

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780121

研究課題名（和文）低酸素ストレス応答抑制を標的とした食品成分による肥満関連疾病の予防

研究課題名（英文） Prevention of obesity-related diseases by food components targeting at regulation of hypoxic response in adipocytes

研究代表者

山崎 正夫（YAMASAKI MASAO）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060

研究成果の概要（和文）：

肥満とは脂肪組織の肥大化であるが、肥満による低酸素ストレスが脂肪細胞の機能に与える影響については不明な点が多い。本研究では低酸素ストレスによって脂肪細胞や前駆脂肪細胞からは血管新生誘導分子の産生が誘導される、脂質の蓄積が亢進することを明らかとした。さらに低酸素ストレスの応答抑制にAkt経路の抑制が有用であることが示唆した。低酸素ストレスによって脂肪細胞には様々な表現系が生じるため、低酸素ストレス応答シグナルの意義の解明は肥満や生活習慣病予防に有用な分子標的の発見に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Although obesity is characterized as enlargement of adipose tissue, effect of hypoxic stress induced by obesity on the function of adipocyte is still unknown. Here, we revealed that hypoxic stress stimulated the production of angiogenic factors and inflammatory cytokines accompanied with acceleration of lipid accumulation. In addition, as a result of signaling pathway analysis, hypoxic stress evoked activation of akt pathway. Taken together, as hypoxic stress evokes variety of phenotype in adipocytes, elucidation of hypoxia responsive signaling pathways which are responsible for induction of angiogenesis, inflammation would be helpful for the discovery of novel target for the prevention of obesity related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能学

1. 研究開始当初の背景

戦後の高度経済成長の中で日本人の食生活は大きく変遷してきた。一般に、食の欧米

化と称されるように脂質の過剰摂取が顕著となるとともに運動不足により肥満とそれに伴う疾病が増加し、現在ではメタボリック

シンドロームという言葉が市民権を得ている。厚生労働省の平成 20 年度調査によると、日本の死因の第 1 位は癌であり、第 2 位に心疾患、第 3 位に脳血管疾患となっている。この心疾患と脳血管疾患の割合を合計すると、第 1 位の癌に匹敵する。この二つの病気はどちらも肥満に大きく関わるいわゆる生活習慣病である。このような背景を受け、肥満人口の増加は近年歯止めがかかりつつあるが、依然日本人の健康を脅かす喫緊の解決課題であると言える。

肥満はそもそもなぜ疾病につながるのだろうか？肥満は脂肪組織の肥大化と定義することができるが、正常なその他の組織では大きさが頻繁に変化することはあまり観察されない。一方で、がん組織は組織が肥大する典型である。がん組織では組織が肥大化するに伴って、近傍血管からの酸素供給が不足するという現象が起こる。言うまでもなく、酸素は細胞にとって生命活動維持に必須であり、酸素不足はがん細胞にとっても致命的になることが想定される。このため、細胞が低酸素に置かれている状態を『低酸素ストレス』とも呼ばれる。しかしながら、実際生体内ではがん細胞は無秩序に増殖を続け、組織を肥大化させる。その大きな理由としてがん細胞が低酸素に対して適応する能力を有しているためである。低酸素ストレスに適応するための細胞内の鍵分子は hypoxia inducible factor (HIF)-1 と呼ばれる転写因子であり、HIF-1 は血管新生、細胞周期停止、造血、解凍系活性化などに関わる遺伝子の発現誘導を介して、多様な低酸素ストレス回避経路の活性化において中心的な役割を担う。このため、HIF-1 を中心とした低酸素ストレス回避応答を抑制することががん治療の新たな標的となっている。

このように、がん細胞においては多くの低酸素ストレスに関する知見が得られているが、脂肪組織における低酸素ストレスはこれまでほとんど明らかとされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では脂肪組織を構成する細胞に低酸素ストレスを与えた際にこれらの細胞がどのような応答をするのかを検証することを第 1 の目標とした。すでに背景の部分でも述べたが、がん細胞においては低酸素ストレスを巧みに回避することで組織をさらに増大させる仕組みが備わっているため、脂肪組織を構成する細胞が何らかの低酸素ストレス応答をするならば、その現象を抑制することが肥満あるいは肥満に伴う疾病の予防につながると考えられる。さらに、そのような低酸素ストレス応答の詳細なシグナル伝達を明らかとすることによって具体的な分子標的が明らかになると考えた。

3. 研究の方法

①【脂肪細胞の培養、分化条件】

3T3-L1 細胞を前駆脂肪細胞として使い、日常の継代においては 10% 仔ウシ血清 (CS) 含有 DMEM 培地 (継代用培地) を使い、週に 2-3 回の継代を行った。分化誘導培地には継代用培地に Insulin 10 mg/L、Dexamethazone 0.25 μ M、3-isobutyl-1-methylxanthine 0.5 mM となるように加えた。成熟培地には Insulin を 10 mg/L となるように添加した。

