

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部第一内科・医師、特別研究員 竹島 健

共同研究者

和歌山県立医科大学医学部第一内科・教授 赤水 尚史

和歌山県立医科大学医学部・講師 井原 勇人

近畿大学生物物理工学部・講師 岸田 邦博

研究課題名

和歌山県特産果実に含まれる保健機能成分による脂質代謝改善、糖尿病予防に関する研究

要旨

メタボリック症候群の発症には、過食に伴う肥満が大きく関与する。過剰摂取したエネルギーにより脂肪細胞が肥大化し、さまざまな生理活性物質（アディポカイン）が分泌され、糖・脂質代謝異常、高血圧症を引き起こし、脳卒中、心疾患、糖尿病合併症などを発症する。そこで、本研究では、和歌山特産果実の中でも梅から作られる梅酢ポリフェノールに着目し、アディポカイン発現に与える影響を検証した。また、近年、内臓脂肪などの白色脂肪内にエネルギーを熱として消費する褐色脂肪様の細胞「ベージュ細胞」が発見され、肥満症の新たな治療ターゲットとして注目されている。そこで、機能性成分が白色脂肪細胞の褐色脂肪化に与える影響についても、GeneChip を用いても解析を加えた。

脂肪細胞から分泌されるアディポカインのうち、メタボリック症候群発症の原因となっているいわゆる悪玉アディポカインの遺伝子発現抑制効果を有するものについて候補化合物の中からスクリーニングを行った。リアルタイム PCR を用いた検討では、梅酢ポリフェノールの一つであるカフェ酸により、前駆脂肪細胞（3T3-L1）において、悪玉アディポカインであるレジスチンに対する一定の抑制効果が認められた。また、ルシフェラーゼアッセイにおいても梅酢ポリフェノールの一つであるカフェ酸によりレジスチンプロモーター活性が抑制された。

そこで、レジスチンプロモーター・レポーターベクターを前駆脂肪細胞（3T3-L1）へ導入し、作成した安定発現細胞をヌードマウスへ移植し、in vivo イメージングによるアディポカイン発現評価を行った。カフェ酸の腹腔内投与を行ったところ、限定的ながら時間経過においてレジスチンプロモーターの発現を示す移植細胞の発光が時間経過で減弱する傾向が認められた。ただし、これらの効果はカフェ酸 100uM という生体内に置き換えると非常に高濃度においてのみ確認されたものであった。

更に、GeneChip 解析では、脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現が抑制された一方、レジスチン以外に強い発現変動を有するアディポカイン候補は新たに認められなかった。褐色脂肪化に関連した遺伝子発現については、むしろカフェ酸 100ug 投与により発現が低下しており、褐色脂肪化よりも、3T3-L1 分化抑制に伴う変化を見ている可能性が示唆された。

今後、抗肥満作用等の有効性が期待できる候補物質において、肥満モデルマウスでの評価も検討していきたいと考えている。

注) 用紙は A 4 版縦長横書きとし、研究成果報告書を 800 字程度に要約してください。

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部第一内科・医師、特別研究員 竹島 健

共同研究者

和歌山県立医科大学医学部第一内科・教授 赤水 尚史

和歌山県立医科大学医学部・講師 井原 勇人

近畿大学生物物理工学部・講師 岸田 邦博

研究課題名

和歌山県特産果実に含まれる保健機能成分による脂質代謝改善、糖尿病予防に関する研究

1 目的

梅酢ポリフェノール成分を代表とする保健機能成分が、糖・脂質代謝、肥満に与える影響について検討を行う。

2 実施方法

I. 脂肪前駆細胞を用いた *in vitro* での検討

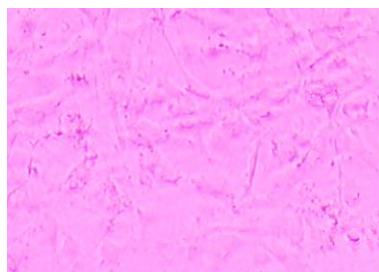
a) 3T3-L1 脂肪前駆細胞の継代および分化誘導・維持

脂肪細胞分化モデルとして一般的に用いられる 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いて、インスリン、デキサメサゾン、IBMX による分化誘導を行った後、各種ポリフェノール成分を添加し、脂肪細胞分化、アディポカイン発現に与える影響を検討した。

