

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700937

研究課題名(和文) 脂質酸化物を標的としたメタボリックシンドローム病態解明と食品因子の機能評価

研究課題名(英文) The study on the Functional Assessment of the Antioxidants in Food based on Lipid oxidation metabolites for the early detection of life-related diseases.

研究代表者

赤澤 陽子 (Akazawa, Yoko)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：50549897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病による急激な血糖値の上昇は、酸化ストレスを誘導することが知られているが、なかでも一重項酸素の発生と疾患の関与が示唆されている。そこで、一重項酸素特異的に生成するリノール酸酸化物HODEは酸化機構により6種類の異性体が存在し、一重項酸素による非ラジカル的酸化では9-EZ, 10-EZ, 12-ZE, 13-ZE-HODEの4種類が生成する。HODEの前処理により細胞保護効果が認められ、その効果は異性体種によって異なった。またそのメカニズムはNF-E2 related factor 2 (Nrf2)の核内移行を介した抗酸化機能の活性化の関与を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have studied the biological significance of lipid oxidation metabolites by performing cell line. They can exert adaptive response under oxidative stress while they may be yielded depending on the diseases. Lipid oxidation products, which can exert both deleterious and cytoprotective effects by modifying proteins and their function, are considered to be cellular regulatory factors. The oxidation of linoleate metabolites by singlet-oxygen leads to the formation of the HODE isomers. 10-EZ-HODE and 12-ZE-HODE induce antioxidants and the adaptive response to reduce oxidative damage.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活 脂質酸化 細胞応答

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い、多くの人々がインスリン抵抗性・糖尿病・動脈硬化などを特徴としたメタボリックシンドロームを発症するが、それらの疾患の主要原因が肥満に起因するケースがある。肥満によって肥大化した脂肪組織にはマクロファージ(M $\phi$ )細胞の浸潤・集積が起こり、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )や Interleukin-6(IL-6)に代表される炎症性サイトカインの産生が亢進する。これらは脂肪組織からのアディポネクチンなど抗炎症性サイトカイン産生の減少を引き起こす。このようなアディポサイトカイン分泌異常はさらなるM $\phi$ 細胞の集積と脂肪組織における慢性の炎症状態や酸化ストレスを引き起こし、メタボリックシンドロームの発症・進行を誘導すると考えられる。メタボリックシンドロームと酸化ストレスに関する研究は、糖尿病や動脈硬化などの炎症性疾患を中心に進められている。疾病の進行度合いを示す指標として、生体内に豊富に存在する脂質が注目され、脂質酸化物は生体内のレドックスバランスを示すパラメーターになると考えられる。

### 2. 研究の目的

肥満は高血圧や糖尿病の生活習慣をはじめとして、多くの疾患のリスクファクターとなる。肥満により肥大化した脂肪細胞では種々の刺激により炎症や酸化ストレスを誘発し、動脈硬化などの炎症性疾患の引き金となりうる。本提案課題では脂肪細胞炎症モデルにおけるアディポサイトカイン分泌や酸化ストレスに対する機能性食品因子の効果を解析し、メタボリックシンドローム発症・進行を予防する食品因子の評価を目的とした。

一方で、糖尿病による急激な血糖値の上昇は、酸化ストレスを誘導することが知られているが、なかでも一重項酸素の発生と疾患の関与が示唆されている。そこで、一重項酸素特異的に生成する脂質酸化代謝物である、リノール酸酸化物(ヒドロキシリノール酸:HODE)の細胞応答を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 炎症モデルにおける機能性食品因子の効能評価

脂肪分化細胞を用いて炎症モデル実験系を構築し、機能性食品因子を付与することによる炎症および酸化ストレスの抑制効果を検討した。マウス脂肪細胞(3T3-L1)を用いて、TNF $\alpha$ 刺激やマクロファージ細胞との共培養による炎症モデル系を構築を目的とした。それぞれの刺激の濃度および各時間における炎症性マーカー(Interleukin-6や Monocyte-chemoattractant protein-1)、酸化ストレス(脂質酸化物(ヒドロキシリノール酸・ヒドロキシコレステロール等)や活性酸素種)、遊離脂肪酸への影響を測定した。