分化誘導時には 3T3-L1 細胞を 24 well 接着プレートに 2.0×10^4 cells/well の密度で播種し、全量 500 μ l となるように継代用培地を加え、48 時間前培養した。その後、新しい継代用培地に交換し、低酸素培養区は 24 時間、48 時間低酸素培養条件において培養した。また Control として、通常培養条件において 24 時間、48 時間培養したものを通常培養区とした。低酸素培養においてはインキュベーター内に窒素発生装置により精製された窒素をフラッシュすることで 1% O_2 環境を維持した。また、低酸素培養では培地を培養開始より 24 時間以上前から低酸素環境で馴化した。

②【オイルレッド O による脂肪染色およびトリグリセリドの定量】

24well プレートで分化させた細胞を、PBS で 3 回洗浄し、3.7%ホルマリンをプレートに 300 μ l 加え、細胞を固定した。各ウェルにオイルレッド O 液を分注し、室温で 15 分間放置した。各ウェルを蒸留水で 2 回洗浄し、すすぎ水が完全に透明であることを確認する。各ウェルにつき 200 μ l のイソプロパノールを加えて色素を溶出した。溶出液を 540nm の波長を用いてプレートリーダーで測定した。

トリグリセリドの測定においては培養終了後、培地を吸引し、PBS で洗浄し吸引した。300 μ l の PBS を加え、ハンディソーニケーターで細胞をプレートから剥がした。1.5 ml エッペンドルチューブに回収し、TG 蓄積量をトリグリセリド E-テストで測定した。

③【培養上清中のタンパク解析】

培養終了後に培養上清を回収し、300g で 5 分間遠心した。その後上清を DuoSet Mouse VEGF ELISA kit (R&D Systems) で測定した。また、分泌タンパクの網羅的解析のため、Raybio 社製のサイトカインアレイを用いて培養上清中のタンパクの検出を行った。

④【ウェスタンブロットによるシグナル伝達分子の解析】

3T3-L1 細胞を 2.0×10^4 cells/cm² となるように播種し、分化・成熟させた。低酸素処理後細胞表面を軽く洗い、細胞溶解 buffer で細胞溶解後した。15000 x g、20 分間遠心分

離後、上清を別のエッペンに回収し、Sample buffer と混合して、100 °C, 5 分間煮沸し変性させた。タンパク質濃度の定量後電気泳動サンプルとした。タンパク質定量結果に基づいてサンプルを SDS-PAGE に供した。泳動後、タンパク質を PVDF 膜に転写させた。3 %BSA で 37°C、1 時間のブロッキングし。Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、Can Get Signal Solution 2 で HRP 標識二次抗体希釈し、順次反応させた。最後に ECL prime 溶液によるバンドの検出を行った。

4. 研究成果

3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導後、成熟培地に変換し、その後 24 および 48 時間低酸素および通常酸素で培養を行い培養上清中の VEGF レベルと、トリグリセリドの蓄積量を解析した。その結果、図 1 に示す通り時間依存的に細胞内トリグリセリドレベルおよび VEGF 蓄積量は増加したが、低酸素下ではさらにこれらの傾向が顕著に認められた。24, 48 時間いずれの処理においても有意差を認めた。

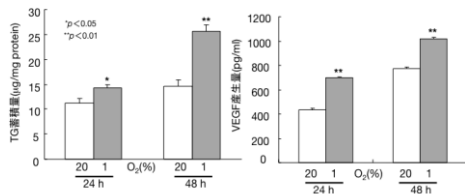


図1 脂肪細胞における低酸素ストレスがTG蓄積とVEGF産生におよぼす影響

次にこのような低酸素における VEGF 産生亢進やトリグリセリドの蓄積亢進がどのようなシグナル伝達によるものか検討するため akt/PKB 阻害剤である wortmannin の添加試験を実施した。図 2 に示す通り Wortmannin は 1000 nM において有意にこれらの低酸素応答をした。このため、akt/PKB 経路の活性化が VEGF 産生亢進および細胞内トリグリセリドの蓄積亢進に関与していると考え、本経路の阻害作用の報告されている食品成分として genistein, curcumin, tocopherol, alpha-lipoic acid の作用を評価したが、これらの成分は細胞毒性の認められない濃度域においては VEGF 産生およびトリグリセリド蓄積には影響を与えなかった。

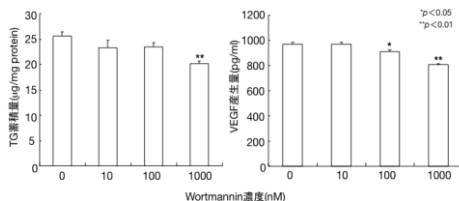


図2 Akt阻害が脂肪細胞におけるTG蓄積とVEGF産生におよぼす影響

次に低酸素ストレスでのサイトカイン産生におよぼす影響を網羅的に解析するため、低

酸素ストレス下および通常酸素下で培養した 3T3-L1 前駆脂肪細胞の培養上清を解析した。図 3 に示す通り前駆脂肪細胞においても VEGF 産生が亢進しており、単球走化性因子である MCP-1 の産生が亢進していた。

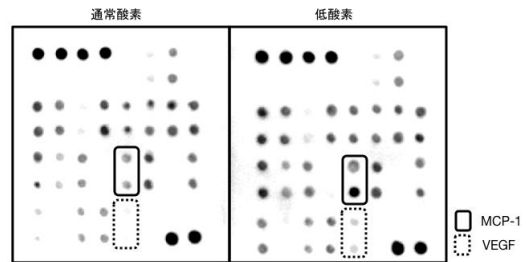


図3 低酸素ストレスが前駆脂肪細胞のサイトカイン産生におよぼす影響

ここまでの成果を整理すると、低酸素ストレス下では脂肪細胞、前駆脂肪細胞は血管新生誘導、炎症反応の惹起、脂肪蓄積の亢進に繋がる事を示唆しており、低酸素ストレスは肥満や肥満関連疾患の増悪因子であることが示唆された。

次に図 1、2 では低酸素ストレスにおける Akt/PKB 経路の関与を示唆したが、低酸素下処理が Akt リン酸化に与える影響を検討した。3 時間以内の短時間においては低酸素ストレスの影響は認められず、12, 24, 36 時間処理によって、低酸素下でリン酸化 Akt のレベルがわずかに亢進することが示された(図 4)。図 2 に示す通り、Akt 阻害により VEGF およびトリグリセリドレベルは低下しているが、その程度強くなく、低酸素ストレス下でのこれらの因子の制御に Akt/PKB 経路は部分的に関与することが示唆された。

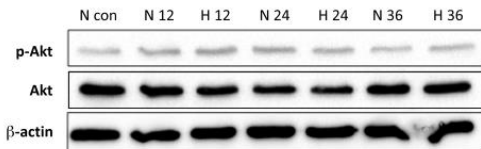


図4 低酸素ストレスが脂肪細胞のAkt活性におよぼす影響

次に、Erk 経路の関与を検討したところ、低酸素下で Erk のリン酸化は著しく低下することが示された(図 5)。一方で、Erk 阻害剤である PD98059 は VEGF 産生抑制やトリグリセリド蓄積抑制といった、低酸素下で見られるような作用は引き起こさなかった。この結果から、Erk 経路は低酸素ストレス応答に何らかの関与をしている可能性は考えられたが、脂肪細胞の低酸素下での表現系について更なる検討が必要である。

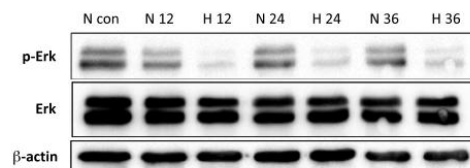


図5 低酸素ストレスが脂肪細胞のErk活性におよぼす影響

以上の結果は、低酸素ストレスが脂肪細胞において劇的な機能変化を起こすことを示しており、このような機能改善は肥満によってもたらされる生活習慣病の増悪因子となることが推定される。今後、これらの機能変化を生じさせるシグナル伝達異常の改善を標的とした食品、薬品の開発が生活習慣病の予防あるいは緩和の一助となることが期待される。

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 8 件)

- ① S Yasuda, N Ohkura, K Suzuki, M Yamasaki, K Nishiyama, H Kobayashi, K Igoshi. Effects of Highly-ripened Cheeses in HL-60 Human Leukemia Cells: Antiproliferative Activity and Induction of Apoptotic DNA damage. *J Dairy Sci* 93(4) 1393-1400 (2010).査読有り
- ② M Yamasaki, A Mukai, M Ohba, Y Mine, Y Sakakibara, M Suiko, K Morishita, K Nishiyama. Genistein induces Apoptotic Cell Death in Adult T-cell Leukemia Cells through Estrogen Receptors. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(10) 2113-2115 (2010).査読有り
- ③ I Shirasugi, Y Sakakibara, M Yamasaki, K Nishiyama, T Matsui, M.-C Liu M Suiko. Novel screening method of potential skin-whitening compounds using luciferase reporter assay system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(11) 2253-2257 (2010).査読有り
- ④ T Hashiguchi, K Kurogi, Y Sakakibara, M Yamasaki, K Nishiyama, S Yasuda, MC Liu, M Suiko. Enzymatic sulfation of tocopherols and tocopherol metabolites by human cytosolic sulfotransferases. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(10):1951-1956.査読有り
- ⑤ M Yamasaki, M Iwase, K Kawano, Y Sakakibara, M Suiko, K Nishiyama. Alpha Lipoic Acid Selectively Inhibits Proliferation and Adhesion to Fibronectin of v-H-ras-transformed 3Y1 Cells. *J Clin Biochem Nutr (In press)*査読有り
- ⑥ S Yasuda, H Kuwata, K Kawamoto, J Shirakawa, S Atobe, Y Hoshi, M Yamasaki, K Nishiyama, H Tachibana, K Yamada, H Kobayashi, K Igoshi. Effect of highly lipolyzed goat cheese on HL-60 human leukemia cells: antiproliferative activity and induction of apoptotic DNA damage. *J Dairy Sci (In press)*査読有り
- ⑦ M Yamasaki, M Iwase, K Kawano, Y Sakakibara, M Suiko, K Nishiyama. Apocynin Selectively Inhibits Proliferation, Adhesion to Fibronectin of v-H-ras-transformed 3Y1 Cells