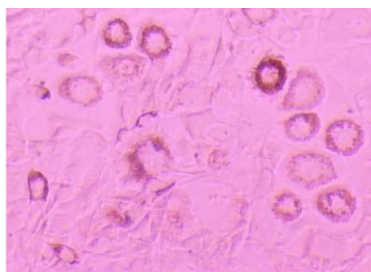
3T3-L1 細胞は、凍結細胞ストックより起こして 100φ dish に播種し、インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地 (DMEM+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン) で培養した。約 24 時間で完全に細胞がコンフルエントになる前に、リン酸緩衝バッファー (以下 PBS) で細胞表面を洗浄後、0.25%トリプシン+0.02% EDTA 溶液を添加後 1 分放置し、タッピングにより細胞を剥離した。剥離した細胞は細胞濃度を 1.0×10^5 cells/cm² に調整後、24 ウェルプレートに継代した。

3T3-L1 細胞がコンフルエントになってから 48 時間後、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地 (DMEM+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン++10ug/ml インスリン+1uM デキサメサゾン+0.5mM IBMX) で分化誘導を行った (Day0)。分化誘導開始後 48 時間 (Day2) で 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化維持培地 (DMEM+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン++10ug/ml インスリン+1uM デキサメサゾン) に培地交換し、分化開始後 8 日目 (Day8) まで分化維持を行い、各種アッセイを行った (図 1)。

ポリフェノール成分およびコントロールとして溶媒(カフェ酸はエタノールを同じ割合で希釈 (1×10^{-3}) した) を Day0~Day8 まで継続的に添加した。



分化前



分化後 - 18 -

図 1. 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導後の脂肪滴蓄積像

分化前 (左) に見られなかったリング状の脂肪滴蓄積が分化後 (右) に多数認められる。

b) ポリフェノール成分添加後、Oil Red O 染色にて脂肪細胞分化に与える影響の検討

Day8 の時点で肉眼的に脂肪滴が多房性に蓄積していることを確認し（図 1）、Oil Red O 染色を行った。まず、PBS 1ml/well で細胞表面を洗浄し、10%ホルマリン入り PBS で細胞を 1 時間固定した。その後、細胞培養用滅菌水で細胞表面を洗浄し、Oil Red O で 2 時間染色を行った。再度、細胞培養用滅菌水で細胞表面を洗浄し、37°C インキュベーター内で細胞表面を乾燥させ、イソプロパノールを用いて Oil Red O を溶出し、吸光度 490nm を測定した（図 6）。

c) ルシフェラーゼアッセイおよびレジスチンプロモーター・ルシフェラーゼ安定発現細胞の樹立

まず、レジスチンプロモーター領域のうち、脂肪細胞分化に関わる転写因子 C/EBP α , PPAR γ を含む領域で polymerase chain reaction（以下 PCR）を用いて、4 種類のプロモーター領域（①1129bp, ②1710bp, ③2144bp, ④3167bp）を増幅した（図 2-A, B）。これらをクローニングした後、ルシフェラーゼベクター（pGL4.20）に導入し、これを脂肪前駆細胞（3T3-L1）に導入の上、ルシフェラーゼアッセイを行った（図 3）。コントロールベクターとして phRL-TK vector を用い cotransfection した。

ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用い、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ添加後の酵素活性比で比較検討した。

分化誘導後の 3T3-L1 において、4 種類のプロモーター領域を導入した際、分化とともにレジスチンプロモーターの発現が亢進することを確認した（図 3）。これらのうち、最も短い領域①を導入したルシフェラーゼベクターにおいてルシフェラーゼ活性が最も高く、レジスチンプロモーター活性評価に適していると考えられた。そこで、領域①プロモーターを導入したルシフェラーゼベクターを用いて、puromycin で処理後に残ったコロニーを安定発現細胞としてピックアップし、レジスチンプロモーター・ルシフェラーゼ安定発現細胞を樹立した。作成した安定発現細胞は生体内イメージング法におけるマウス皮下移植に用いた（以下、in vivo イメージングの結果を参照）。

