

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700828

研究課題名(和文)食品機能成分によるT細胞への効果と新たなメタボリックシンドローム発症機序の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the effect of T-cell and mechanism of metabolic syndrome by dietary composition

研究代表者

首藤 恵泉 (SHUTO, Emi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：10512121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームは、糖尿病や脳梗塞等の重篤な疾患に進展する基礎疾患である。近年、脂肪組織に浸潤したT細胞が炎症性マクロファージの分化を調節し、脂肪組織および全身の慢性炎症を決定づけることが知られるようになった。これまで我々は、大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンとT細胞機能に関する研究を行ってきた。そこで、脂肪組織に浸潤する免疫細胞に着目し、大豆イソフラボンがどのように肥満に伴う慢性炎症状態に影響するのか検討したところ、大豆イソフラボンは、脂肪細胞におけるマクロファージの沈着を抑制し、糖代謝および脂質代謝を改善することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is the underlying disease proceed critical disorder, diabetes, stroke, et al. Nearly, it was reported that T cell-infiltrated in adipose tissues was regulated differentiation of macrophage, so macrophage was dictated chronic inflammation in adipose tissue and whole-body. We ever reported about immune function of soy isoflavone. In this study, we examined effect of Soy isoflavone on the inflammation in diet induced obesity mice. Soy isoflavones were ameliorated glucose metabolism and lipid metabolism, and declining trend to accumulation of body fat. In particular, Equol was significantly inhibited expression of gene associated macrophage. Thus, it is suggested that soy isoflavone might be possible to prevent metabolic syndrome.

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：メタボリックシンドローム 大豆イソフラボン 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

「炎症」とは、生体内外から有害なストレスを受けた時に生じる生体防御反応であり、免疫学的分野においては、感染症や外傷など短時間で起こる速い反応、いわゆる「急性炎症」と捉えられてきた。しかし、冠疾患など動脈硬化性疾患において、動脈硬化巣における血管内皮下へのマクロファージやリンパ球の浸潤および炎症性サイトカインである IL-6 の発現亢進などが見られたことから、これらの慢性疾患の発症に炎症が深く関与していることが明らかとなり「慢性炎症」と理解されるようになった。さらに、内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームにおいても、TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインの発現が亢進するとともに、インスリン抵抗性が引き起こされ糖尿病の発症につながるということが明らかとなった。これまで炎症が関与していると思われなかった糖尿病や肥満といったメタボリックシンドローム、心血管疾患、骨粗鬆症、癌、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患、自己免疫疾患などの基盤病態に、炎症性サイトカインや免疫細胞が深く関与することが報告され、様々な生活習慣病は「慢性炎症」から生じているという概念が注目されている。2009 年には、肥満・メタボリックシンドロームは免疫細胞である T 細胞が根本的な病態制御機構を司るという衝撃的な報告がなされた (*Nat Med.* 2009;15: 914-920, 921-929, 930-939, 940-945)。これらの論文によると、食餌誘導性肥満マウスにおいて、マクロファージの集積よりも先に CD8⁺エフェクター T 細胞が精巣上体脂肪に多数浸潤する一方で、CD4⁺ヘルパー T 細胞および炎症を終息へ向かわせる制御性 T 細胞 (Treg) が減少していることが報告された。つまり、脂肪組織に浸潤した T 細胞が炎症性マクロファージの誘導と活性化を促進させることにより、脂肪組織および全身の慢性炎症

を誘導することを示したものであり、実際に脂肪組織の悪玉 T 細胞を除去することで全身の慢性炎症が改善しインスリン抵抗性が改善することも報告された。

CD4⁺ヘルパー T 細胞は、INF- γ を産生する Th1 細胞と IL-4 を産生する Th2 細胞の細胞集団に分化することが知られている。これまでに我々は、大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンと T 細胞機能に関する研究を行ってきており、大豆イソフラボンの主成分であるゲニステインは Th1 細胞から産生される IFN- γ と Th2 細胞から産生される IL-4 を抑制することによってサイトカイン産生抑制に関するシグナル伝達経路に作用し (Sakai T, et al. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52:293-6, 2006)、ダイゼインから腸内細菌によって代謝され産生されるエクオールは Th2 細胞から産生される IL-13 依存性のメカニズムで抗原特異的 IgE 抗体産生を上昇させる (Sakai T, et al. *J Nutr Sci Vitaminol.* 56:72-76, 2010) ことを見出しており、大豆イソフラボンは構造が類似していても免疫機能に及ぼす影響は異なる可能性があることを見出している。

