

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750037

研究課題名(和文) 血液中リゾリン脂質の産生制御を介して肥満抑制効果を発揮する機能性食品の開発

研究課題名(英文) Development of functional food with anti-obesity effect through the inhibition of lysophospholipid production in blood

研究代表者

盛重 純一 (Jun-ichi, Morishige)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50423405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)とスフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、細胞内外でのシグナル分子として細胞の機能発現に重要な働きを担う脂質分子である。本研究では、様々な病気につながる肥満にLPAあるいはS1Pの産生異常が関係すると想定し、ポリフェノール類で生体内のLPAあるいはS1P量を是正することで脂肪新生を抑制できるか検討した。その結果、LPAとS1Pの両方または何れか一方の産生酵素の活性を阻害したケルセチン、フィセチン、ルテオリン、レスベラトロールおよびクルクミンを前駆脂肪細胞に添加することで脂肪細胞への分化およびトリアシルグリセロール合成が抑制されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine 1-phosphate (S1P) are bioactive lipid mediators that are crucial for the regulation of diverse biological processes. We assumed that abnormal production of LPA and S1P contribute to fat development in obesity, which leads to various diseases such as arteriosclerosis, coronary artery disease, diabetes and hypertension. By screening from commercially available polyphenols, we found that quercetin, kempherol, robinetin, catekin, propyl gallate, luteolin, resveratrol, curcumin, myricetin have inhibitory activities to LPA- and/or S1P-producing enzymes. In these polyphenols, quercetin, fisetin, luteolin, resveratrol and curcumin prevent cell differentiation and triacylglycerol synthesis, showing the foods contained these polyphenols are useful as anti-obesity food.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リゾホスファチジン酸 スフィンゴシン1-リン酸 ポリフェノール 肥満

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (LPA) はグリセロールに脂肪酸とリン酸が、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) はスフィンゴシンにリン酸がそれぞれ結合した構造のリゾリン脂質であり、特異的受容体を介して様々な細胞の機能発現に寄与している。LPA と S1P は、共に数百 nM 程度の濃度で循環血液中に存在しており、その産生経路として、LPA は、血液中のオートタキシン (ATX) のリゾホスホリパーゼ D (LysoPLD) 活性によりリゾホスファチジルコリン (LPC) から産生される経路、S1P は、細胞内でスフィンゴシンキナーゼ (SphK) によりスフィンゴシンから産生される経路が知られている。

脂肪組織は、血液中の ATX の主要な分泌組織の 1 つであり、肥満マウスでは非肥満マウスと比べて血液中の LysoPLD 活性はおよび LPA 濃度が高いことが明らかとなっている。LPA には前駆脂肪細胞の増殖を促進して肥満を亢進させる作用がある一方で、前駆脂肪細胞の分化に重要なペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) 2 (主に脂肪細胞に発現する PPAR アイソフォーム) 発現のダウンレギュレーションを引き起こし、脂肪新生を抑制する作用も持つことが報告されている。また、脂肪組織中の SphK の発現レベルおよび血漿中の S1P レベルも肥満マウスでは非肥満マウスより高いこと、S1P は脂肪組織が肥大化する際に必須である血管新生を誘導することやインスリン抵抗性を惹起する TNF- α の発現を誘導することが明らかとなっている。このように LPA と S1P が共に脂肪組織内あるいはその近傍で産生され、脂肪組織に対する生理作用も有することから、これらは脂肪細胞の生理的な制御因子として機能している可能性が考えられるがその詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、様々な病気につながる肥満にリゾリン脂質メディエーターの LPA と S1P の産生異常が関わっているという観点から、抗肥満作用が期待できる機能性食品の開発を目標とする。そのために、様々な酵素の阻害活性や血管新生の阻害効果が知られるポリフェノール類に着目し、ポリフェノール類が LPA や S1P の生合成に関わる酵素の阻害を介し、肥満につながる脂肪細胞の分化を抑制できるかを立証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

脂肪細胞への分化

未分化のマウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞 (DS PHARMA BIOMEDICAL) を 0.2×10^5 cells/12 well に播種し、10% ウシ血清 (BS) 含有 DMEM でコンフルエントに達するまで培養した。コンフルエント後、さらに 2 日間 10% BS 含有 DMEM で培養した後、脂肪細胞への分化誘導用の

MDI 培地 (10%ウシ胎児血清 (FBS), 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン, 10 μ g/mL インスリンおよび 1 μ M デキサメサゾン含有 DMEM) に交換し、さらに 2 日間培養した。2 日後、インスリン培地 (10% FBS および 10 μ g/mL インスリン含有 DMEM) に交換し、その後は 2 日毎に同培地に交換しながら分化誘導後 10~12 日目まで培養した。試験化合物を添加する実験では、分化刺激以降の全ての培地に試験化合物を加えて細胞を培養した。

コンディションメEDIUMの調製

脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞の培地を血清不含 DMEM に交換し、24 時間後に培養上清を回収した。遠心分離後、上清部分をコンディションメEDIUMとして実験に使用した。

(2) lysoPLD 活性測定

lysoPLD 活性測定 1

3T3-L1 細胞のコンディションメEDIUM 50 μ L に 600 μ M 16:0-LPC (0.25% BSA 含有生理食塩水に溶解) 25 μ L, 生理食塩水 25 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした (一次検定)。反応終了後、反応混液 0.02 mL に二次検定用混合液 (0.93 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.5 mM 3-(*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン, 0.067 unit/mL 西洋ワサビペルオキシダーゼ, 1 unit/mL コリンオキシダーゼ) 0.58 mL を加え 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。この試験液の蛍光強度 (励起波長: 320 nm, 測定波長: 405 nm) を Fluoroskan AscentTM FL (Thermo) で測定した。lysoPLD 活性は、塩化コリンを用いて作製した検量線に基づき算出した。

lysoPLD 活性測定 2

lysoPLD 活性測定 1 と同様の条件で反応させた試料 0.05 mL に Bligh-Dyer 法の二相系となるようにクロロホルム、メタノールと水を加えた。内部標準物質の 17:0-LPA (0.645 nmol) を加えた後、上層の水/メタノール層の pH が 9~10 となるよう 28%アンモニア水を加え遠心分離した。下層のクロロホルム層を除去し、残った水/メタノール層にクロロホルムとメタノールの混合液 (17:3, v/v) を加えて攪拌・遠心分離後、再び下層を除去した。洗浄後、クロロホルムとメタノール混合液 (17:3, v/v) を加えて二相系とし、1 mM Phos-tag 溶液 0.01 mL を加えて遠心分離した後にクロロホルム層を回収した (Phos-tag 抽出画分)。有機溶媒を窒素気流下で除去した後、0.1%アンモニア含有メタノールに再溶解した。この試料溶液から 10 μ L 分取し、0.1 mM ⁶⁸Zn-Phos-tag 溶液とケイ酸 (100 mg/mL メタノール) 混和し、2' 4' 6' -トリヒドロキシアセトフェノン (10 mg/mL アセトニトリル) をマトリックスとして、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF/MS) (Applied Biosystems) に

供した。検出は正イオンモードで行った。生成した 16:0-LPA と 17:0-LPA のピーク高比を基にして lysoPLD 活性を算出した。

lysoPLD 活性測定 3

3T3-L1 細胞のコンディションメディウム 10 μ L および DMSO に溶解した試験化合物 10 μ L を緩衝液 (0.5 nmol FS-3, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) に加え (総量 0.1 mL), 37 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートした。インキュベート終了後, 反応混液の蛍光強度を Fluoroskan AscentTM FL (Thermo) で測定した (励起波長: 485 nm, 発光波長: 538 nm)。データは, コントロールの lysoPLD 活性に応じて基準化し, % で表示した。

(3) SphK 活性測定

SphK 活性測定 1

酵素源には SphK1 を過剰発現させた Cos-7 細胞, または 3T3-L1 細胞のサイトゾルを, 基質には 1-NBD-スフィンゴシンを用いた。DMSO に溶解した試験化合物 10 μ L を緩衝液 (1 nmol 1-NBD-スフィンゴシン, 1 mM ATP, 50 mM HEPES (pH 7.4), 15 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.005% Triton X-100, サイトゾル 5.5 μ g protein) に加え (総量 0.1 mL), 37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。インキュベート終了後, 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.5) 0.1 mL とクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 混合液 0.5 mL 加え, ボルテックスミキサーで攪拌後, 12,000 x g で 1 分間遠心分離した。上層 (0.1 mL) を 96 穴マイクロウェルプレートに分取して蛍光強度を Fluoroskan AscentTM FL (Thermo) で測定した (励起波長: 485 nm, 発光波長: 538 nm)。データは, コントロールの SphK 活性の変動に応じて基準化し, % で表示した。

SphK 活性測定 2

酵素源には SphK1 を過剰発現させた Cos-7 細胞のサイトゾルを, 基質には C18 スフィンゴシンを用いた。DMSO に溶解した試験化合物 10 μ L を緩衝液 (5 nmol, スフィンゴシン, 10 mM ATP, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.8 mM EDTA, 12 mM NaF, 32 mM β -グリセロリン酸, 0.8 mM *o*-バナジン酸, サイトゾル 10 μ g protein) に加え (総量 0.1 mL), 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応終了後, Bligh-Dyer 法の二相系となるようにクロロホルム, メタノールと水を加えた。内部標準物質の C17 S1P (0.645 nmol) を加えた後, 上層の水/メタノール層の pH が 2~3 となるよう 6 N 塩酸を加え遠心分離した。以降は lysoPLD 活性 2 と同様の操作を行い, 得られた Phos-tag 抽出画分を MALDI-TOF MS に供して C17 S1P と C18 S1P のピーク高比から SphK1 活性を算出した。

(4) TG 測定

3T3-L1 細胞を回収後, Bligh-Dyer 法の二相系となるようにクロロホルム, メタノールと水を加えた。遠心分離後, クロロホルム層を回収した。クロロホルム層の有機溶媒を窒素気流下で除去後, 10% Triton X-100/2-ブロパノール 0.1 mL に再溶解した。この試料溶液 5 μ L を 96 穴マイクロウェルプレートに分取し, LabAssayTM Triglyceride (Wako) のプロトコルに準じた操作を行い, 反応終了後に 600 nm での吸光度を MULTISCAN GOTM (Thermo) で測定した。TG 量は, トリオレインを用いて作製した検量線に基づき算出した。また, TG 測定に使用しなかった試料溶液 90 μ L を用いてリン量を Bartlett 法により求め, リン脂質量とした。

(5) qPCR

3T3-L1 細胞に TrizolTM 試薬 (ライフテクノロジーズ) を加え, 充分懸濁した後に細胞を回収した。RNA をプロトコルに従って回収し, 微量分光光度計 NanoDrop LiteTM (Thermo) で定量した。RNA (2 μ g) から cDNA を合成 (ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を使用) し, サイバークリーンを用いた qPCR 法により種々の遺伝子の mRNA を定量した。データは, GAPDH の mRNA 量に応じて基準化し, コントロール (DMSO) に対する % で表示した。

4. 研究成果

(1) 培養条件の検討

未分化の 3T3-L1 細胞 (前駆脂肪細胞) を脂肪細胞へ分化させる条件として, コンフルエントに達してさらに 2 日間培養した細胞を MDI 培地で分化誘導し, その後インスリン培地で 2 日, その後は 2 日毎に培地を交換しながら脂肪細胞が成熟するまで 10% FBS 含有 DMEM で培養する方法が一般的に用いられる。本研究でも当初はこの条件で分化誘導していたが, 脂肪細胞が成熟するまで 20 日以上も必要であり, また成熟の程度もこれまで報告されていたものよりも低かった。そこで分化条件を再度検討し, 分化誘導 4 日目以降もインスリン培地で培養することで, 10 日程度で十分に成熟するようになった。また PPAR γ , アディポネクチン, リポタンパク質リパーゼ (LPL) および脂肪細胞特異的脂肪酸結合タンパク質 2 (aP2) などの脂肪細胞特有の遺伝子の mRNA レベルは, 分化日数に応じて著しく上昇することも確認した。このとき, ATX の mRNA レベルは, 分化 4 日目以降に上昇していき, 一方 SphK1 の mRNA レベルに分化刺激後 4 日目までは上昇したが, その後は低下して 10 日目には分化前のレベルに戻るパターンを示した。

(2) ポリフェノールによる lysoPLD 活性阻害

細胞外の lysoPLD 活性は, 脂肪細胞への分化日数に依存して上昇した。この分化 12 日目のコンディションメディウムを酵素源とし, 基質に FS-3 (echelon) を用いて lysoPLD

活性を阻害できるポリフェノールの探索を行った。その結果、フラボノール類のモリン、ミリセチン、フィセチン、スチルベノイド類のレスベラトロール、フラボン類のルテオリン、クルクミン系のクルクミンが 50 μM で約 50%, 100 μM で約 60~70%, lysoPLD 活性を阻害した。また、フラボノール類のケルセチン、ケンフェロール、ロビネチン、フラバノール類のカテキンとプロピルガレートにも 100 μM で約 40%の阻害活性が見られた。このときケルセチンの配糖体であるルチンとイソクエルシトリンではケルセチンと比べ阻害活性が弱くなる傾向にあった(図 1)。また、16:0-LPC を基質に用いて産生された 16:0-LPA を質量分析法で定量する lysoPLD 活性測定系でも同様の結果が得られた。

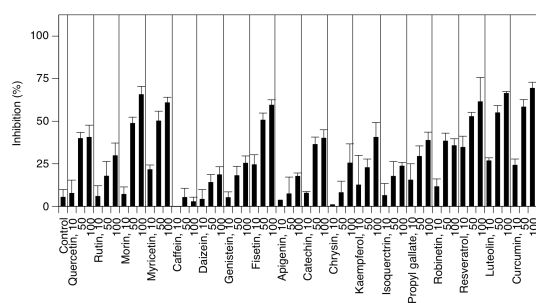


図 1. lysoPLD 活性に対するポリフェノール類の阻害率 (ポリフェノールの使用濃度の単位は μM である)

(3) ポリフェノールによる SphK1 活性阻害

3T3-L1 細胞のサイトゾルを酵素源として SphK1 活性を測定したところ、反応時間に依存した酵素活性の上昇は観察されたが、酵素活性自体がそれほど高くなかった。そこで SphK1 に対するポリフェノール類の阻害活性をより分かりやすくするため、Cos-7 細胞に SphK1 を過剰発現させ、そのサイトゾルを酵素源として利用した。基質に 1-NBD-スフィンゴシンを用いて SphK1 活性を阻害できるポリフェノールを探索した結果、ルテオリンが最も強く 10 μM で 35%, 50 μM で約 75%, 100 μM で約 90%の SphK1 の阻害活性を示し、次いでケルセチン、ミリセチン、フィセチン、プロピルガレートおよびロビネチンが 50 μM で約 30~50%, 100 μM で約 60~80%であった。また、lysoPLD の場合と同様にケルセチンの配糖体では阻害活性が低下していた(図 2)。

(4) ポリフェノールによる脂肪細胞分化抑制

まず分化誘導時から 3T3-L1 細胞に SphK の阻害剤、ジメチルスフィンゴシン (DMS) を添加して培養したところ、細胞内のトリアシルグリセロール量が用量依存的に低下し、細胞内 S1P 合成が細胞内トリアシルグリセロール合成に影響を及ぼすことが示された。次に、3T3-L1 細胞にポリフェノール類を添加し、分化 12 日目の 3T3-L1 細胞のトリアシルグリセロール量を比較した。その結果、SphK に対し

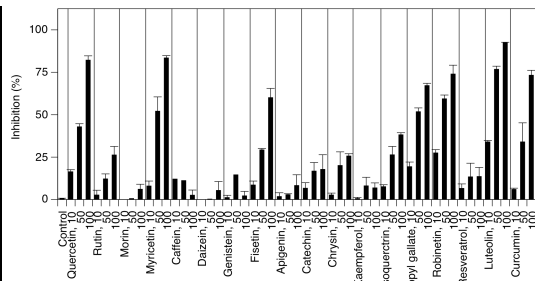


図 2. SphK1 活性に対するポリフェノール類の阻害率 (ポリフェノールの使用濃度の単位は μM である)

て阻害活性を示したクルクミンは 30 μM で、ケルセチン、フィセチンおよびルテオリンは 50 μM で、ミリセチンおよびプロピルガレートは 100 μM で細胞内トリアシルグリセロールレベルを約 90%減少させた。また、lysoPLD 活性に対してのみ阻害を示したレスベラトロールも 30 μM で約 60%, 50 μM で約 90%減少させた。ケルセチン配糖体のルチンやイソクエルシトリンを添加した細胞では、トリアシルグリセロール量に変化は観察されなかった。一方、モリンおよびカテキンは、細胞内トリアシルグリセロール量が増加する現象が見られた(図 3)。

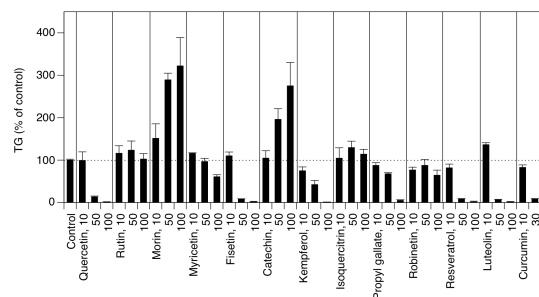


図 3. ポリフェノール類による細胞内トリアシルグリセロール量の変化 (ポリフェノールの使用濃度の単位は μM である)

細胞内トリアシルグリセロール量を低下させたケルセチン、フィセチン、ルテオリン、レスベラトロールおよびクルクミンを添加して分化させた 3T3-L1 細胞 (分化 12 日目) の種々の遺伝子の mRNA 量を qPCR で定量した。その結果、これらの細胞では何れも PPAR γ 、アディポネクチン、LPL、aP2 および ATX の mRNA 量が大きく低下していた。また、他の脂肪細胞特有の遺伝子と比べると SphK1 の mRNA の減少の程度は小さかった。

(5) スフィンゴシンアナログによる脂肪細胞分化抑制

3T3-L1 細胞に SphK 阻害薬の DMS (10 μM) を添加して培養すると細胞内のトリアシルグリセロール量が約 60%減少したが、その際に細胞のリン脂質量が約 250%増加する現象が観察された。DMS は、内在性スフィンゴ脂質の代謝物の 1 つでもあることから、細胞内

のスフィンゴ脂質代謝を変調させることでリン脂質合成やトリアシルグリセロール合成も変調できる可能性が考えられた。そこで3T3-L1細胞にスフィンゴシンおよびスフィンゴシンアナログ（スフィンガニンとFTY720）を添加して培養したところ、スフィンゴシンとスフィンガニンは30 μMで、FTY720は10 μMで細胞内トリアシルグリセロール量を大きく減少させた。また、スフィンガニンを添加した細胞では50 μMでもリン脂質含量に変化は見られなかったが、10 μM FTY720を添加した細胞ではDMSの場合と同様に総リン脂質が約2倍に増加する現象も見られた。今後、これらの細胞でどのリン脂質やスフィンゴ脂質が増減しているかを解析する必要があるが、これらの結果は、内在性のある特定のスフィンゴ脂質含量を変調させることでトリアシルグリセロール合成を抑えることができ、SphK以外の他のスフィンゴ脂質代謝酵素も肥満抑制のターゲットになる可能性を示唆しており興味深い。

(6)まとめと考察

本研究では、肥満が増悪する一因として、血液中のLPAおよびS1Pの産生異常が関連していると推定し、LPAおよびS1Pの産生を抑えれば肥満の亢進も抑えることができるのではないかという視点で研究を行った。その結果、LPAとS1Pの両方あるいは何れか一方の産生酵素の活性を阻害したポリフェノールには脂肪細胞の分化や脂肪新生を抑える作用を示すものがあることを明らかとし、これらポリフェノールを多く含む食品を日常より摂取することで肥満になりにくくなる可能性を示した。今後、動物モデルを用いて実際に抗肥満効果があるのか検討していきたい。また、脂肪組織が肥大化していく際には脂肪新生に加えて血管新生も必要となるため、こちらの観点からも検討していきたい。

また、本研究では、脂肪細胞のスフィンゴ脂質代謝を変調させることで脂肪新生を抑制できる可能性も見出した。これに関し、近年ではスフィンゴ脂質代謝でスフィンゴシンの上流に位置するセラミドが肥満と関連することが明らかとなっており、本研究で使用したスフィンゴシンアナログにより上流のセラミド代謝が抑制され、その結果として脂肪新生も抑制された可能性も考えられた。今後、スフィンゴ脂質全体のバランスがどのような作用機序で脂質新生に影響を及ぼしているのかについても検討していきたい。

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)

[学会発表](計 2 件)

Jun-ichi Morishige, Mai Urikura, Tamotsu Tanaka, Tohru Koike, Kiyoshi Satouchi and Tanihiro Yoshimoto: A

Simple Method for Isolation of Bioactive Phosphomonoester Phospholipids using Phos-tag-immobilized Bead (poster), KEYSTONE SYMPOSIA (A systems Biology of Lipid Metabolism), 2015年2月9-13日, Beaver Run Resort (Breckenridge, Colorado, USA)

盛重純一, 瓜倉真衣, 田中保, 吉本谷博, 小池透, 里内清: Phos-tag Toyopearl を用いた生理活性リン酸モノエステル型脂質の分析法の開発(口頭), 第55回日本脂質生化学会, 2013年6月6-7日, ホテル松島大観荘

6. 研究組織

(1)研究代表者

盛重 純一 (MORISHIGE JUN-ICHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 50423405