

機関番号：17201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780130

研究課題名 (和文)

脂肪組織由来メタボリックシンドローム疾患遺伝子の検索と食環境による発現制御

研究課題名 (英文)

Control of expression of genes related to metabolic syndrome by food components

研究代表者

永尾 晃治 (NAGAO KOJI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：10336109

研究成果の概要 (和文) : *In vitro* および *in vivo* 実験系を用いて、メタボリックシンドローム疾患遺伝子の検索を、病態発症の危険因子及び抑制因子の両方向から行った。食用キノコやレンコンの抽出物を用いた実験により、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインのうち、Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)発現上昇が非アルコール性脂肪性肝障害惹起と高い相関にあり、アディポネクチン発現低下がインスリン抵抗性の惹起と深く関わっていることが明らかとなった。よって本研究により、アディポサイトカインプロファイルの改善を制御できる食品成分が存在し、食環境によるメタボリックシンドローム発症の予防・改善への活用が期待できる事が示された。

研究成果の概要 (英文) : Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is emerging as the most common liver disease in metabolic syndrome. We found that the dietary intake of powdered whole *Panellus serotinus* (Mukitake) and its extracts alleviate NAFLD in obese, diabetic db/db mice. Our study demonstrated that Mukitake displays at least two different physiological actions that alleviate NAFLD: one through the reduction of inflammatory damage by its suppression in MCP-1 production and the other through an increase of the serum adiponectin level and the prevention of visceral fat accumulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品栄養化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：メタボリックシンドローム、脂肪組織、疾患遺伝子、食環境

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、肥満やインスリン抵抗性を中心病態として、高脂血症、脂肪性肝臓疾患、高インスリン血症、糖尿病および高血圧といった虚血性心疾患の危険因子が集積する状態を示す。その発症には複数の遺伝因子と環境因子が関与すると考え

られているが、発症に関与する遺伝因子の本態を明らかにすることにより、本質的な治療はもとより、環境因子（食環境など）の制御により遺伝的素因を素因のままに止めるための予防法の確立が可能となる。そもそも生体内に於いて、様々な生命現象、即ち発生・分化・老化・疾病などが進行するのは、個々

の細胞の運命が、ある特定の遺伝子群の発現・機能により決定づけられた結果である。それら遺伝子群には刺激に反応して発現・消失するものが存在し、近年、刺激応答部位として脂肪組織の重要性が注目されている。従来、エネルギーを貯蔵する受動的な臓器と考えられていた脂肪組織が、ホルモン様の物質を分泌すること等により、全身の代謝系や疾病の発症に対して能動的に関わっていることが明らかとなってきた。そのため脂肪組織由来分泌分子の発現制御機構に関する研究は、国内外における関心が高い。申請者はこれまでに、食事因子により脂肪組織特異的遺伝子の発現を調節することで、疾患モデル動物における病態発症連鎖を抑制できることを報告してきた。そこで、メタボリックシンドロームの病態発症連鎖との関係において、脂肪組織内に発現する疾患遺伝子の網羅的検索とそれらの発現を食事成分により制御することにより病態発症の予防・改善を目指すという着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、肥満（脂肪組織の過剰蓄積）を中心病態として発症するメタボリックシンドロームにおいて、段階的に発症する各特徴的な症状において、特異的に発現する遺伝子パターンを脂肪組織に焦点を当てて解析する事で疾患遺伝子を同定し、さらに疾患遺伝子の発現と食環境との相互作用について明らかにすることを目的とする。最終的には、遺伝的要因という先天的な因子に対して食環境という後天的な因子が、どの様にその相互作用のバランスを保つことで、病態発症の予防、ひいては人の健康を構築しうるのかを明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

具体的には、培養細胞（脂肪細胞モデル 3T3L1、肝臓細胞モデル HepG2 など）を用いた個体からスケールダウンした形式における疾患改善食事成分のスクリーニングとメタボリックシンドロームモデル動物（OLETF ラット、Zucker ラット、*db/db* マウスなど）における各病態発症時の遺伝子発現プロファイリングや食環境の相互作用の解析などにより効率的に有用な知見を得る。

## 4. 研究成果

4 週間の飼育終了後、肥満モデル *db/db* マウスでは、摂食量の増加に伴い肥満・肝肥大・脂肪肝の発症が認められた。しかしながら、ムキタケ粉末摂取により有意な肝臓重量の低下と肝臓脂質濃度の低下が認められた（図 1）。

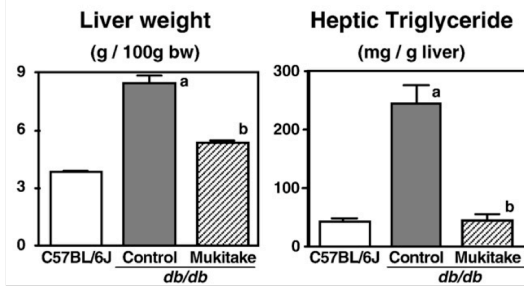


図 1 ムキタケ粉末摂取は肥満モデルマウスにおける肝肥大および肝臓脂質蓄積を抑制した

また肥満モデル *db/db* マウスでは、通常マウスと比べて血中肝機能マーカーレベルの著しい上昇が認められたが、ムキタケ粉末摂取により顕著な低下が認められ、肝臓障害抑制作用が示唆された（図 2）。

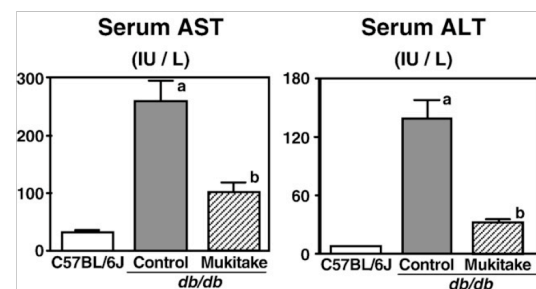


図 2 ムキタケ粉末摂取は肥満モデルマウスにおける血中肝機能マーカーレベル上昇を抑制した

抗メタボリックシンドローム作用の機序としては、ムキタケ粉末摂取による血清アディポネクチン濃度の有意な上昇と血清 MCP-1 濃度の有意な低下が寄与していることが示唆された（図 3）。

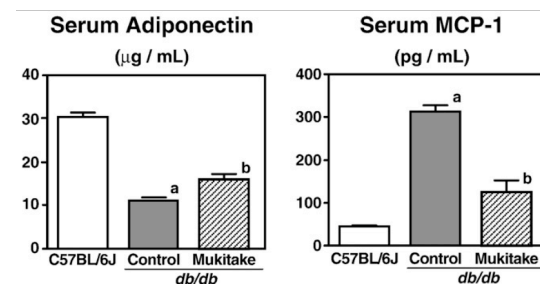


図 3 ムキタケ粉末摂取は血清アディポネクチン濃度の上昇、血清 MCP-1 濃度の低下を介して、肥満モデルマウスにおける病態を改善した

さらに、これらアディポサイトカインの脂肪組織における mRNA 発現量を測定したところ、血清レベルの増減は転写レベルでの制御を介していることが示唆された（図 4）。

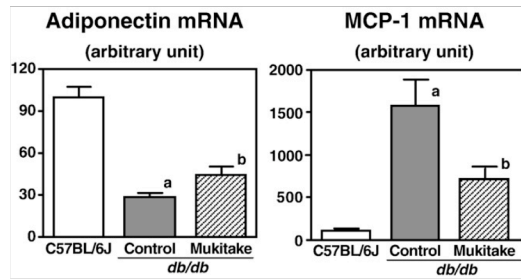


図4 ムキタケ粉末摂取は血清アディポネクチン濃度の上昇、血清 MCP-1 濃度の低下を介して、肥満モデルマウスにおける病態を改善した

炎症性因子である MCP-1 mRNA 発現は、転写調節因子 nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) の活性化によって誘導されることが知られている。NF $\kappa$ B は通常 inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ -B) と結合して不活性な状態で存在しているが、I $\kappa$ -B kinase (I $\kappa$ BK) が活性化されて I $\kappa$ -B をリン酸化すると、I $\kappa$ -B がユビキチン化されて分解され、NF $\kappa$ B が活性化される (図7)。IKK $\beta$  は I $\kappa$ BK をリン酸化して活性化するため、IKK $\beta$  活性阻害作用は、炎症性遺伝子の発現抑制を目指した創薬ターゲットになっている。本研究において、ムキタケ熱水抽出物に *in vitro* で IKK $\beta$  阻害活性が認められたため (図5)、ムキタケ粉末摂取は IKK $\beta$ -NF $\kappa$ B シグナル経路の阻害を介して MCP-1 低下をもたらした、このことが肥満モデルマウスの病態改善に寄与したものと考えられた。

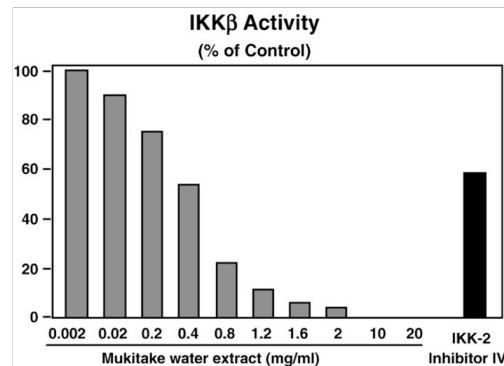


図5 ムキタケ熱水抽出物は *in vitro* において IKK $\beta$  阻害活性を示した

そこで次に、ムキタケ粉末中の脂肪肝改善作用における活性本体の検索を行うため、乾燥粉末から熱水抽出物およびエタノール抽出物を調整し、肥満モデルマウスの病態発症に及ぼす影響を検討した。肥満モデル db/db マウスに AIN-76 組成に準じた対照食を与えた群 (Control 群)、ムキタケ熱水抽出物 3% 添加食を与えた群 (WE 群) およびムキタケエタノール抽出物 3% 添加食を与えた群 (EE 群) を設けた。また C57BL/6J マウスに対照食を与えた群 (Normal 群) も設けた。

4 週間の飼育終了後、肥満モデル db/db マウスでは、摂食量の増加に伴い肥満・肝肥

大・脂肪肝の発症が認められた。しかしながら、ムキタケ両抽出物摂取により有意な肝臓脂質濃度の低下が認められた (図6)。

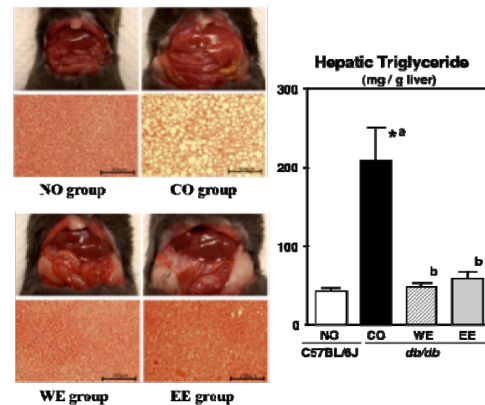


図6 ムキタケ粉末摂取は肥満モデルマウスにおける肝肥大および肝臓脂質蓄積を抑制した

LC-TOF MS 解析の結果、同じキシメジ科のシイタケとの比較解析により、ムキタケのみに含まれる 33 成分と更に熱水抽出物のみに含まれる 7 成分を見出すことに成功した。また EtOH 抽出物には、善玉因子であるアディポネクチンを上昇させる作用があり、特徴的な 5 成分が見出された (図7)。

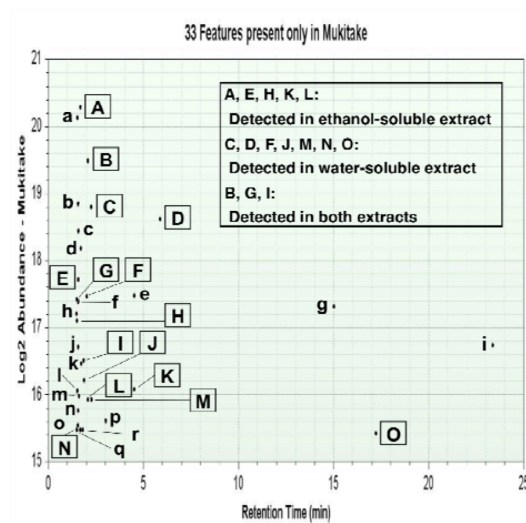


図7 LC-TOF MS により、ムキタケ抽出物に特徴的な 33 成分が検出された

また、ムキタケの他にもレンコンは、カテキンとガロカテキンを構成成分とした少なくとも 9 量体に重合したプロアントシアニジンを含んでおり、肥満誘発性の脂肪肝発症に対して、アディポネクチン産生上昇を介して抑制作用を発揮することも見出された (論文未発表データ)。

さらに柑橘類由来オーラプテンが脂質代謝に及ぼす影響について、肝臓モデル HepG2 細胞及び肥満モデル OLETF ラットで検討した結果、オーラプテン添加により脂質代謝変動

のバイオマーカーである apoB100 の HepG2 細胞からの分泌量が低下し、脂質低下作用が示唆された。その後、OLETF ラットに摂食させたところ、量依存的に抗肥満作用及び肝臓脂質低下作用が発揮された。その作用機序としては、脂質分解系遺伝子の発現を制御する転写因子 Peroxisomal proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) のリガンド活性を介して、脂質燃焼系遺伝子の発現調節を行っていることが示唆された。

以上の結果から、食環境によるメタボリックシンドローム発症の予防・改善への活用が期待できる事が示され、特に食品成分によりアディポサイトカインプロファイルの改善を制御することの重要性が明らかとなった。今後は、より効率的な機能性食品成分の検索系の構築と *in vivo* 実験による生体内での機能性発揮機構のより詳細な解明を続けていく必要がある。

#### 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 5 件)

① K. Nagao, N. Inoue, M. Inafuku, B. Shirouchi, T. Morooka, S. Nomura, N. Nagamori, T. Yanagita, Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic fatty liver disease through the suppression of monocyte chemoattractant protein-1 production in *db/db* mice., *J. Nutr. Biochem.*, 査読有り, 21 巻, 2010, 418-423.

② K. Nagao, N. Yamano, B. Shirouchi, N. Inoue, S. Murakami, T. Sasaki, T. Yanagita, Effects of citrus auraptene (7-geranyloxycoumarin) on hepatic lipid metabolism *in vitro* and *in vivo*., *J. Agric. Food Chem.*, 査読有り, 51 巻, 2010, 9028-9032.

③ K. Nagao, T. Yanagita, Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome., *Pharm. Res.*, 査読有り, 61 巻, 2010, 208-12.

④ XQ. Hu, YM. Wang, JF. Wang, Y. Xue, ZJ. Li, K. Nagao, T. Yanagita, CH. Xue, Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPAR  $\alpha$  and SREBP-1c signaling., *Lipids Health Dis.*, 査読有り, 9 巻, 2010, 1-9.

⑤ I. Ikeda, M. Kudo, T. Hamada, K. Nagao, Y. Oshiro, M. Kato, T. Sugawara, T. Yamahira, H. Ito, S. Tamaru, M. Sato, K. Imaizumi, S. Nagaoka, T. Yanagita, Dietary soy protein isolate and its undigested

high molecular fraction upregulate hepatic ATP-binding cassette transporter G5 and ATP-binding cassette transporter G8 mRNA and increase biliary secretion of cholesterol in rats., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 査読有り, 55 巻, 2009, 252-256.

[学会発表] (計 5 件)

① 永尾晃治, 機能性脂質の働きとメタボリックシンドロームの予防・改善, 平成 22 年度日本ビタミン学会市民公開講演会, 2010.11.6, 佐賀市

② 永尾晃治, 機能性脂質によるメタボリックシンドロームの予防・改善, 平成 22 年度日本油化学会関西支部講演会, 2010.8.7, 佐賀市

③ 永尾晃治, 食品成分を用いたメタボリックシンドローム予防・改善への試み, 平成 22 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部後悔市民講演会, 2010.4.24, 長崎市

④ 永尾晃治, 機能性脂質の働きとメタボリックシンドロームの予防・改善に関する研究, 第 63 回日本栄養・食糧学会大会, 2009.5.20, 長崎市

⑤ Koji Nagao, Effect of dietary DHA-PC on lipid metabolism in obese rats., 100th American oil chemist' society annual meeting & expo, 2009.5.4, Orlando(USA).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

永尾 晃治 (NAGAO KOJI)  
佐賀大学・農学部・准教授  
研究者番号: 10336109

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし