

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850132

研究課題名(和文) 海洋性ビタミンEによる生体内酸化ストレスに対する防御機能解析

研究課題名(英文) Physiological function of Marine-Derived Tocopherol (MDT)

研究代表者

別府 史章 (Beppu, Fumiaki)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：10707540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物に特徴的に存在するビタミンE(MDT)の効率的な抽出精製方法を確立し、代謝特性、脂肪細胞分化に対する影響、炎症抑制効果を明らかにした。

MDTは全身に広く分布するが、特に脂肪組織へ多く蓄積されることが確認された。前駆脂肪細胞3T3-L1に対して、分化を制御するPPAR、C/EBPの発現増加を介して分化を促進することが示された。MDT処理した3T3-L1およびマクロファージ様細胞RAW264.7の炎症性サイトカイン産生量の低減効果が認められた。およびその効果の一部は他のビタミンE同族体よりも強く、その作用機序や活性は化学構造に基づくMDTの特徴的なものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Physiological function of Marine-Derived Tocopherol (MDT), characteristically occurred in marine organisms was investigated in the present study.

First, we found that MDT is distributed in whole body tissues although the accumulated amount is less than α -tocopherol. The highest amount of MDT was observed in adipose tissue. Second, MDT enhances the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through increases in expression levels of PPAR and C/EBP which are key regulators of 3T3-L1 differentiation. Third, MDT reduced production of proinflammatory cytokines both in 3T3-L1 adipocytes and mouse macrophage-like RAW264.7 cells. We further observed the different effects on the activity of 3T3-L1 and RAW264.7 cells among MDT and other vitamin E homologues, suggesting that MDT can regulate cell functions through unique pathways which are different from those of other homologues.

研究分野：脂質生化学

キーワード：海洋性ビタミンE MDT 肥満 慢性炎症 脂肪細胞 マクロファージ様細胞 脂肪細胞分化

1. 研究開始当初の背景

近年世界中で問題視されている肥満や肥満を基盤とする代謝異常症などの病態では、その根底に慢性的な炎症が関わっていることが知られている。そのため、運動や食習慣による肥満改善が推進されるとともに、天然物中に含まれる炎症抑制効果を有する活性成分の探索・開発研究が世界中で活発に行われている。

脂溶性ビタミンの1つであるビタミンE (VE)は、優れた抗酸化作用を持ち生体内恒常性を維持する上で重要な役割を果たす食品成分である。最近では天然中に存在する8つの同族体(α -、 β -、 γ -、 δ -tocopherol (Toc)、 α -、 β -、 γ -、 δ -tocotrienol (T3))がそれぞれ異なる生理活性機能を持ち、同族体によっては抗がん作用や炎症抑制効果を示すことが明らかにされ、化学構造と機能性の関連性が注目されている。海洋生物に特徴的に含まれる Marine-Derived Tocopherol (MDT)は1999年にシロサケから発見されたVEである(図1)。MDTは α -Tocのフィチル基側鎖末端部分に二重結合を持ち、それによる高い脂質膜流動性により、冷温下で α -Tocよりも強い脂質過酸化抑制作用を発揮することが報告されている。研究代表者の別府はこうした化学構造上の特徴を持つMDTは、生体内においても他のVEと異なる生理活性作用を発揮する可能性があると考えた。

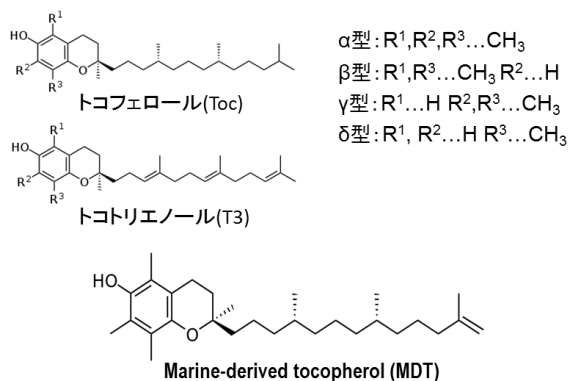


図1 MDTの化学構造

2. 研究の目的

本研究は、海洋生物に特徴的なMDTの未知なる機能性を明らかにすることで食品素材や化粧品への高度利用の可能性を見出し、新たな食料資源の開発及び海洋資源の有効活用を目指すものである。そのため、まずは効率的なMDTの供給資源の探索を行った。また、機能性評価に用いるMDTはサケ卵抽出油から分画したトコフェロール画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製して得るが、従来の方ではトコフェロール画分中に多量のトリアシルグリセロール(TG)が混在することが判明した。このままではHPLCでのMDT生成効率が極端に低くなる。まずはこの点を解決する必要が生じ、精製方法を再検討することにした。

さらに、MDTの化学構造や抗酸化作用が特徴づける、他のVE同族体とは異なる生理活性機能を見出すことを目的とした。そのためにまずはMDTの体内動態を明らかにし、機能性を発揮する可能性を精査した上で、ターゲットになる組織、細胞を用いて機能性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 各種水産生物中のMDT含量の測定

- ▶ 各種試料の調製: 国内外の魚類を中心とする水産生物からクロロホルム:メタノール2:1(v/v)で総脂質を抽出した。
- ▶ MDTの定量分析: 得られた脂質中のMDT含量は蛍光検出器を接続したHPLCで分析した。

(2) MDT抽出・精製方法の効率化

- 総脂質からTGを分解あるいは除去することで精製効率を飛躍的に上げることが可能と考え、以下の方法を試験した。
- ▶ 除TG方法の検討: サケ卵総脂質を水素化アルミニウムリチウム($LiAlH_4$)あるいは水素化ホウ素ナトリウム($NaBH_4$)を用いた還元反応により、トリアシルグリセロールを分解した後、VE濃縮画分をそれぞれヘキサンで再抽出して得た。
 - ▶ カラムクロマトグラフィーによるVE画分の濃縮: サケ卵総脂質中のTGとVEが分離可能な各種有機溶媒の組成比を検討した。

(3) 実験マウスを用いた体内動態解析

- ▶ 飼料の調製: サケ卵から抽出した総脂質からカラムクロマトグラフィーによりVEを含むTG画分を得た。AIN-93Gを基本組成とする飼料にサケ卵TG画分が7%(w/w)となるよう添加した。
- ▶ 飼育条件: 実験マウスは5週齢の雄性ddYマウスを用いた。1週間馴致飼育後、調製した飼料で4週間飼育した。マウスは麻酔下で採血し、安楽死させた後に各組織を採取した。
- ▶ MDT含量の分析: 各組織中のMDT含量は蛍光検出器を接続したHPLCで分析した。

(4) 脂肪細胞に対する影響

- ▶ 脂肪細胞の分化に対する影響(α -Toc、 α -T3との比較): 前駆脂肪細胞3T3-L1は定法に従って分化誘導試薬を含む培地で培養した。VE同族体およびMDTは終濃度が10、20 μ Mとなるよう添加した。培養培地は2日に1回交換し、分化誘導開始から10日間培養した。培養後に蓄積した細胞内の脂質含量はオイルレッドO染色およびTG定量キットを用いて測定した。

- 分化誘導作用の検討：MDT による分化誘導作用を確かめるため、3T3-L1 の培養を分化誘導期、中間期、脂質合成期の3つに分け、それぞれの期間に MDT 処理した細胞中の脂質含量を比較した。
さらに、分化制御機構への影響について、分化のマスターレギュレーターである PPAR γ の発現を比較した。

(5) 炎症抑制効果の検討

- アディポサイトカイン産生調節作用の検討：3T3-L1 細胞を上記の要領で 10 日間培養し、培養上清中の IL-6、MCP-1、アディポネクチン濃度を各種定量キットにより測定した。
- 炎症細胞への影響：マクロファージ様細胞 RAW264.7 を播種して 24 時間後に MDT5、10、20 μ M を含む培地で 2 時間培養した。さらに 2 時間後にリポポリサッカライド(LPS)で炎症を誘導し、24 時間後に各種炎症性サイトカイン産生量を測定した。

4. 研究成果

(1) 各種水産生物中の MDT 含量の測定

MDT の安定的で効率の良い供給資源を探すため、国内外で入手された 58 種の海洋生物中の MDT 含量を測定した。すでに MDT は寒冷水域の魚類に多く含まれることが分かっていたが、本研究においても同様の傾向が見られた。また、魚類筋肉よりも脂質含量が多い魚卵が MDT 含量も多く、その中でもサケ卵では約 1-2 mg/100g 含まれ、入手しやすさを考慮するとサケ卵が供給源として優れると判断した。特にシロサケ卵はベニサケ、マスの卵よりも MDT 含量が高い傾向にあった。

(2) MDT 抽出・精製方法の効率化

サケ卵から抽出した総脂質を LiAlH $_4$ あるいは NaBH $_4$ による還元反応に供し、TG を分解することで VE の濃縮を試みた。反応後に再抽出し薄層クロマトグラフィーで確認すると、いずれの還元剤で反応した場合にも約 3 時間で TG がほぼ完全に分解したことが確認できた。これにより VE の割合を 20 倍以上に濃縮することはできた。しかしながら、HPLC で VE 含量を測定すると、いずれの方法でも α -Toc および MDT が分解され減少していることが分かった。さらに酸やアルカリを用いたメチルエステル化、リパーゼを用いた加水分解反応を試みたが、いずれの方法も TG を特異的に効率よく分解することは困難であった。一方、有機溶媒組成を調整することでカラムクロマトグラフィーにより直接 TG と VE 画分を分離精製することを可能にした。これにより VE 含量を減少することなく、効率的に VE 画分を濃縮することが可能となった。

(3) 実験マウスを用いた体内動態解析

サケ卵 TG を含む飼料中に MDT は 14.6 mg/kg、 α -Toc は 70.3 mg/kg 含まれることを確認した。この飼料で 4 週間飼育した結果、MDT はいずれの組織にも分布し、特に脂肪組織、肝臓、腎臓、精巣に多く蓄積することが確認された(図 2)。蓄積量を α -Toc と比較すると、飼料中の含有量の違いを考慮に入れても MDT 蓄積量は少なく、この結果より、肝臓に発現する α Toc 輸送タンパク質はフィチル側鎖の末端部分も認識していることが推察された。また、組織重量当たりの蓄積量は、ほとんどの組織で α -Toc の 1/10 程度であったが、腎臓においてのみ α -Toc の 1/3 であった。通常、 α -あるいは γ -Toc はシトクロム P450 による代謝を受け、極性を高めた代謝産物が尿中へ排泄される。つまり、腎臓で高含有量検出された MDT は α や γ -Toc と代謝経路が異なる可能性が推察された。これを確かめるため、CYP450 活性阻害作用を持つケトコナゾールをサケ卵 TG と同時に投与する追加試験を行ったところ、予想の通り血中の α -Toc 量が 30 倍以上増加したのに対し、MDT 量は変化が見られなかった。従って、MDT は α -Toc や他の VE 同族体とは異なる代謝特性を持つ可能性が示された。

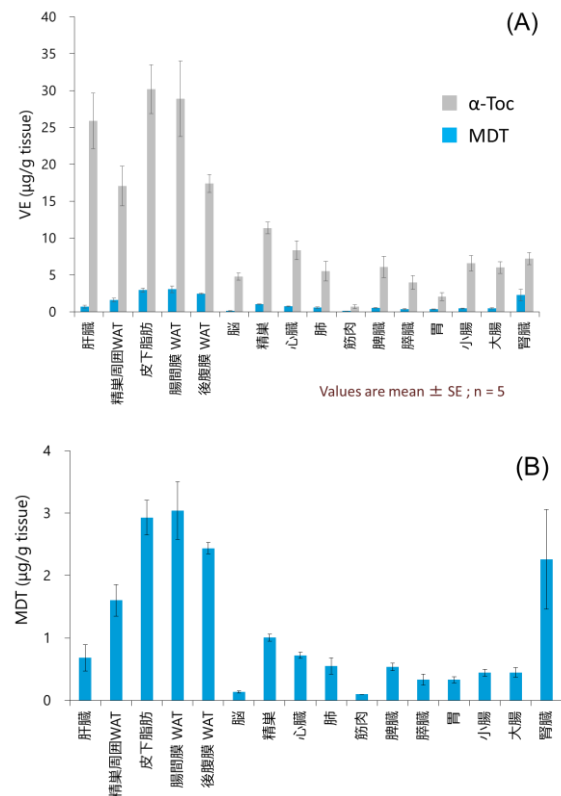


図2 組織への蓄積量 (A) VE含量、(B)MDT含量

(4) 脂肪細胞に対する影響

(3)により MDT が脂肪組織に蓄積することから、脂肪組織における機能性に焦点を絞って評価することとした。前駆脂肪細胞 3T3-L1 を分化させ、脂肪蓄積量への影響をオイルレッドおよび TG 定量キットを用いて評価した結果、 α -Toc、 α -T3 添加群ではコントロール

群と有意な差は見られなかったが、MDT 処理した細胞では有意な脂質蓄積量の増加が認められた (図 3)。α-Toc および α-T3 は脂肪細胞に対する脂質蓄積増加作用、分化抑制作用がそれぞれ報告されているが、本研究で処理した 10 μM の濃度では既報の結果は再現されなかった。次に、MDT の作用が分化誘導と脂質合成のいずれに関わるのかを検討したところ、分化誘導期に MDT 処理した細胞でのみ有意な脂質蓄積量の増加が認められ、MDT による脂肪細胞の分化制御作用が推察された。さらに、分化誘導 4 日目の MDT 処理した細胞では、分化に関わる PPAR γ および C/EBP α のタンパク質発現量が有意に増加した (図 4)。これにより、MDT による 3T3-L1 脂肪細胞の分化促進作用が示された。

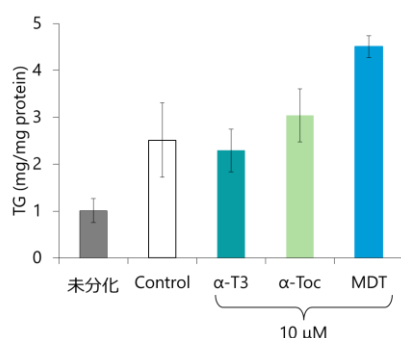


図3 脂質蓄積量に対する影響

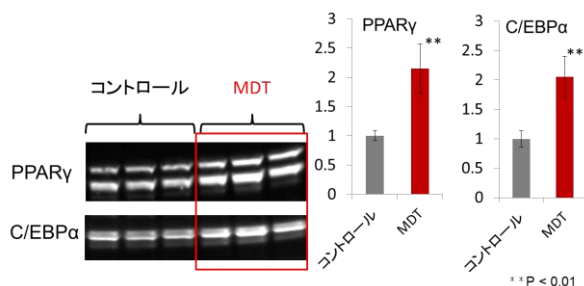


図4 分化関連タンパク質発現に対する影響

(5) 炎症抑制効果の検討

PPAR γ 活性化は脂肪細胞の肥大化を抑制し、インスリン抵抗性を引き起こすアディポサイトカインの産生異常を改善することが知られている。そこで MDT 処理した 3T3-L1 の培養上清を調べると、インスリン抵抗性改善作用を持つアディポネクチン産生量には影響がみられなかったが、MCP-1、IL-6 といった炎症性サイトカイン量の有意な低下が認められた。これらの結果は、PPAR γ 発現増加を介した脂肪細胞の質的な改善効果を示唆するものである。

次に LPS 刺激により炎症を誘導したマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する MDT、α-Toc あるいは α-T3 の影響を比較検討した。終濃度 10 μM で添加した α-Toc は NO 産生量を α-T3 は TNF- α 、IL-6 産生量をそれぞれ低減させた。一方、MDT は NO、TNF- α 、IL-6 いずれも産生量の低減効果が認められ、その

効果は α-Toc、α-T3 と比較して同程度かそれよりも強い傾向が見られた (図 5)。

これらの結果は、MDT が脂肪細胞および炎症性細胞への直接的な作用のみならず、脂肪組織における脂肪細胞-マクロファージ細胞間の相互作用に対しても MDT が効果的な炎症抑制効果を発揮する可能性を示唆するものである。

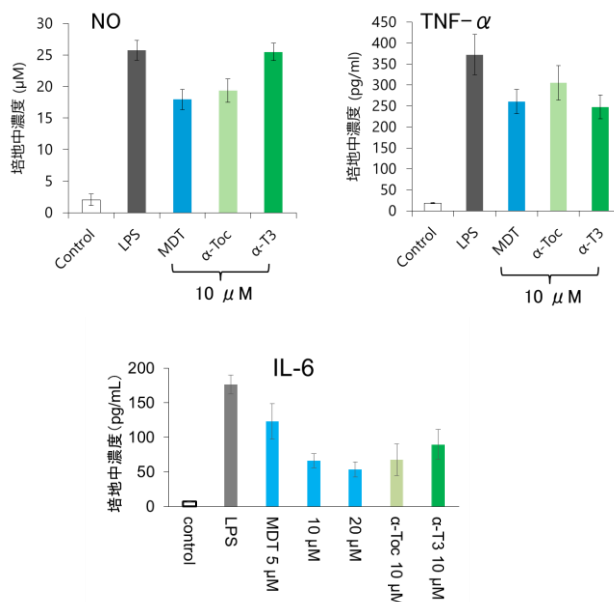


図5 炎症性因子に対する抑制効果

以上、本研究ではこれまで注目されていなかった MDT の生理機能性について、脂肪細胞の肥大化や炎症に対する抑制効果に焦点を絞って検討した。食品添加物や薬剤にも活用されている VE は最近ではそれぞれの同族体を持つ特徴的な機能性に世界中で注目が集まっており、今後もサプリメント等への活用が期待されている。またそのために化学構造に基づいた生体における役割の解明が求められている。そうした点においても、本研究で明らかになった MDT の特性や他の VE 同族体と異なる細胞機能調節作用は非常に重要な知見である。

本研究で得られた知見は水産物の新たな健康機能の解明と海洋資源の有効利用にも貢献するものであり、学術的のみならず産業的にも意義深いと考える。

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 4 件)

1. 別府史章、近藤仁美、後藤直宏、海洋性ビタミンEの体内組織分布に関する研究、第71回日本栄養食糧学会、2017/5/21、沖縄、沖縄コンベンションセンター

2. 相田祐介、別府史章、後藤直宏、海洋性ビタミンEの脂肪細胞分化に対する影響、平成29年度日本水産学会春季大会、2017/3/27、東京、東京海洋大学

3. 別府史章、海洋性ビタミンEの探索と機能性、平成28年度ライフサイエンス・産業技術部会シンポジウム（日本油化学会）、2016/9/7、奈良、奈良女子大学

4. 近藤仁美、別府史章、後藤直宏、海洋性ビタミンEの組織への蓄積に関する研究、平成28年度日本水産学会春季大会、2016/3/28、東京、東京海洋大学

〔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

『ビタミン E に関する研究』

<http://hozenkagaku.com/MDT.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

別府 史章 (Beppu Fumiaki)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号：10707540

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

後藤 直宏 (Gotoh Naohiro)
東京海洋大学・学術研究院・教授