2. 研究の目的

大豆イソフラボンの生理機能に関しては、脂質代謝、骨代謝、心血管疾患および悪性腫瘍への影響に関する研究が多数行われており、臨床研究に発展したのも多数報告されている。しかしながら、大豆成分と免疫機能に関する研究は少ない。本研究では、これまで報告されている大豆イソフラボンの効果に加え、肥満した脂肪組織における「慢性炎症」に着目し、大豆イソフラボンによる脂肪組織に浸潤する T 細胞への効果とそのメカニズムについて明らかにすることにより、食品機能成分による新たなメタボリックシンドロームの予防および治療の応用研究に貢献するとともに、新たなメタボリックシンド

ロームの発症機序を解明する基礎的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

4週齢の雄 C57BL/6J マウスを、コントロール群と各大豆イソフラボン投与群に分け、脂質エネルギー比 60%の高脂肪食 HFD-60 で 16 週飼育した。各大豆イソフラボンは 20mg/kg/day となるように調整し、ゾンデにて毎日経口投与を行った。

各大豆イソフラボン投与開始 12 週目に経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った。18 時間絶食後、ブドウ糖 1.5g/kg 体重を経口投与した。0、30、60、120 分後に尾静脈より血液を採取し、血糖を測定した。また、各大豆イソフラボン投与開始 15 週目にインスリン負荷試験(ITT)を行った。8 時間絶食後、インスリン 0.75U/kg 体重を腹腔内投与し、0、30、60、90、120 分後に同様に測定した。

解剖前日には、ALOKA ラシータ(日立アロカメディカル株式会社)を用いて、体組成を測定した。

解剖時に採取した血清より、T-Chol、TG、NEFA および MCP-1 を酵素学的に測定した。

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて精巣上体脂肪から RNA を抽出し、total RNA (2µg) から cDNA を合成した。mRNA の発現量解析は、Real-Time PCR 法により定量を行った。

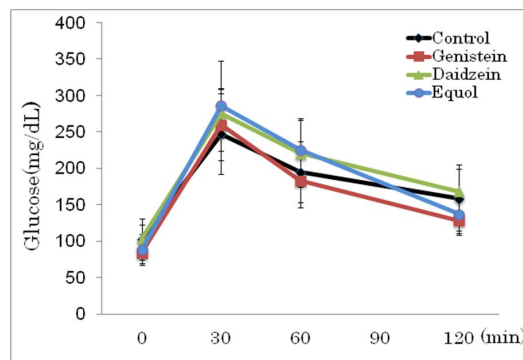
データは、平均±標準誤差として示した。群間の統計的有意差(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$)は多重比較検定 Bonferroni を用いて統計解析を行った。

4. 研究成果

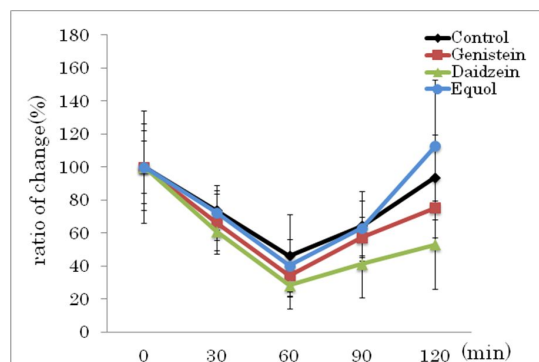
摂餌量および体重は、コントロール群と比較して各大豆イソフラボン投与群において有意差が認められなかった。

イソフラボン投与開始 12 週目に OGTT を行ったところ、ゲニステイン群においてグル

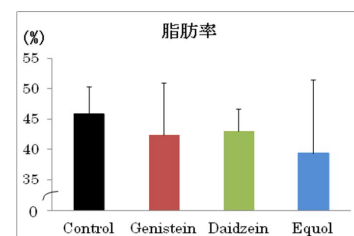
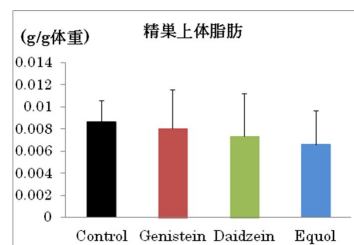
コース投与後 60 分値および 120 分値に減少傾向、エクオール群においては 120 分値に減少傾向が見られた。さらに、血糖値曲線化面積(AUC)についても検討したところ、ゲニステイン群で減少傾向が見られた。