*Biosci Biotechnol Biochem. (In press)*査読有り

- ⑧ Y Yamasaki, M Yamasaki, H Tachibana, K Yamada: β 1-Integrin plays an important role in fucoidan-induced apoptosis via caspase-8 activation. *Biosci Biotechnol Biochem. (In press)*査読有り

[学会発表] (計 13 件)

- ①リポ酸による β 1-integrin の発現抑制作用: ○岩瀬将弘, 河野和生, 水光正仁, 榊原陽一, 山崎正夫, 西山和夫: 日本農芸化学会 (熊本) 2010年9月17日
- ② α -リポ酸による β 1-integrin の発現抑制作用: ○岩瀬将弘, 河野和生, 水光正仁, 榊原陽一, 山崎正夫, 西山和夫: 第5回 α -リポ酸研究会 (東京) 2010年10月1日
- ③ Borsotti Chiara, Roven Muller, Yamasaki Masao, Manz Markus: Contribution of Human T Cell Subpopulations to Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease In RAG2^{-/-}g_c^{-/-} Mice. 2010 American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Orland, 2010. 12.5
- ④レポーターアッセイを用いた美白評価技術の開発: ○白杉 一郎、榊原 陽一、山崎 正夫、西山 和夫、松井 隆史、水光 正仁: 日本農芸化学会 (京都) 2011年3月26日
- ⑤大豆イソフラボンのHTLV-I感染T細胞株 HUT102 増殖抑制効果: ○峰 善広、大場 雅予、向井 彩子、榊原 陽一、水光 正仁、森下 和広¹、山崎 正夫、西山 和夫: 日本農芸化学会 (京都) 2011年3月27日
- ⑥ α リポ酸のアポトーシス誘導機構解明: ○久米田翔子、有菌裕規、西本健太郎、北岡翔太、川邊暁子、山崎正夫、榊原陽一、水光正仁、西山和夫: 日本栄養食糧学会 (東京) 2011年5月14日
- ⑦ブルーベリー葉抽出物による脂肪細胞の機能制御と炎症予防: ○中村崇弘、梁井綾香、平原秀秋、中原徳昭、山崎正夫、西山和夫: 日本栄養食糧学会 (佐賀) 2011年9月4日
- ⑧肝ガン細胞における共役リノール酸の致死作用: ○野見山将太、山崎正夫、岡本威明、須田泰司、榊原陽一、水光正仁、西山和夫: 日本農芸化学会 (宮崎) 2011年9月17日
- ⑨ ナノエマルジョン化共役リノール酸の体内動態と培養肝ガン細胞の増殖に及ぼす影響: ○木下和昭、茨木佳代、板倉祥子、西片奈保子、清水正高、窄野昌信、山崎正夫、西山和夫: 日本農芸化学会 (宮崎) 2011年9月17日
- ⑩ Genistein の ATL 細胞増殖抑制作用における Akt 経路の関与: ○峰善広、西村海里、

榊原陽一、水光正仁、森下和広、山崎正夫、
西山和夫：日本農芸化学会(宮崎) 2011年
9月17日

⑪ α リポ酸が膀胱ガン細胞の悪性形質にお
よぼす影響：○山崎正夫、岩瀬将弘、西山
和夫：第5回 α リポ酸研究会(神戸) 2011
年10月14日

⑫ α リポ酸の膀胱ガン細胞に対する浸潤、
転移抑制作用：○岩瀬将弘、河野和生、山
崎正夫、水光正仁、榊原陽一、西山和夫：
日本油化学会フレッシュマンサミット
OSAKA 2011年11月5日

⑬ 低酸素下における脂肪酸による抗ガン作
用機構の解明：○長友琢、松山哲也、池保
有理、加藤恵美子、西山慧、山崎正夫、西
山和夫：日本油化学会フレッシュマンサミ
ットOSAKA 2011年11月5日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 正夫 (YAMASAKI MASAO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：