

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11651

研究課題名(和文) ページュ脂肪細胞イメージングによる抗肥満成分の同定と分子作用機序の解明

研究課題名(英文) Functional identification of an anti-obesity component and analysis of its molecular mechanism of action by using beige-adipocyte imaging

研究代表者

井原 勇人 (Ihara, Hayato)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・准教授

研究者番号：00223298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗肥満効果を有するサンショウ成分及びアロマ成分同定を生体イメージング法により行った。発光イメージング法では、睾丸付近に非特異的発光が見られ、鼠径部のページュ化が効率よく見れなかった。またPETイメージング法では、鼠径部白色脂肪組織のFDGの取込みが増え、ページュ化誘導が確認できた。サンショウ成分のうちHydroxy-alpha, beta, などのサンショオール類、フラボン類を含む70%エタノール抽出画分に抗肥満活性があること、アロマ成分のうち柑橘系リモネンおよびサンショウ特有の酢酸ゲラニルやゲラニオールを含む画分に褐色脂肪組織のUCP-1遺伝子発現誘導効果を有することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ページュ化に関する基盤研究は、エネルギー代謝亢進による肥満抑制や治療薬開発に直接結びつくため、全世界中で広く研究されている。

我々は、サンショウ成分にはページュ化を誘導し、抗肥満効果を有することを報告してきた。古くから食経験のある安全性の高いサンショウの成分に関して、熱産生タンパク質UCP-1遺伝子発現を指標に生体イメージング法を用いてページュ化誘導活性を有する抗肥満成分およびアロマ成分の同定をすることにより、新規抗肥満薬やサプリメントの開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified anti-obesity components and aroma of Japanese pepper, Sansho, using in vivo imaging technique. In the luminescence imaging method, non-specific luminescence was observed near the testicles, so beige adipose cells in the inguinal region could not be observed efficiently. In addition, by PET imaging, we were able to confirm that FDG uptake in white adipose tissue in the inguinal region increased and beige adipose cells were induced.

70% ethanol extract of Sansho containing hydroxy-alpha, beta etc. and flavones have anti-obesity effects. Fractions containing limonene and geranyl acetate and geraniol peculiar to aroma of Japanese pepper, Sansho, were found to have the effect of inducing UCP-1 gene expression in brown adipose tissue.

研究分野：分子細胞生物学、分子イメージング

キーワード：ページュ脂肪細胞 生体イメージング PETイメージング 抗肥満効果 UCP-1 遺伝子発現 サンショウ アロマ

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満症の分子基盤の解明が進んできているが、十分な予防・治療法の確立はなされていない。申請者はこれまでに、サンショウ成分の抗肥満作用を見出した。肥満マウスにサンショウ含有食を摂餌させると、摂食量に影響する事なく体重減少が認められ、特に鼠径部をはじめとする白色脂肪組織の重量が減少した。さらに白色脂肪組織では UCP1 や PGC1 のベージュ化マーカー遺伝子の発現が上昇していた。

しかしながら、サンショウに含まれる有効成分が同定されておらず、また含有単一成分は市販されていない。さらに分取型 HPLC によって分取できる有効成分分画の回収量が限られているため、多くの個体を用いた従来の栄養学的アプローチは取れないという問題点があった。そこで生体イメージング法による有効成分の同定法にて同定を試みることにした。

## 2. 研究の目的

抗肥満活性を有するサンショウ成分、アロマ成分を生体イメージング法にて、明らかにすること及び、発光イメージング法、PET イメージング法を用いてのスクリーニング系構築の可能性を合わせて検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) サンショウ有効成分の生体発光イメージング法による同定

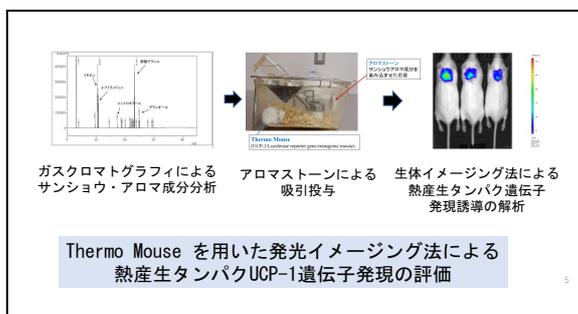
どの HPLC 分画が抗肥満活性を担っているのか、またさらに、どの成分にそれらの活性があるのかに関して、生体イメージング法を用いて検討した。UCP-1/Luc トランスジェニックマウス(Thermo Mouse)に8週間経口投与後、生体光イメージング装置 *IVIS-XR* を用いて鼠径部皮下脂肪組織の発光を指標にして有効成分を同定することを試みた。

### (2) サンショウ有効成分の PET イメージング法による同定の試み

サンショウ成分を当初の条件で混餌して与え、7週間後に共同研究先の PET 施設にマウスを送付した。1週間混餌させて順化させた後、絶食の後 FDG を投与して、経時的に FDG の分布と集積を PET イメージング法で検討した。また、イメージング画像取得後にマウスを解剖して各臓器を分取し、ガンマーカウンターにて FDG の取り込みを計測した。

### (3) サンショウアロマ成分による UCP-1 遺伝子発現誘導の解析と有効アロマ成分の同定

水蒸気蒸留法にて調整したサンショウアロマ成分は GC-MS で解析した。成分を吸着させたアロマストーンをケージに装着し、Thermo Mouse (UCP-1/Luc トランスジェニックマウス)に吸引暴露させ、暴露後の Luc レポーター遺伝子発現量を生体イメージング装置 *IVIS-XR* を用いて発光強度を指標に、また内在性 UCP-1 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて、それぞれ定量解析した。



#### 4. 研究成果

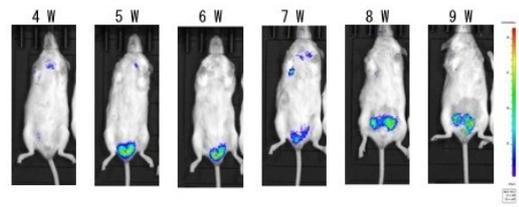
##### (1) サンショウ有効成分の生体発光イメージング法による同定

サンショウ成分のどの分画にベージュ化促進作用があるかを同定するため、成分を70%エタノール抽出画分と水溶性残渣に分けて抗肥満効果があるかどうかを検討したところ、70%エタノール抽出画分に抗肥満効果があった。すなわち、水溶性画分には有効成分が存在しておらず、脂溶性成分が関与していることが示唆された。そこで、70%エタノール抽出画分をさらに分取型 HPLC によって分画した。サンショウ成分のうち、Hydroxy-alpha, beta などのサンショオール類、フラボン類などが含まれていた。これを用いて、生体発光イメージング法で検討することとした。

ジャクソンラボから購入したトランスジェニックマウスの Thermo Mouse では、UCP-1/Luc レポーター遺伝子が Y 染色体に存在し

ており、睪丸付近に Non-specific なシグナルが出るのが判明した。サンショウ成分投与によるシグナルなのか、単なるアーチファクトなのか、の判断が難しいものと考えられた。また腹腔内において鼠径部皮下脂肪組織と睪丸付近との距離が近いので、定量解析に問題があるものと考えられた。どのようなトランスジェニックマウス（トランスジーンが染色体のどの部位に何コピー挿入されているか）を用いるかが問題となるものと考えられた。

サンショウ成分投与後の発光イメージングのタイムコース



##### (2) サンショウ有効成分の PET イメージング法による同定の試み

次に PET イメージングによって、鼠径部皮下脂肪のベージュ化が検出できるかどうかを検討することとした。ベージュ化した鼠径部皮下脂肪には、 $^{18}\text{F}$ FDG が取り込まれることが報告されている。サンショウ果実の粉碎物(3% w/w)を混餌して、4 週間後、8 週間後の鼠径部皮下脂肪組織への  $^{18}\text{F}$ FDG の取込みを検討した。サンショウ添加群において、有意に体重増加抑制が見られた。これらのマウスを用いて  $^{18}\text{F}$ FDG の鼠径部皮下脂肪への取り込みを検討したところ、サンショウを添加していない群に比べ 2~3 倍の取り込み増加があった。撮像後これらの組織を取り出しガンマカウンターで計測したところ、やはり 3 倍ほどの取り込み増加が見られた。組織自体も褐色調を示しており、ベージュ化を示唆するものであった。

以上の結果より、通常の白色脂肪細胞では  $^{18}\text{F}$ FDG の鼠径部皮下脂肪への取り込みが見られないため、 $^{18}\text{F}$ FDG-PET イメージングにより効率よくベージュ化を判定することが可能であると考えられた。PET イメージングに必要な装置や PET プローブの合成には多額の費用と専門知識が必要であり、PET 施設との共同研究が必須となる。

##### (3) サンショウアロマ成分による UCP-1 遺伝子発現誘導の解析と有効アロマ成分の同定

有効成分を含むサンショウ成分を抽出、カラム分画する中で、サンショウの香り成分が除かれた分画では抗肥満効果を示すものの、これを摂餌したマウスでは、熱産生タンパク UCP-1 遺伝子発現誘導が減弱されていた。これは、サンショウの香気成分が嗅覚系を介して脂肪組織での UCP-1 遺伝子発現を誘導している可能性を示唆するものであった。そこで、サンショウに含まれる香気成分について UCP-1 遺伝子発現誘導活性の有無について次に検討した。

水蒸気蒸留法によって調整されたアロマ成分の GC-MS 解析の結果、サンショウアロマに含まれる香気成分は、多い順にリモネン、酢酸ゲラニル、フェランドレンなどであった。

Thermo Mouse に上記アロマを吸引暴露後、褐色脂肪組織における UCP-1/Luciferase レポーターの発現誘導がされるかどうかを、発光イメージング法にて検討した。褐色脂肪細胞では Non-specific なシグナルがほとんど見られず、定量することが可能であった。

アロマに吸引暴露 24 時間後に刺激前の 10~12 倍の倍のピーク発光量となり、72 時間にかけて漸減していくタイムコースを取ることが判った。内

在性 UCP-1 mRNA 発現量を検討した所、暴露後 5 時間から UCP-1 遺伝子発現が誘導され始め、24 時間後に約 2 倍の発現量となりピークを迎え、72 時間にかけて漸減した。レポーター遺伝子による発光のタイムコースと同じようなものであった。

つぎに水蒸気蒸留法で得られた①リモネン単独、②同量のリモネンを含むサンショウアロマをそれぞれ吸引暴露し発光量を比較した結果、リモネン単独暴露に比し、サンショウ暴露 24 時間における発光量は 2.9 ~ 3 倍程度高かった。

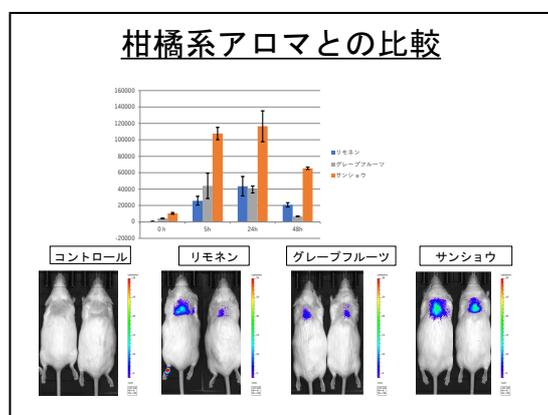
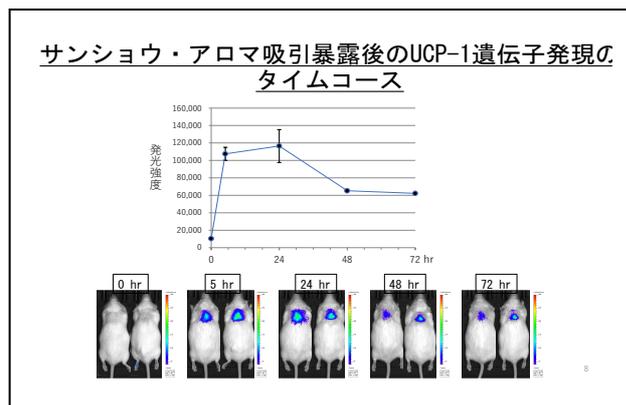
以上の結果から、サンショウアロマに含まれる揮発性香気成分によって、褐色脂肪組織での UCP-1 遺伝子発現が誘導されることが分かった。混餌したサンショオール類やフ

ラボノイドなどの成分に加え、香気成分に含まれるリモネンや酢酸ゲラニルなどによって、嗅覚系を介して（呼吸による肺胞での吸入効果もあるものと考えられる）、褐色脂肪組織での UCP-1 遺伝子発現が誘導されることが示唆された。

以上のように、サンショウ成分はそのアロマ成分とともに、UCP-1 遺伝子発現を誘導し、抗肥満効果を示すことが判明した。

生体イメージング法を用いた機能性成分探索には強力な方法論であると考えられる。特に発光イメージング法は比較的簡便であり、導入するレポーター遺伝子を変えることによって、いろいろな病態生理的条件下での遺伝子変動をモニターができると共に、それを改善する機能性成分や、治療薬の開発に役立つものと考えられた。

謝辞：PET イメージング解析を行って頂きました、共同研究先の浜松ホトニクス（株）中央研究所 PET グループの研究員の皆様に感謝いたします。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukushi, Y., Golanov, E.V., Koizumi, S., Thura, M., Ihara, H., and Yamamoto, S	4. 巻 2
2. 論文標題 The Cholinergic Pathway and MitoKATP Induce UCP4 Expression Involved in Neuroprotection of FN Stimulation in Rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stroke: Vascular and Interventional Neurology	6. 最初と最後の頁 e000362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/SVIN.122.000362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsuka, T., Thi Le, H. Lin Thein, Z, Ihara, H. Sato, F., Nakao, T., and Kohsaka, A	4. 巻 256
2. 論文標題 Deficiency of the circadian clock gene Rev-erb induces mood disorder-like behaviours and dysregulation of the serotonergic system in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 Article 113960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2022.113960.	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

1. 著者名 大嶋 萌永 , 鈴木 絵莉花 , 井原 勇人 , 永井 宏平 , 岸田 邦博	4. 巻 74(4)
2. 論文標題 高フルクトース食に含まれる油脂の違いがラット脂質代謝及び肝臓タンパク質発現プロファイルに与える影響の比較	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本栄養・食糧学会誌	6. 最初と最後の頁 155-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Takeshima, K., Kadowaki, A., Gato, N., Fujita, S., Kishida, K., Anamizu, T., and Ihara, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Zanthoxylum piperitum activates thermogenic gene expression and induces beige adipogenesis in white adipose tissues of Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. obesity & weight loss therapy	6. 最初と最後の頁 421 - 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka T, Le HT, Kohsaka A, Sato F, Ihara H, Nakao T, and Maeda M.	4. 巻 432
2. 論文標題 Adverse effects of circadian disorganization on mood and molecular rhythms in the prefrontal cortex of mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscienc	6. 最初と最後の頁 44 - 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中谷雅弓、門脇昭夫、水崎愛、岸田邦博、我藤伸樹、井原勇人
2. 発表標題 サンショウアロマ成分による熱産生タンパクUCP-1遺伝子発現誘導効果の生体イメージング解析
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井原勇人、門脇昭夫、水崎愛、中谷雅弓、我藤伸樹
2. 発表標題 生体イメージングを用いたサンショウアロマ成分によるUCP-1遺伝子発現誘導効果の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Kishida, K. Nagai, & and H. Ihara
2. 発表標題 Comparison of Effects on lipid metabolism of different fats and oils in high-fructose and high-glucose diets in rats.
3. 学会等名 22 nd IUNS-International Congress of Nutrition, (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植田 有咲、藤田 瑞紀、井原 勇人、永井 宏平、岸田 邦博
2. 発表標題 高糖質（グルコースまたはフルクトース）かつ高脂肪（大豆油または魚油）食がラット脂質代謝に与える影響の比較
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 近畿支部大会2021.11.27.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 瑞紀、植田 有咲、井原 勇人、永井 宏平、岸田 邦博
2. 発表標題 高糖質（グルコースまたはフルクトース）かつ高脂肪（中鎖脂肪またはラード）食がラット脂質代謝に与える影響の比較
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 近畿支部大会2021.11.27
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井原勇人、門脇昭夫、水崎愛、中谷雅弓、岸田邦博、我藤伸樹
2. 発表標題 生体光イメージング法を用いたサンショウ香気成分によるUCP-1遺伝子発現誘導効果の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Takeshima, Akio Kadowaki, Nobuki Gato, Sayo Fujita, Kunihiro Kishida, Takashi Akamizu, Hayato Ihara
2. 発表標題 Zanthoxylum piperitum activates thermogenic gene expression and beige adipogenesis in white adipose tissues of mice
3. 学会等名 ASBMB annual Meeting EB2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	中田 正範  (Nakata Masanori)  (10305120)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	
研究 分担者	岸田 邦博  (kishida kunihiro)  (30412703)	近畿大学・生物理工学部・准教授   (34419)	

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
---------	---------