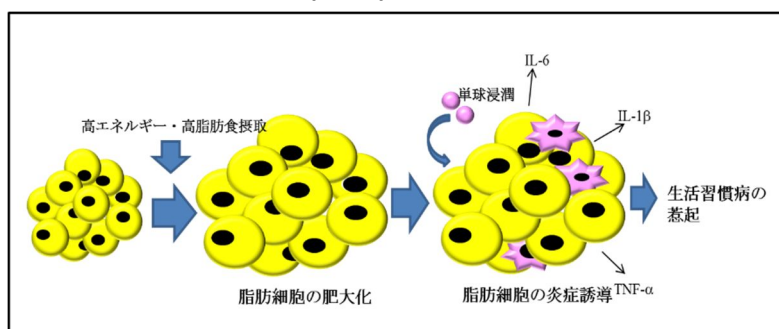


図 1. 肥満からの生活習慣病の惹起

トコフェロール類と不飽和型が結合したトコトリエノール類に大別され、さらにクロマン環のメチル基の位置と数の違いで α 、 β 、 γ 、 δ の 4 つに分かれ、合計 8 種類が存在する。ビタミン E は抗酸化効果を持つ事が教科書的な作用であるが、他の機能についても研究が進んでいる。特に δ -トコフェロールについては体内への分布が多い事から様々機能が報告されているが、他の同族体についてはまだ研究の余地がある。特に α -トコフェロールについてはほとんど研究が進んでいない。申請者は α -トコフェロールの機能性に着目し、検討を進めてきた。その結果、 δ -トコフェロールが主に脂肪細胞の分化等に関わるペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) のコアクチベーターである PGC-1 α の発現を増大させる事で、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞様へと導くことを明らかにした(Tanaka-Yachi, R., Kiyose, C., et al. *B. B. R. C.*, 506, 53-59, 2018)。さらに、PGC-1 α の増大は抗炎症効果へと導くという報告(Waldman, M., et.al., *Cardiovasc.Diabetol.*, 17, 111-122, 2018)と合わせると、 α -トコフェロールが脂肪細胞(脂肪組織)の炎症に対して抑制効果を持つのではないかと推察した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミン E、特に α -トコフェロールに脂肪組織の炎症誘導に対して抑制効果があるかどうかを検討する事であり、 α -トコフェロールと比較してどのように違うのか、さらにはどのようなメカニズムなのかについて論証する事である。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞を用いた炎症誘導モデルの構築ならびにビタミン E 同族体の効果について
脂肪組織に対して炎症誘導が惹起されるような状態のモデル細胞が必要である事から、

背景で述べたようなメカニズムで炎症誘導が惹起するモデル細胞を構築する事にした。使用した細胞はマウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞とマウスマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞を用い、二つの細胞を接触培養(共培養)させる事で炎症を誘導させる事にした。RAW264.7 細胞はマクロファージ細胞ではあるものの単独状態では炎症性サイトカインを分泌しない特徴を持つため、接触させる事で炎症誘導されれば、背景で述べたメカニズムに近いモデルになる。両細胞をそれぞれ立ち上げ、80%コンフルエントに達した時点で継代を行った。その後、3T3-L1 細胞は 12 穴プレートに 1 well あたり 1.0×10^5 個になるように播種したのち、インスリン、デキサメタゾン、IBMX にて 12 日間分化誘導を行った。分化終了後、RAW264.7 細胞を 1 well あたり 2×10^5 細胞になるように 3T3-L1 細胞の上に撒いて、12 時間共培養を行った。その後、細胞を回収し、RNA ならびにタンパク質を抽出後、各炎症性サイトカインを測定した。さらに、ビタミン E 同族体の効果については、 α -トコフェロールならびに γ -トコフェロールをそれぞれ dimethyl sulfoxide に溶解し、終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように分化誘導後に添加し、24 時間培養した。培地を変えた後、RAW264.7 細胞を添加し、共培養を行った。

(2) LPS 腹腔内投与マウスにおけるビタミン E 同族体摂取による抗炎症作用について

最終年度に、マウスを高脂肪・高シヨ糖食にて長期間(5 カ月以上)飼育する事で、食事バランスの偏りによって誘発される肥満からの脂肪組織の炎症誘導が惹起されると推察されていたことからその研究に取り組む予定であったが、コロナ禍により大学への入構が制限されていたため、今回はそれに代わるモデルを作製する事とし、短期間でも研究継続が可能な方法で行う事にした。今回は、高脂肪・高シヨ糖食を 1 ヶ月間摂取させ、肥満を誘導したのち、リポポリ多糖(LPS)を腹腔内に投与する事で、その刺激により脂肪組織が炎症誘導されるかどうかを確認すると同時に α -トコフェロール、 γ -トコフェロールを摂取させた場合、その炎症誘導を抑制できるかどうかについて検討を行う事にした。3 週齢 SD 系雄ラット 25 匹を 1 週間予備飼育後、体重に差が出ないように 5 群に分けた。高脂肪・高シヨ糖食(α -トコフェロールを $50\text{mg}/\text{kg}$ diet 添加)を与えた C 群($n=6$)、高脂肪・高シヨ糖食(γ -トコフェロールを $50\text{mg}/\text{kg}$ diet 添加)を与えて、LPS を腹腔内に投与する LPS 群($n=6$)、高脂肪・高シヨ糖食にさらに α -トコフェロールを $800\text{mg}/\text{kg}$ diet 添加し、LPS を投与する LPS+ 群($n=6$)と E-mixD (α -トコフェロールが 80%以上含有)を $800\text{mg}/\text{kg}$ diet 添加し、LPS を投与する LPS+ 群($n=6$)の 4 群にわけて、一カ月飼育した。飼育期間終了後、LPS をラット体重 1kg あたり 1mg 投与(C 群は生理的食塩水を投与)し、4 時間後にイソフルラン麻酔下にて解剖し、血漿ならびに各組織を採取した。

4 . 研究成果

(1) 脂肪細胞を用いた炎症誘導モデルの構築ならびにビタミン E 同族体の効果について

Fig.1 に各炎症性サイトカインおよびケモカインの mRNA 発現量を示した。その結果、IL-1 及び IL-6 は共培養を行う事でその発現量が有意に上昇した。また、ケモカインである MCP-1 の mRNA 発現量も有意に上昇した。さらに、iNOS の mRNA 発現量も有意に上昇し、今回用いた共培養の条件で、脂肪細胞に対して炎症誘導を起こせる事が明らかとなった。そこで、 α -トコフェロールならびに γ -トコフェロールを効果を見た所、炎症性サイトカインである IL-1 および IL-6 の mRNA 発現量は α -トコフェロールの添加で、共培養による炎症刺激に対して有意に抑制できる事が明らかとなった。この効果は γ -トコフェロールには見られなかった。一方、ケモカインである MCP-1 の mRNA に関しては、共培養によって有意に上昇したものの、2 つのビタミン E ともその発現上昇を抑制する事は出来なかった。しかし、iNOS に関しては α -トコフェロールも γ -トコフェロールともその発現量を有意に低下させた事から、 α -トコフェロール、

-トコフェロールとも抗炎症効果はあるものの、 α -トコフェロールの方が δ -トコフェロール

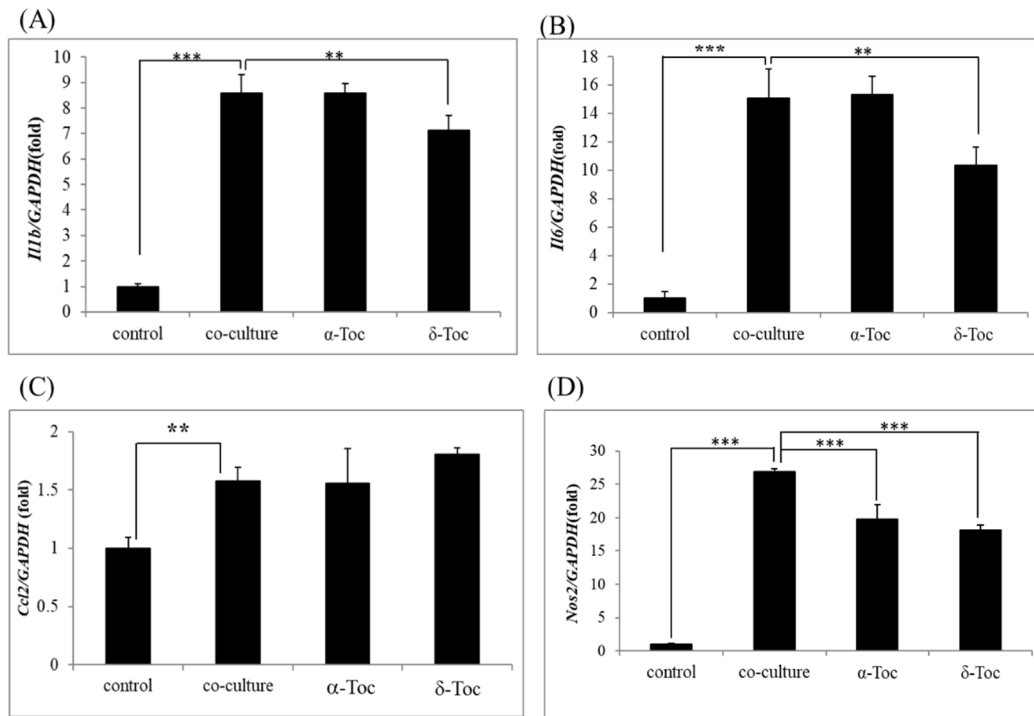


Fig.1 脂肪細胞とマクロファージ細胞との共培養系による炎症誘導とビタミン E 同族体の効果。(A) IL-1 の mRNA 発現量、(B) IL-6 の mRNA 遺伝子発現量、(C) MCP-1 の mRNA 遺伝子発現量、(D) iNOS の mRNA 遺伝子発現量。*; p<0.01, ***; p<0.001

よりも強い可能性が示唆された。そこで、LPS 刺激によるシグナル伝達経路の場合は炎症性サイトカインの遺伝子発現の転写因子となるものの 1 つの NF- κ B がある。そこで、今回の共培養条件で、NF- κ B のタンパク質発現量について検討を行った。その結果、共培養する事で、NF- κ B のタンパク質の発現量は有意に上昇したが、 α -トコフェロールならび δ -トコフェロール添加による抑制効果は見られなかった。以上の結果より、メカニズムの解明まではいかなかったものの、 α -トコフェロールは炎症誘導した脂肪細胞に対して抗炎症作用を発揮する事が明らかとなった。

ここまでの結果は下記に示す査読付き学術論文の一部としてすでに公開されている。

・C. Kiyose, H. Takeuchi, Y.Yabe, T. Nojima, M. Nagase, C. Takahashi-Muto, R. Tanaka-Yachi, Effect of α -tocopherol on mice adipose tissues and mice adipocytes induced inflammation. *J. Oleo Sci.*, 70, 1307-1315, 2021.

(2) LPS 腹腔内投与ラットにおけるビタミン E 同族体摂取による抗炎症作用について

ビタミン E 同族体、特に α -トコフェロールの抗炎症作用については in vitro で実証されたものの、in vivo での実証には至っていない。そこで、前もってビタミン E 同族体を摂取させておいたラットに LPS を投与する事で脂肪組織の炎症誘導が抑えられるか検討を行った。

Fig.3 にはラットの腎周囲脂肪中の IL-1 ならびに IL-6 の mRNA 遺伝子発現量について検討を行ったものである。IL-1 ならびに IL-6 とも C 群に比べて LPS 群で有意に増加し、LPS 腹腔内投与によって、脂肪組織が炎症誘導される事が明らかとなった。IL-6 の mRNA 発現量については α -トコフェロール及び δ -トコフェロールとも炎症を抑制する事が出来なかったが、IL-1 においては α -トコフェロールを摂取する事で抑制傾向が見られた。以上の結果より、 α -トコフェロールの摂取は脂肪組織に対して抗炎症効果を持つ可能性が示唆された。

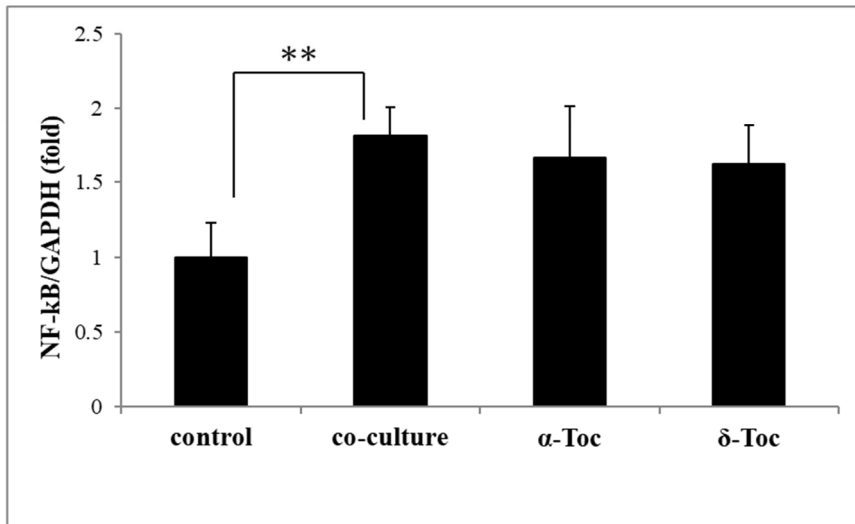
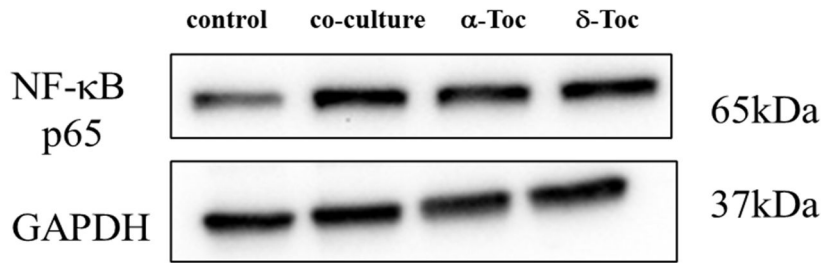


Fig.2 LPS 刺激の転写因子である NF- B のタンパク質発現量
 **; p<0.01

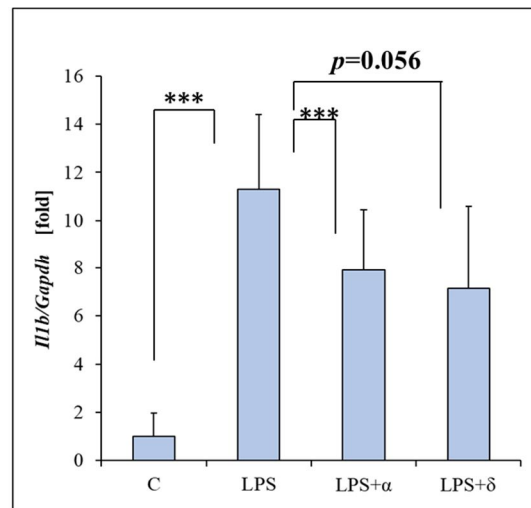
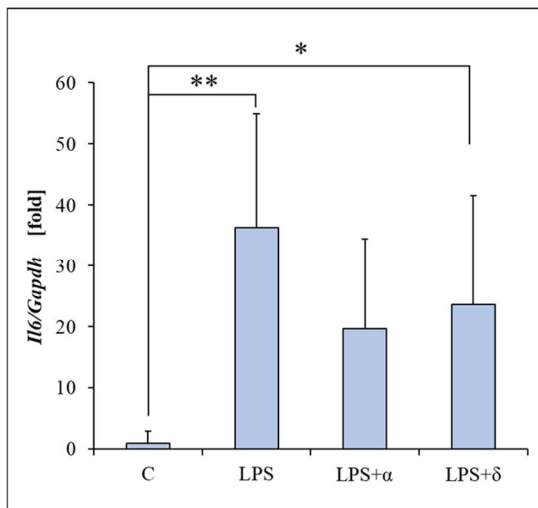


Fig.3 ラット腎周囲脂肪中の IL-6 ならびに IL-1 の mRNA 発現量
 *; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001

以上の結果より、ビタミン E 同族体の α-トコフェロールならびに δ-トコフェロールは共に抗炎症作用を有している事が明らかとなり、特に δ-トコフェロールの方が α-トコフェロールに比べて生体内の脂肪組織に対する抗炎症作用が強い可能性が示唆された。今後は δ-トコフェロールの摂取量や摂取期間を模索する事で有意な効果を見出したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 C. Kiyose, H. Takeuchi, Y. Yabe, T. Nojima, M. Nagase, C. Takahashi-Muto, R. Tanaka-Yachi	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of delta-tocopherol on mice adipose tissues and mice adipocytes induced inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 1307-1315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess21124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢部芳美、大津玲奈、永瀬摩奈、高橋知衣、田中理恵子、清瀬千佳子
2. 発表標題 炎症誘導したマクロファージ細胞に対するビタミンE同族体の効果
3. 学会等名 第59回日本油化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内悠、田中理恵子、永瀬摩奈、高橋知衣、清瀬千佳子
2. 発表標題 炎症誘導した成熟脂肪細胞に対するビタミンEの効果
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内悠、田中理恵子、永瀬摩奈、高橋知衣、清瀬千佳子
2. 発表標題 炎症誘導した成熟脂肪細胞のベージュ化に対するビタミンE同族体の効果
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神奈川工科大学 最新研究情報
https://www.kait.jp/tech_news/68.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------