さらに、イソフラボン投与開始 15 週目に ITT を行ったところ、ゲニステイン群およびダイゼイン群に減少傾向が見られた。

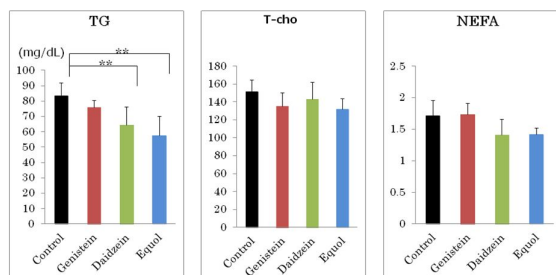


解剖前日に CT を用いて体組成について評価したところ、精巣上体脂肪組織重量および体脂肪率において全ての大豆イソフラボン投与群に減少傾向が見られた。

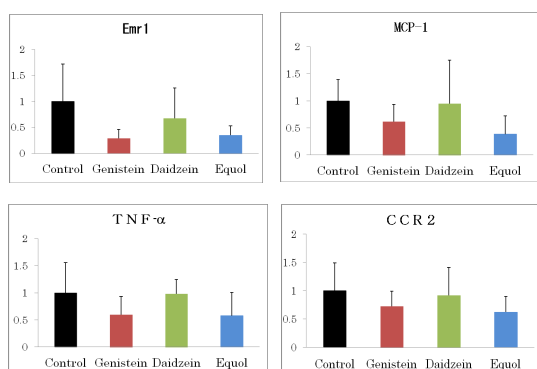


脂質代謝については、TG はダイゼイン群

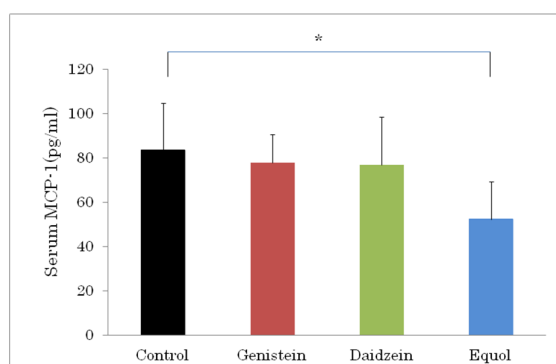
とエクオール群で有意な減少が見られた。T-Chol は全てのイソフラボン投与群で減少傾向が見られた。NEFA はエクオール群に減少傾向が見られ、ダイゼイン群においては有意な減少が見られた。



精巢上体脂肪から抽出した mRNA を用いてマクロファージの指標となる Emr1、単球・マクロファージの遊走化因子である MCP-1、MCP-1 の受容体である CCR2、炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子発現について検討を行ったところ、有意差が見られないもののゲニステイン群とエクオール群において減少傾向が見られた。



さらに、血清 MCP-1 濃度においてエクオール群に有意な減少が見られた。



以上のことから、イソフラボンの種類によって作用メカニズムが異なることが示唆された。ゲニステインには血糖値を低下させイン

スリン感受性を改善する作用があり、ダイゼインおよびエクオールには脂質代謝を抑制する作用を有し、さらに、全ての大豆イソフラボンにおいて脂肪組織におけるマクロファージの沈着を抑制する可能性があることが示唆された。特にエクオールは、他のイソフラボンと比較して、Emr-1、MCP-1 の遺伝子発現が優位に抑制される結果を得た。さらに、血清中の MCP-1 の濃度においても有意な減少が見られたことから、エクオールにはマクロファージの浸潤を抑制し脂肪蓄積を抑制する作用が強いことが示唆された。内臓脂肪の増加は、糖尿病や心血管疾患を始めとするメタボリックシンドロームを引き起こすことが知られている。また、ダイゼインからエクオールを産生できない人は糖尿病や肥満といった生活習慣病に罹患しやすいことも報告されていることから、エクオールは脂質代謝動態を変化させることにより、肥満やメタボリックシンドロームに影響を与えることが示唆された。さらに、メタボリックシンドローム発症早期の段階で、脂肪組織および全身の炎症状態を抑制することによりメタボリックシンドロームを予防できる可能性があることが示唆された。しかし、これらのメカニズムについて明らかとなっていないため、今後は詳細な作用機序の解明が求められる。

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 2 件)

Nakamoto M, Sakai T, Shuto E, Aki N, Kosugi C, Hata A, Shinoda K, Kuwamura Y, Minagawa T, Ichihara T, Tamura A, Funaki M. Period between Dinner and Bedtime Is Related to Hypertension. J Jpn Soc Nutr Food Sci.66,2013:185-193. 査読有

DOIなし

Sakai T, Taki T, Nakamoto A, Shuto E,
Tsutsumi R, Toshimitsu T, Makino S,
Ikegami S. *Lactobacillus plantarum* OLL-
2712 Regulates Glucose Metabolism in
C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *J Nutr
Sci Vitaminol*.59,2013:144-147. 査読有
DOI:10.3177/jnsv.59.144

〔学会発表〕(計 1 件)

喜岡美久、首藤恵泉、酒井徹 実験的自
己免疫性脳脊髄炎マウス(EAE)における大豆
イソフラボンの効果 第 60 回日本栄養改善
学会学術総会 2013 年 9 月 12-14 日 神戸
国際会議場(兵庫県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

首藤 恵泉 (SHUTO, Emi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・講師

研究者番号：10512121

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：