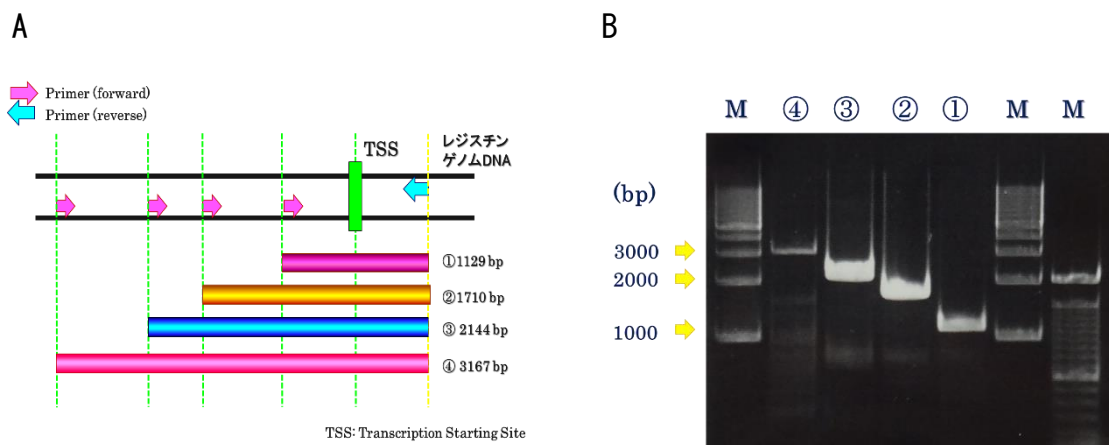


図 2 (A, B) レジスチンプロモーター領域の PCR

4 種類のプロモーター領域（①1129bp, ②1710bp, ③2144bp, ④3167bp）について PCR を行った。TSS: transcription starting site, M: marker

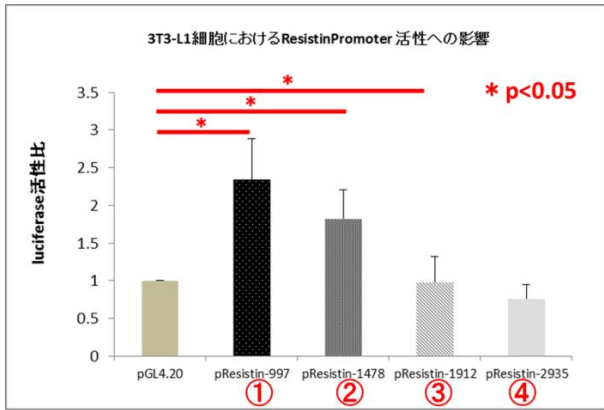


図3. 3T3-L1 細胞におけるレジスチンプロモーター長別のルシフェラーゼ活性比較

d) リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析

分化誘導後 Day8 に RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。

まず、PBS で細胞表面を洗浄し、グアニジンイソチアネートを含む lysis buffer 350ul/well (6well plate) を加えて細胞を破碎し、ピペティングの後に QIA shredder spin column にサンプルを添加した。14000rpm、2 分間の遠心後に 70%エタノール等量を加え、ピペティング後に QIAamp spin column に移し、再度 10000rpm、15 秒間の遠心を加えた。新しいコレクションチューブに移した後、RPE buffer 500ul を加え、再度 10000rpm、2 分間遠心し、下層の液を捨てた。更に 14000rpm、1 分間遠心後、Membrane に RNase free water 30ul を加え RNA を溶出した。RNA 濃度測定を行い、RNA 抽出を確認した。

抽出した RNA 1ug を用いて、TaqMan reverse transcription reagent (life technologies) で逆転写反応を行い、cDNA 化した。TaqMan gene expression master mix を用いて cDNA 2ul で real time PCR を行った。Real time PCR における遺伝子発現は、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用い、コントロールに対する比で表記した。

e) GeneChip を用いた遺伝子発現解析 (図 4)

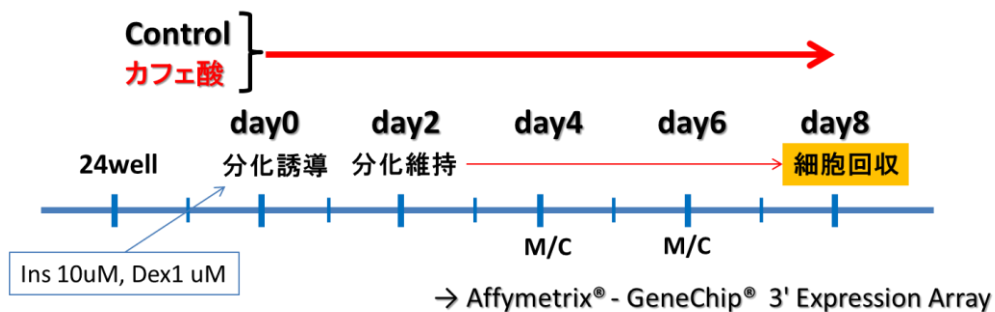


図 4. GeneChip 解析までの細胞培養プロトコール

マウス由来の脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を用いて各種アディポカイン、褐色脂肪化に関連した遺伝子発現を網羅的に行うため、Affymetrix®社製 GeneChip®Mouse Genome 430 2.0 array を用いた。同 array は、マウス遺伝子 39,000 個を含み、目的とする脂肪細胞分化に関連する PPAR γ 、CEBP α 、各種アディポカイン (レジスチン、アディポネクチン、Rbp4、レプチン、sfrp5、IL-6、TNF α)、褐色脂肪化に関連する遺伝子を網羅しており本検討に適切と考えられた。

上記細胞培養プロトコールに従い (図 4)、3T3-L1 細胞を 24well plate に播種後、8 日間の分化誘導および維持を行った。分化誘導と共にカフェイン 100 μ M およびコントロー

ル試薬（カフェ酸の溶媒であるエタノールを同一希釈率で調整したもの）を投与し、コントロール群とカフェ酸刺激群に群分けし各々の遺伝子発現解析を行った。8日目に各群の細胞を lysis buffer に溶解し、RNA 抽出を行った後、抽出サンプルを Affymetrix®社製 GeneChip®Mouse Genome 430 2.0 array を用いて遺伝子発現解析に用いた。同解析では、RNA を 3' IVT PLUS Reagent Kit を用いて cRNA を作成し、逆転写反応により cDNA を作成し、in vitro transcription により cRNA に転写し、Mouse Genome 430 2.0 Array へのハイブリダイゼーションを行い評価している。

II. 肥満モデルマウス（ラット）を用いた in vivo での検討

メタボリック症候群および2型糖尿病モデル動物である ob/ob マウスや高脂肪食負荷マウス (C57BL6)・ラットなどを用いて、各種機能性成分添加の食餌を与え、糖・脂質代謝、肥満に与える影響について検討を行う。

a) 糖代謝に与える影響の解析

機能性成分添加前後の空腹時血糖、経口ぶどう糖負荷試験、インスリン低血糖試験、血中アディポカイン（レジスチン、TNF α 、レプチン、アディポネクチン等）を測定し、糖代謝改善効果について検討する。

b) 脂質代謝に与える影響の解析

機能性成分添加前後の血中脂質プロファイル（総コレステロール、中性脂肪、LDL、HDL）、脂肪酸・コレステロール代謝に関わる mRNA 発現および蛋白発現（PPAR α 、PPAR γ 、SREBP-1、PGC-1 α など）、褐色脂肪化に関わる遺伝子発現を評価する。脂肪肝について肝臓、脂肪細胞分化については脂肪組織の組織学的検討を行う。

c) 肥満症に与える影響の解析

時間経過における摂餌量、体重変化（体重測定）、内臓脂肪重量、直腸温などの測定を行う。

* 2015 年 4 月現在、動物実験系確立に向けて肥満モデルマウスの摂食量、体重変化、直腸温測定手技などの手法確立のため条件検討を行っている（preliminary ながら、結果に現時点までの条件検討内容を記載した）。

III. 光イメージング可視化技術を用いた検討（in vivo イメージング）

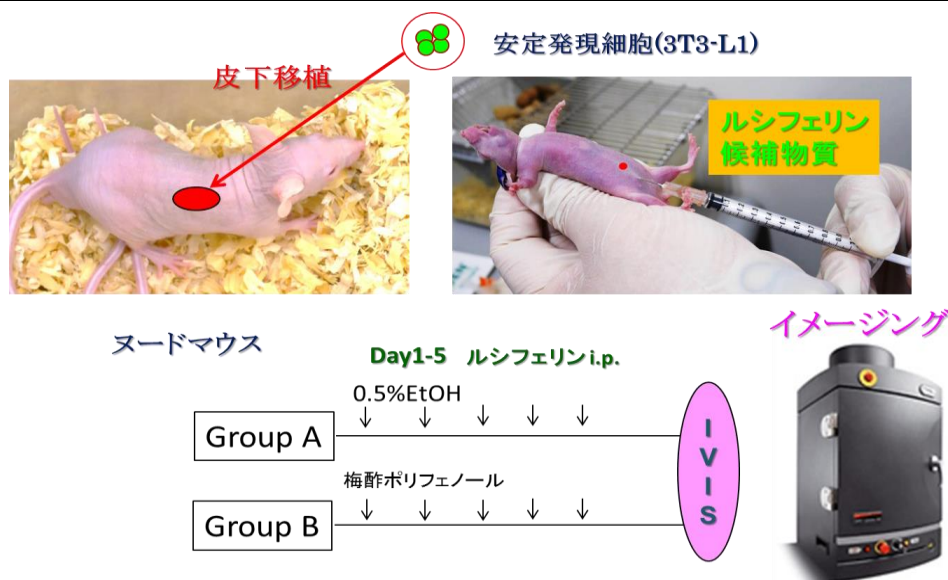


図5. ヌードマウスへの安定発現皮下移植とルシフェリン投与プロトコール

ルシフェラーゼ安定発現細胞をヌードマウスの皮下へ移植し、各種機能性成分を投与した際に、各成分が生体内でアディポカインプロモーター活性に与える影響を光イメージング装置 (IVIS) を用いて評価した (図5)。

まず、I-a と同様に凍結細胞ストックより起こした 3T3-L1 前駆脂肪細胞 75cm² フラスコに播種し、インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地 (DMEM +10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン) で培養した。約 24 時間で完全に細胞がコンフルエントになる前に、リン酸緩衝バッファー (以下 PBS) で細胞表面を洗浄後、0.25% トリプシン+0.02% EDTA 溶液を添加後 1 分放置し、タッピングにより細胞を剥離した。剥離した細胞は細胞濃度を 1.0x10⁵cells/cm² に調整後、24 ウェルプレートに継代した。

3T3-L1 細胞がコンフルエントになってから 48 時間後、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地 (DMEM+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン++10ug/ml インスリン+1uM デキサメサゾン+0.5mM IBMX) で分化誘導を行った (Day0)。分化誘導開始後 48 時間 (Day2) で 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化維持培地 (DMEM+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン++10ug/ml インスリン+1uM デキサメサゾン) に培地交換し、分化開始後 4 日目 (Day4) に 0.25% トリプシン+0.02% EDTA 溶液でトリプシナイズし、PBS 1.5ml に溶解して細胞濃度を 1.0x10⁶cells/cm² に調整後、マウス腹側皮下に移植した (図5)。

移植細胞を皮下移植後、D-ルシフェリンを皮下投与したところ、移植片からの発光を確認できたため、投与前、5 分後、10 分後、15 分後、20 分後の時間経過で IVIS 撮影を行う方針とした。

マウス実験の既報に基づき、カフェ酸投与量は致死量に至らない 2mg/kg とし、PBS 100ul に希釈して連日腹腔内投与を行った。一方、コントロールとして同一濃度の希釈溶媒であるエタノールを用いた。

連日、ルシフェリンの皮下投与と IVIS 撮影を行い、移植片からのルシフェラーゼによるルシフェリン発光を photone counting にて定量し、Day4 までの経過を記録した (図5、12a, b)。

3 結果

・Oil Red O 染色による脂肪細胞分化に与える影響の検討

Day8 に Oil Red O 染色を行い、これを溶出して測定した吸光度を左に示す。コントロール (Ctrl) に比して、カフェ酸 1uM、100uM で有意な Oil Red O の吸光度低下を認め、カフェ酸による脂肪細胞分化抑制効果が示唆された。しかし、10uM では有意な吸光度低下を認めず、濃度依存性の分化抑制を示唆するには至らなかった。