#### HODE 異性体の細胞応答メカニズム解明

培養細胞(HaCaT:ヒト表皮細胞)を用いて、HODEが細胞へどのような影響を及ぼすかを分子生物学的に調査した。細胞保護作用は、HODE添加後に過酸化水素で酸化ストレスを負荷し、その後の生細胞数を計測した。細胞応答は、DNAアレイ解析やRT-PCR法やウエスタンブロット法により抗酸化物質の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 炎症モデルにおける機能性食品因子の効能評価

マウス脂肪細胞(3T3-L1)を用いて、TNF $\alpha$ 刺激やマクロファージ細胞との共培養による炎症モデル系において、ケルセチン、カフェ酸フェニチルエステル(CAPE)およびビタミンE類( $\alpha$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\alpha$ -トコトリエノール、 $\gamma$ -トコトリエノール)による、炎症抑制効果について検討を行った(図1)。

脂肪細胞へ分化誘導後10日目の3T3-L1細胞にTNF $\alpha$ を添加することで、一過的なIL-6とMCP-1 mRNAレベルの上昇とアディポネクチン mRNAレベルの低下が認められた。さらにCAPEとケルセチンの炎症に対する効果を評価するため、脂肪細胞へ分化させた3T3-L1細胞に、細胞毒性が認められない濃度のCAPEまたはケルセチンの前処理後にTNF $\alpha$ 刺激を行い、IL-6、MCP-1とアディポネクチンのmRNAレベルをリアルタイムPCRにより測定した。その結果、CAPEおよびケルセチンの前処理により濃度依存的なIL-6上昇の抑制効果が認められた(図2)。しかし、MCP-1およびアディポネクチンに対して効果は認められなかった。CAPEとケルセチンはIL-6発現に参与する転写因子Nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)の抑制効果が知られている。CAPEとケルセチンを前処理することで、TNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの核内移行が抑制されたことが示唆された。

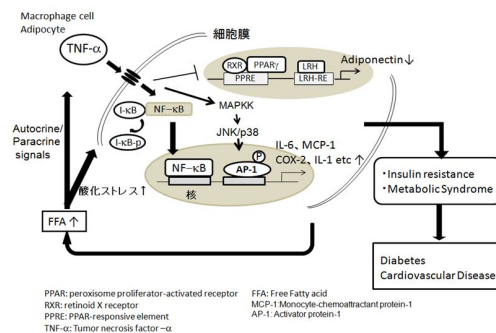
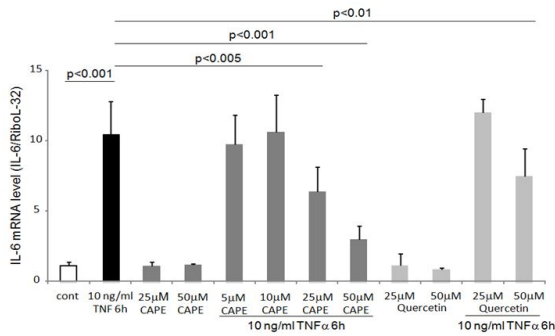


図1 TNF $\alpha$ 刺激によるシグナル伝達

肥満によって肥大化した脂肪組織にはマクロファージ(M $\phi$ )細胞の浸潤・集積が起こり、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )や Interleukin-6(IL-6)に代表される炎症性サ

イトカインの産生が亢進する。その結果、脂肪組織からのアディポネクチンなど抗炎症性サイトカイン産生の減少が引き起こされる<sup>1)</sup>。このようなアディポサイトカイン分泌異常はさらなるM 細胞の集積と脂肪組織における慢性の炎症状態や酸化ストレスを引き起こし、メタボリックシンドロームの発症と誘導すると考えられる

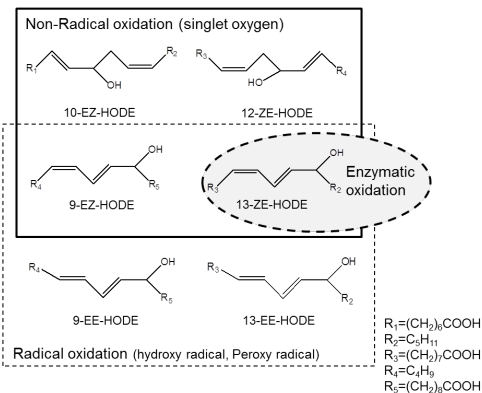


**図2 CAPE とケルセチンによる IL-6 発現抑制効果**

脂肪細胞へ分化 11 日目の 3T3-L1 細胞に 5-50  $\mu\text{M}$  CAPE と 25, 50  $\mu\text{M}$  ケルセチンを 24 時間処理し、培地を交換した後、10 ng/ml TNF $\alpha$  を添加した。6 時間後に細胞を回収し、IL-6 mRNA の変動をリアルタイム PCR により解析した。(ANOVA, Tukey)

**HODE 異性体の細胞応答メカニズム解明**

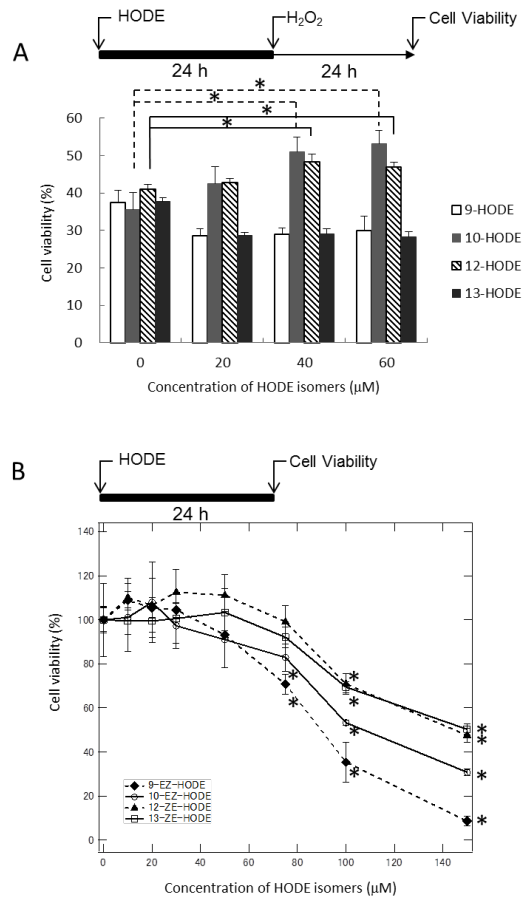
過酸化水素により誘導される細胞死に対して、HODE(図 3)の前処理により細胞保護効果が認められ、その効果は異性体種によって異なった(図 4)。また、細胞保護作用が認められた HODE 異性体では、NF-E2 related factor 2 (Nrf2)の核内移行を介した GSH 含量の増加と HO-1 の発現上昇が認められ、抗酸化機能の活性化が明らかとなった(図 5)。以上の結果から HODE は異性体種によって異なる細胞応答を誘導し、その細胞保護作用には抗酸化能の上昇が寄与していると示唆された。



**図3 HODE 異性体の構造**

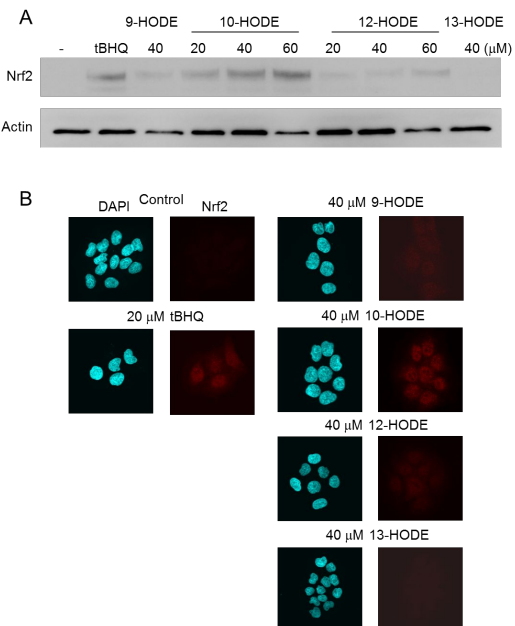
リノール酸は生体内において、酵素的・ラジカルの・非ラジカルのに酸化され、6 つの異性体を生成する。本提案ではこれら異性体

の生体内の生理意義を探索する。



**図4 10-EZ-HODE と 12-ZE-HODE の酸化障害に対する防御機能と細胞毒性**

A HaCaT 細胞に HODE 異性体を 24 時間処理し、培地を交換した後、250  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した。さらに 24 時間後に生細胞率を測定した。B HaCaT 細胞に HODE 異性体を 24 時間処理後に生細胞率を測定した。



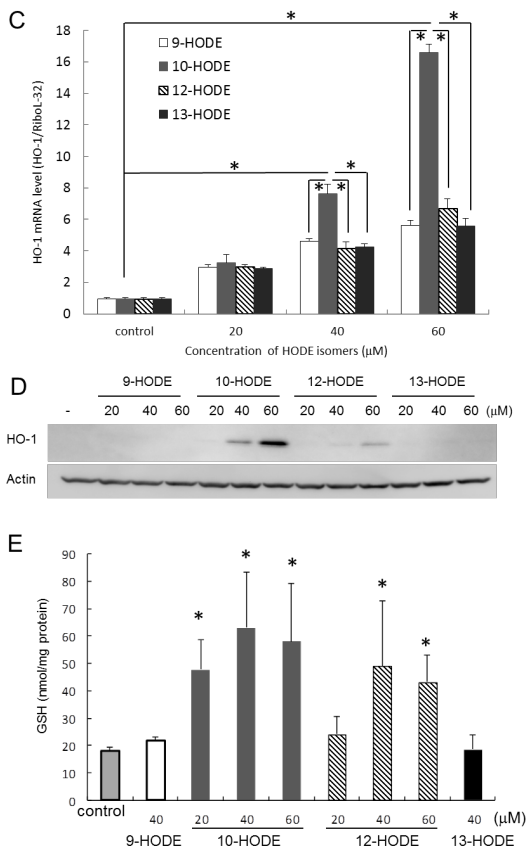


図4 10EZ-HODE および 12ZE-HODE による Nrf2 活性化

10EZ-HODE および 12ZE-HODE は Nrf2 核内移行の誘導を介して、抗酸化酵素(グルタチオン合成酵素等)の誘導を示した。9EZ-HODE および 13ZE-HODE にはこのような作用は認められなかった

A および B Nrf2 の核内移行 (A: ウェスタンブロット解析 B: 細胞染色)

C および D HO-1 の発現亢進 (C: 定量 PCR 解析 D: ウェスタンブロット解析)

E グルタチオンの上昇

非ラジカル的に生成する 10EZ-HODE および 12ZE-HODE はラジカル的に生成する 9EZ-HODE と 13ZE-HODE とは異なる細胞応答を示すことを明らかとした。10EZ-HODE および 12ZE-HODE は生体防御機構である転写因子 Nrf2(NF-E2-related factor-2)の核内移行の誘導を介して抗酸化機能を高める、いわゆる「適応応答」を示すことを認めた。9EZ/13ZE-HODE と 10EZ/12ZE-HODE の構造的な大きな違いである「共役ジエン」の有無がこのような応答性の差に関与すると考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

赤澤陽子、七里元督、西尾敬子、萩原義久、二木鋭雄、吉田康一「リノール酸酸化物により誘導される酸化ストレス耐性の応答メカニズム」第66回日本酸化ストレス学会 2013年6月13日-14日

〔図書〕(計 1 件)

吉田康一、七里元督、赤澤陽子、梅野彩、室登美和俊「」ビタミン 88 巻 2 号(2月)2014

〔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

赤澤陽子 (YOKO AKAZAWA)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・ストレスシグナル研究グループ・研究員

研究者番号: 50549897

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: