

平成23年 4月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590241
 研究課題名（和文）アディポサイトカイン分泌を介した脂肪細胞の生理機能を改善する食物成分の解析
 研究課題名（英文）Studies of food ingredients which improve the physiological function of adipocyte through modulation of adipocytokine secretion
 研究代表者
 上嶋 繁（UESHIMA SHIGERU）
 近畿大学・農学部・教授
 研究者番号：30193791

研究成果の概要（和文）：生活習慣病発症に関わる肥満は脂肪細胞に大量の油滴が蓄積した状態であり、肥満は動脈硬化症進展の促進因子でもある。また、動脈硬化の進展には血管平滑筋細胞の内膜への遊走が関わっている。アントシアニンの cyanidin-3-glucoside (C3G) やある種の食品成分は脂肪細胞への油滴蓄積を抑制して脂肪細胞の肥大化を抑制するだけでなく、脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞の遊走を抑制して動脈硬化症の進展も抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Obesity is one of the reasons that cause the lifestyle disease which includes atherosclerosis. In obesity, adipocyte accumulates a large amount of oil in its cytoplasm. And the obesity is the exacerbation factor for atherosclerosis. Also, the migration of smooth muscle cells (SMC) into intima is involved in progression of atherosclerosis. A definite food ingredient such as cyanidine-3-glucoside (C3G) inhibited the accumulation of oil in adipocyte and suppressed the enlargement of adipocyte. Furthermore, the defined food ingredients inhibited the migration of SMC in the presence of adipocyte, suggesting that they might be inhibit the progression of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：脂肪細胞、血管平滑筋細胞、アディポサイトカイン、動脈硬化、アディポネクチン、PAI-1、C3G、遊走能

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い肥満傾向が高まり、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病が急激に増加している。肥満、すなわち脂肪細胞または脂肪組織の肥大化は動脈硬

化症の進展と密接な関係があると考えられていた。

アディポサイトカインは脂肪組織由来の分泌蛋白質の総称で、レプチン、アディポネクチンおよびプラスミノゲンアクチベ

ターインヒビター 1 (plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) などがある。動物性蛋白質 (カゼイン) と比較して大豆から抽出された蛋白質が皮下脂肪組織での PAI-1 遺伝子発現を抑制し、アディポネクチン遺伝子の発現および血中アディポネクチン濃度を上昇させたとの報告はあったが、他の食物成分によるアディポサイトカイン発現制御に関する報告は少なかった。一方、ある種のミネラル成分が培養血管内皮細胞からの PAI-1 分泌を抑制することは知られていた。

動脈硬化症の進展には血管平滑筋細胞の内膜への遊走とその増殖が関与しており、腫瘍細胞 (マウスメラノーマ細胞) の存在下における血管平滑筋細胞の増殖には線溶系因子の受容体が重要であることが報告されていた。

血管平滑筋細胞の遊走能は脂肪細胞から分泌される PAI-1 やアディポネクチンによって変化する。PAI-1 は細胞外基質のビトロネクチンと結合することによって血管平滑筋細胞の遊走能を促進し、アディポネクチンは血管平滑筋細胞内のシグナル伝達を介して血管平滑筋細胞の遊走能を抑制することが知られていた。また、動脈硬化症に続発する血栓症には線溶活性が重要な役割を担っていることも既に知られていた。

しかし、国内外を通じて脂肪細胞からのアディポサイトカインの分泌量を変化させて抗動脈硬化および抗血栓性に導く食物または食物成分の解析はほとんどなかった。動脈硬化症の進展にかかわる血管平滑筋細胞の増殖能および遊走能に対する脂肪細胞の作用や脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞の遊走能に及ぼす食物成分の影響についても不明な点が多かった。

2. 研究の目的

脂肪組織や脂肪細胞は単に脂肪を蓄積しているだけではなく、アディポネクチンや PAI-1 など種々の生理活性物質 (アディポサイトカイン) を分泌している。例えば、脂肪細胞における油滴蓄積量の増加にともなってアディポネクチン分泌量は低下して動脈硬化症を促進させるとともに、PAI-1 分泌量は高まる。PAI-1 は線溶活性を阻害して血栓形成傾向 (向血栓性) を引き起こし動脈硬化症や続発する血栓塞栓性疾患の進展を助長する。

このように、脂肪細胞が有する生理機能は分泌されるアディポサイトカインによって決定されるといっても過言ではない。そこで、本研究の目的はアディポサイトカインの分泌を介した脂肪細胞の生理的機能を改善する食物成分を明らかにすることにある。そして、食物成分による脂肪細胞の生物化学的変

化が、動脈硬化症の進展にかかわる血管平滑筋細胞の増殖能・遊走能や動脈硬化症に続発する血栓症の発症に対してどのような作用をおよぼすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の油滴蓄積におよぼす食物成分の影響

マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を 24well プレートの各 well は 0.045×10^5 個播種し、コンフルエントになるまで 10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。コンフルエント後さらに 2 日間培養し、分化誘導培地に交換して 2 日間培養し、3 日目に分化維持培地に交換した。

分化維持培地に容量%が 1%となるように cyanidin-3-glucoside (C3G、最終濃度 20 μ M) などの食物成分を加えておき、2 日ごとに培地交換を行った。以後、2 日おきに分化維持培地を交換しながら 8 日間培養を続け、経時的に分化細胞を Oil Red O で染色した。Oil Red O 染色後に細胞から抽出した色素液の波長 492nm における吸光度を測定し、油滴の蓄積量として評価した。

C3G 以外の食物成分として、脂肪細胞に対する作用については明らかにされていないモズク粘性成分とタケノコの水抽出液を用いた。

(2) 脂肪細胞存在下での血管平滑筋細胞の遊走能の検討

Double boyden chamber 法を応用して脂肪細胞存在下におけるマウス由来血管平滑筋細胞の遊走能を評価した。すなわち、分化 0 日目から分化 8 日目の脂肪細胞が存在する down chamber (24well プレートの各 well) に血管平滑筋細胞を播種した upper chamber を装着し、4 時間後に upper chamber の底面を構成するメンブレンの裏側に遊走してくる細胞数を顕微鏡下で計測した (図 1)。脂肪細胞は当初 0.045×10^5 個/well 播種し、血管平滑筋細胞は upper chamber に 0.3×10^5 個播種した。

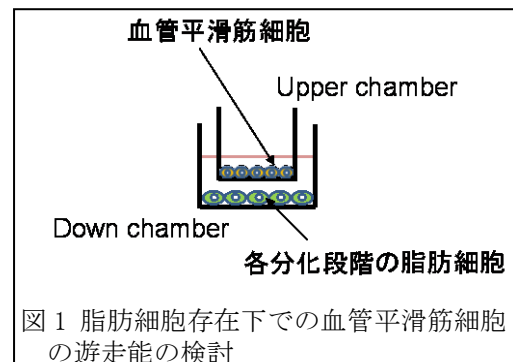


図 1 脂肪細胞存在下での血管平滑筋細胞の遊走能の検討

脂肪細胞存在下での血管平滑筋細胞の遊

走能におよぼす食物成分の影響は以下のようにして解析した。

まず、各種食物成分を 1%含む分化維持培地で down chamber 内の脂肪細胞を培養した。分化維持培地は 2 日毎に交換し、分化 2 日目、4 日目、6 日目および 8 日目にマウス由来血管平滑筋細胞を播種した upper chamber を各 well に装着して、4 時間後に upper chamber の底面を構成するメンブレンの裏側に遊走してくる細胞数を顕微鏡下で計測した。

(3) 脂肪細胞の培養液中アディポサイトカインの測定

血管平滑筋細胞共存下における脂肪細胞の培養実験系において、分化 8 日目の培養培地を回収した。そして、回収した培地中の活性型 PAI-1 量及びアディポネクチン量を ELISA kit を用いて定量した。活性型 PAI-1 の定量には Murine PAI-1 Activity Assay kit (Lot No. MPAIKT-910 Molecular innovation, USA) を用いた。アディポネクチンの定量には Mouse Adiponectin/Acrp30 (Lot No. 278969, R&D Systems, USA) を用い、それぞれの方法は、各 Kit 中のプロトコールに従った。

(4) 脂肪細胞の培養液で刺激した血管平滑筋細胞における extracellular signal regulation kinase-1/2 (ERK1/2) のリン酸化

血管平滑筋細胞の遊走能には ERK1/2 のリン酸化が関わっており、ERK1/2 のリン酸化(活性化)に伴って、血管平滑筋細胞の遊走が促進することが知られている。そこで、(2)の実験に似た条件下での血管平滑筋細胞内 ERK 蛋白質リン酸化シグナルをウエスタンブロット法により解析した。

24well プレートの各 well に 0.045×10^5 個の 3T3-L1 脂肪前駆細胞を播種し、コンフルエントになるまで 10% FBS を含む DMEM 培地で培養した。その後、分化誘導培地で 2 日間培養した後、1%の各種食物成分を含む分化維持培地で 2 日間毎、8 日間培養を行った。その後、各種食物成分入り分化維持培地で培地交換後、さらに、4 時間培養した。その培養液 500 μ l を 0.3×10^5 個の血管平滑筋細胞を播種した別の 24well プレートの well に添加した。そして 30 分後に培地を除去して Cell lysis buffer 100 μ l にて細胞を溶解し、リン酸化 ERK を解析するための Sample とした。

細胞溶解 sample を SDS-PAGE で展開した後、PVDF 膜に転写し、膜上の ERK とリン酸化 ERK を抗 ERK1 抗体(K-23 Santa Cruz, USA)と抗 p-ERK1/2 抗体(sc-16982 Santa Cruz, USA)、および二次抗体として HRP 標識抗 Rabbit IgG 抗体(Southern Biotech, USA)を用いて検出した。

(5) 脂肪細胞の培養液中線溶活性の測定

(1)の実験条件に従い、脂肪細胞の分化維持培地に容量%が 1%となるように各種食物成分を加えて 2 日ごとに培地交換を行い、以後、2 日おきに分化維持培地を交換しながら 8 日間培養を続けた。そして、8 日目の培養液中に含まれるプラスミノゲンアクチベーター (plasminogen activator; PA) 活性をフィブリンエンザイモグラフィにて検討した。

フィブリンエンザイモグラフィは SDS-PAGE とフィブリン平板法の原理を組み合わせた方法であり、PA 用物質の検出とその分子量を同時に評価することができる。すなわち、SDS-ポリアクリルアミドゲル中にはフィブリンとプラスミノゲンが含まれており、電気泳動を行うことによって試料中の PA がその分子量に応じて泳動されると、その部位で PA がプラスミノゲンをプラスミンに活性化し、その部位のフィブリンを溶解してフィブリン溶解バンドが現れる。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞の油滴蓄積におよぼす食物成分の影響

C3G を分化維持培地で培養したところ、日数の経過とともに油滴蓄積量の増加が認められた。C3G を分化維持培地に最終濃度 20 μ M、メタノール濃度 0.1%になるように加えたところ、3T3-L1 脂肪細胞の油滴蓄積量はメタノールのみを加えたコントロールと比較して分化 6 日目と 8 日目で有意に低下していた(図 2)。

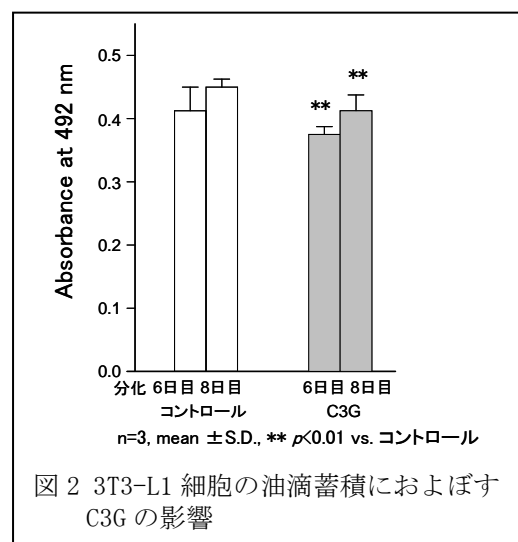


図 2 3T3-L1 細胞の油滴蓄積におよぼす C3G の影響

また、モズク粘性成分を分化維持培地に容量%が 1%となるように加えたところ、3T3-L1 脂肪細胞の油滴蓄積量は蒸留水のみを加えたコントロールと比較して分化 6 日目と 8 日目で有意に低下していた(図 3)。さらに、タ

ケノコ抽出液を分化維持培地に容量%が 1% となるように加えたところ、3T3-L1 脂肪細胞の油滴蓄積量は蒸留水のみを加えたコントロールと比較して分化 6 日目まで有意に低下していた (図 3)。

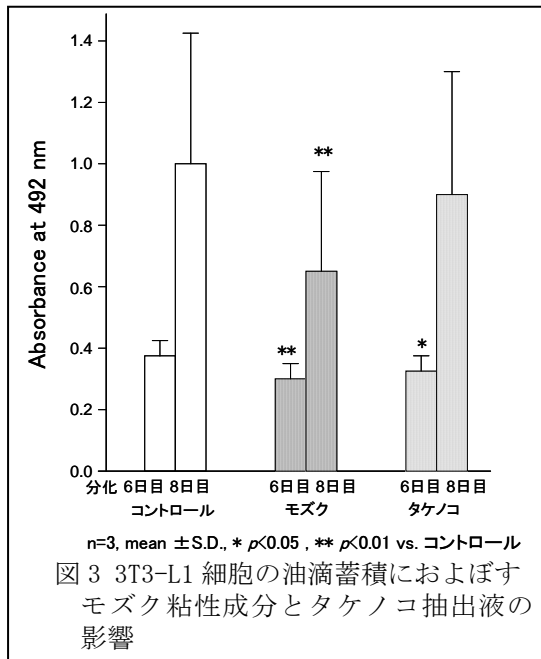


図 3 3T3-L1 細胞の油滴蓄積におよぼすモズク粘性成分とタケノコ抽出液の影響

(2) 脂肪細胞存在下での血管平滑筋細胞の遊走能の検討

脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞の遊走細胞数は、脂肪細胞非存在下における血管平滑筋細胞の遊走細胞数よりも増加していた。さらに、脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞の遊走細胞数は脂肪細胞の分化日数に依存して増加した。

C3G、モズクの粘性成分およびタケノコ抽出液を分化維持培地に添加して分化させた脂肪細胞 (分化 8 日目) 存在下における血管平滑筋細胞の遊走能は有意に低下していた (図 4)。

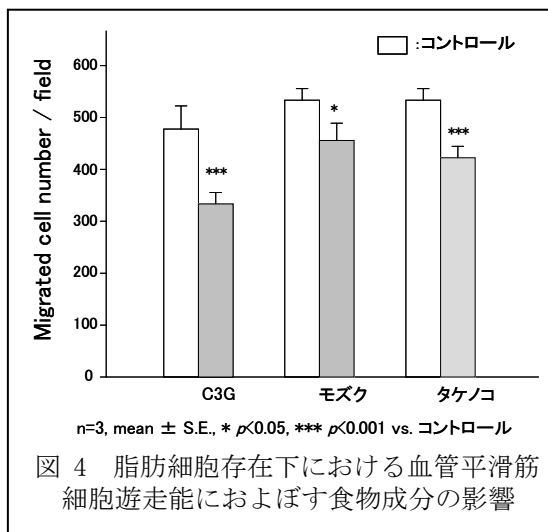


図 4 脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞遊走能におよぼす食物成分の影響

(3) 脂肪細胞の培養液中アディポサイトカインの測定

① 培養液中活性型 PAI-1 量の変化

平滑筋細胞と脂肪細胞の共培養系に C3G またはモズク粘性成分を添加したところ、培養液中の活性型 PAI-1 量はコントロールと比較して有意に減少していた。一方、平滑筋細胞と脂肪細胞の共培養系にタケノコ抽出液を添加しても培養液中の PAI-1 量はコントロールと比較して有意な変化を示さなかった。

② 培養液中アディポネクチン量の変化

平滑筋細胞と脂肪細胞の共培養系に C3G またはタケノコ抽出液を添加したところ、培養液中のアディポネクチン量はコントロールと比較して有意な変化を示さなかった。一方、平滑筋細胞と脂肪細胞の共培養系にモズク粘性成分を添加したところ、培養液中のアディポネクチン量はコントロールと比較して有意に低下していた。

(4) 脂肪細胞の培養液で刺激した血管平滑筋細胞における ERK1/2 のリン酸化

C3G を含む分化維持培地で 2 日間毎に 8 日間脂肪細胞の培養を行った後、C3G を添加した分化維持培地に培地交換し、さらに、4 時間培養した。その培養液で血管平滑筋細胞を刺激したところ、ERK1/2 のリン酸化はコントロールに比べて有意に低下していた。しかし、モズク粘性成分またはタケノコ抽出液を含む分化維持培地で脂肪細胞を培養した場合、ERK1/2 のリン酸化に有意な変化は認められなかった。

(5) 脂肪細胞の培養液中線溶活性の測定

3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化 8 日目の培養液をフィブリンエンザイモグラフィで解析したところ、分子量 72kDa の t-PA と考えられるフィブリン溶解バンドと分子量 48kDa の u-PA と考えられるフィブリン溶解バンドが認められた (図 5)。フィブリン溶解バンドの濃さから、3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化 8 日目の培養液中 u-PA 活性は t-PA 活性よりも強いことが示唆された。

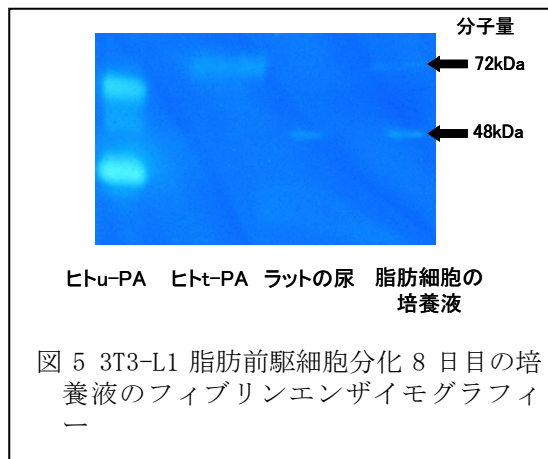
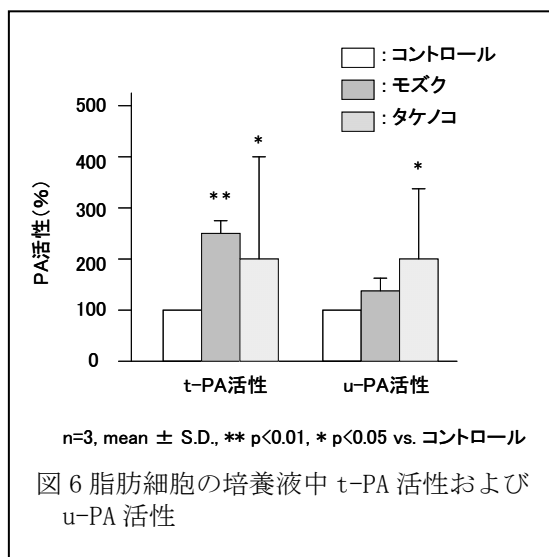


図 5 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化 8 日目の培養液のフィブリンエンザイモグラフィ

分化維持培地にタケノコ抽出液を添加したところ、蒸留水を添加したコントロールと比較して培養液中のt-PA活性とu-PA活性は約2倍に増強していた。また、分化維持培地にモズク粘性成分を添加したところ、蒸留水を添加したコントロールと比較してt-PA活性は約2.5倍に増強していたがu-PA活性に有意な変化は認められなかった(図6)。



以上の成果より、脂肪細胞の分化、すなわち油滴蓄積量の増加とともに血管平滑筋細胞の遊走能が増強し、脂肪細胞の油滴蓄積量を抑制するC3G、モズク粘性成分およびタケノコ抽出液は脂肪細胞存在下における血管平滑筋細胞の遊走能を抑制することが明らかとなった。

脂肪細胞存在下で血管平滑筋細胞の遊走能を評価する実験系でC3G、およびモズク粘性成分は培養液中PAI-1濃度を低下させたが、アディポネクチン濃度の増加を誘導しなかった。この結果から、C3G、およびモズク粘性成分による血管平滑筋細胞の遊走能抑制効果はPAI-1の分泌抑制に起因する可能性が示唆された。一方、タケノコ抽出液による血管平滑筋細胞の遊走能抑制にはPAI-1やアディポネクチンは関与しておらず、その遊走能抑制機序については、今後明らかにする必要がある。

脂肪細胞と血管平滑筋細胞の共培養下で、モズク粘性成分とタケノコ抽出液はPA活性を増強させていたことから、これらの食物成分は動脈硬化症に続発する血栓形成を抑制する可能性が示唆された。今後の課題として、本研究で明らかにされた作用が食物成分のどのような物質に起因するのかを解析することが挙げられる。

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13件)

- ① Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他4名、2番目). A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost in press*, 2011. 査読有
- ② Tomogane K, Ueshima S, Okada K, Matsuo O, (他4名、6番目). The absence of urokinase-type plasminogen activator receptor plays a role in the insulin-independent glucose metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(3):334-9, 2011. 査読有
- ③ Ishida C, Ueshima S, Okada K, Matsuo O, (他5名、2番目). Enhancement of fibrinolytic activity in vascular endothelial cells by heterologous expression of adenine nucleotide translocase-1. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21(3):272-278, 2010. 査読有
- ④ Kanno Y, Ueshima S, Okada K, Matsuo O, (他3名、6番目). Urokinase-type plasminogen activator receptor is associated with the development of adipose tissue. *Thromb Haemost* 104(6):1124-1132, 2010. 査読有
- ⑤ 上嶋 繁, 松尾 理. 線溶系因子関連、*Vascular Lab*, 7:17-21, 2010. 査読無
- ⑥ Kanno Y, Ueshima S, Okada K, Matsuo O, (他4名、6番目). Alpha2-antiplasmin is associated with the progression of fibrosis. *Am J Pathol* 176(1):238-245, 2010. 査読有
- ⑦ 上嶋 繁, 松尾 理. 血栓溶解療法モニター、*臨床検査*, 53:1181-1185, 2009. 査読無
- ⑧ 上嶋 繁, 岡田清孝, 松尾 理, (他3名、1番目). 線溶系: 血管外での新しい機能、*近畿大学医学雑誌*, 33:161-178, 2008. 査読有
- ⑨ 上嶋 繁, 松尾 理. 深部静脈血栓症の病態、*日本病態生理学会雑誌*, 17:37-39, 2008. 査読無
- ⑩ Hou Y, Okada K, Okamoto C, Ueshima S, Matsuo O. Alpha2-antiplasmin is a critical regulator of angiotensin II-mediated vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(7):1257-1262, 2008. 査読有
- ⑪ Kanno Y, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他6名、8番目). The absence of uPAR attenuates insulin-induced vascular smooth muscle cell migration and

proliferation. Thromb Res 123(2):336-341, 2008. 査読有

⑫ Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他7名、2番目). Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured mouse liver and nonparenchymal-cell-dependent proliferation of hepatocytes. Blood Coagul Fibrinolysis 19(6):503-511, 2008. 査読有

⑬ 上嶋 繁, 松尾 理, 深部静脈血栓症の病態、日本血栓止血学会誌、19:485-490、2008. 査読無

〔学会発表〕(計15件)

① 勇井克也, 上嶋 繁, 脂肪細胞の存在下における血管平滑筋細胞の遊走能に及ぼすシアニジンの効果、第62回日本生物工学会大会、2010年10月29日、宮崎

② Yamashita R. Involvement of cyanidin-3-glucoside chloride in fibrinolytic potency of vascular endothelial cells. The 20th International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, August 27, 2010, Amsterdam, The Netherlands

③ 山下里奈, 加齢による過凝固状態を改善する食品成分の解析、第10回日本抗加齢医学会、2010年6月11日、京都

④ 上嶋 繁, 虚血性神経細胞死における線溶因子の役割、第87回日本生理学会大会、2010年5月20日、岩手

⑤ 岡田清孝, 新規ペプチドの線溶系活性化促進作用の解析、第33回日本血栓止血学会、2010年4月24日、鹿児島

⑥ 山下里奈, アントシアニン前処置がトロンビン刺激した培養血管内皮細胞に及ぼす影響、第33回日本血栓止血学会、2010年4月24日、鹿児島

⑦ 岡田清孝, 再生肝細胞上での蛋白分解活性と細胞増殖能、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月19日、広島

⑧ 山下里奈, 黒豆アントシアニンの抗血栓性におよぼす影響、第20回日本病態生理学会大会、2010年1月23日、奈良

⑨ 岡田清孝, アンギオテンシン II 誘発性の血管障害に対する $\alpha 2$ -antiplasmin の関与、第32回日本血栓止血学会学術集会、2009年6月5日、小倉

⑩ 上嶋 繁, 高齢者における凝固・線溶系、第22回日本自己血輸血学会学術集会、2009年3月6日、福島

⑪ 上嶋 繁, 血栓溶解療法の基礎、第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年11月21日、大阪

⑫ 岡田清孝, マウス再生肝細胞上における蛋白分解カスケード制御機構の解析、第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年11月21日、大阪

⑬ 山下里奈, 黒豆アントシアニンの抗血栓性作用について、第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年11月21日、大阪

⑭ 石田知可子, 上嶋 繁, 血管内皮細胞膜上での t-PA binding protein の発現とその線溶活性におよぼす影響、第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年11月21日、大阪

⑮ Hou Y, Ueshima S, The expression of urikinase type-plasminogen activator by c-Myc on hypoxia-induced vascular smooth muscle cells. The 19th Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis. July 6, 2008, Vienna, Austria

〔図書〕(計1件)

① Okada K, Ueshima S, Matsuo O. Role of fibrinolysis in hepatic regeneration. In: Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis. Tanaka K, Davie EW (eds). Tokyo, Springer Japan, 336-347, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上嶋 繁 (UESHIMA SHIGERU)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：30193791

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松尾 理 (MATSUO OSAMU)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：40030879
岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：40030879
山下 里奈 (YAMASHITA RINA)
近畿大学・農学部・助手
研究者番号：90510876