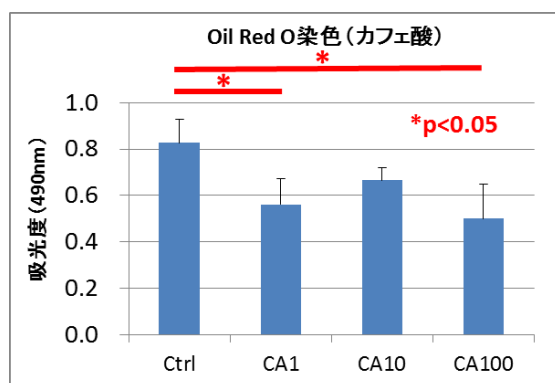


図6. Oil Red O 吸光度測定によるカフェ酸の分化抑制効果の評価

Ctrl: コントロール (0.1%エタノール添加)、CA: カフェ酸 (各略号の後の数字は濃度 (μM) を示す。)

・ 3T3-L1 細胞を用いた in vitro におけるアディポカイン発現解析

●ルシフェラーゼアッセイ

8日間の分化誘導・維持を行い、非刺激群 (Control) とカフェ酸刺激群 (濃度 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) においてルシフェラーゼアッセイを行った。カフェ酸 100 μ M でレジスチンプロモーター活性が有意に抑制された。また、カフェ酸は濃度依存性にルシフェラーゼプロモーター活性を抑制する傾向が示された (図7)。

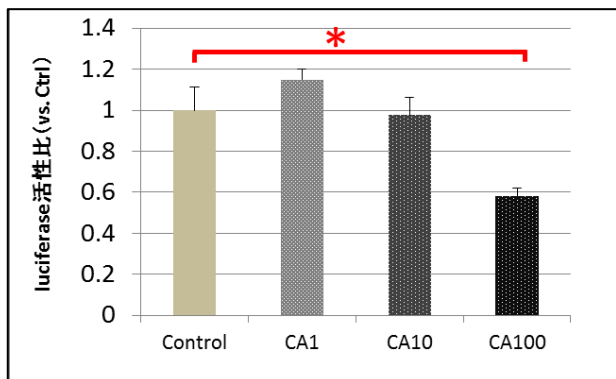


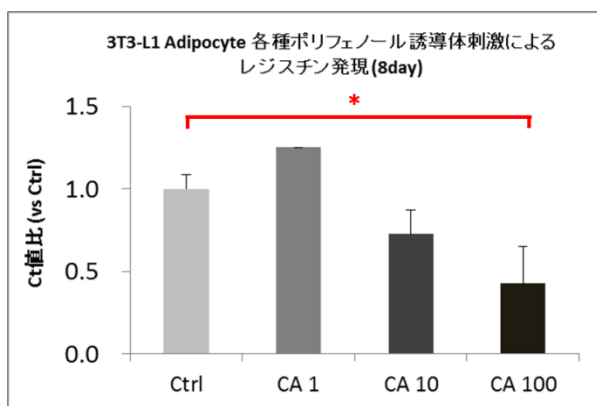
図7. 3T3-L1 (ルシフェラーゼ安定発現細胞) におけるカフェ酸 (CA) 投与後のレジスチンプロモーター活性に与える影響 (ルシフェラーゼアッセイ)

CA: カフェ酸、各略号の後の数字は濃度 (μ M) を示す。

●Real time PCR

前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を8日間分化誘導・維持し、非刺激群 (Control) とカフェ酸刺激群 (濃度 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) において real time PCR を行った。各サンプルは lysis buffer に溶解後、RNA 抽出を行い、RT 反応により cDNA を作成した。

real time PCR では、レジスチン発現がカフェ酸 100 μ M 刺激で有意に抑制されていた (図8)。この結果は、ルシフェラーゼアッセイにおけるプロモーター活性抑制と同様の結果であった。



CA: カフェ酸、各略号の後の数字は濃度 (μ M) を示す。

図8. リアルタイム PCR を用いたカフェ酸 (CA) 投与後の遺伝子発現

●GeneChip 解析

Affymetrix®社製 GeneChip®Mouse Genome 430 2.0 array を用いて、脂肪細胞分化に関連する PPAR γ 、CEBP α 、各種アディポカイン (レジスチン、アディポネクチン、Rbp4、レプチン、sfrp5、IL-6、TNF α)、褐色脂肪化に関連する遺伝子の発現を評価した。

カフェ酸 100 μ g 投与群は、コントロール群に比して脂肪細胞分化に関わる PPAR γ 、CEBP α 遺伝子発現が抑制傾向であり、脂肪細胞分化を抑制する可能性が示唆された (図9)。

また、アディポカイン発現解析の結果、レジスチンは、これまでのルシフェラーゼアッセイや real time PCR における検討と同様にカフェ酸 100 μ M で抑制傾向を示した。一方、善玉アディポカインであるアディポネクチン、Rbp4 は抑制傾向であり、むしろ分化抑制に伴うアディポカイン分泌の低下を示唆している可能性が考えられた。他のアディポカインについても発現解析を行ったが、レプチン、sfrp5、IL-6、TNF α などは発現が弱く本検討での発現解析は困難であった（図 10）。

更に、褐色脂肪化に関連した遺伝子の発現解析として、PGC1 α 、UCP-1、Prdm16、BMP7 の発現解析を行ったが、PGC1 α はむしろカフェ酸 100 μ g 投与により発現が低下しており、褐色脂肪化よりは 3T3-L1 分化抑制に伴う変化を見ている可能性が示唆された（図 11）。一方、他の褐色脂肪化関連遺伝子はいずれも発現が弱く本検討での発現解析は困難であった。

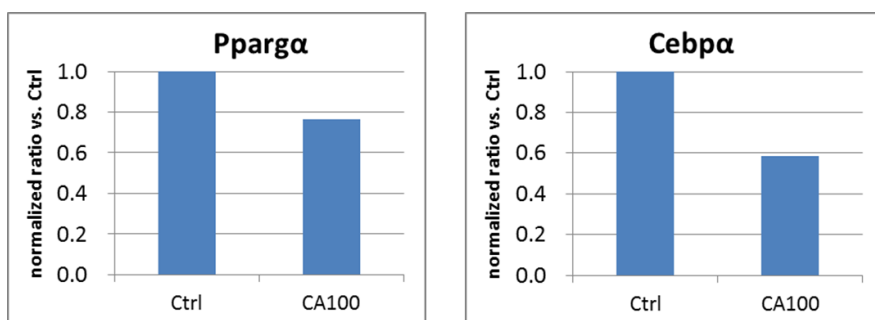


図 9. 脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現

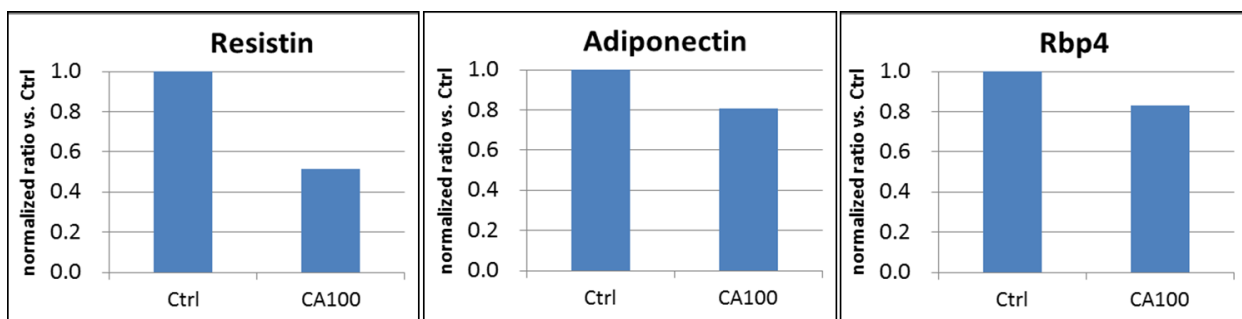


図 10. アディポカイン発現比較

(他のアディポカインであるレプチン、sfrp5、IL-6、TNF α などは発現が弱く評価困難。)

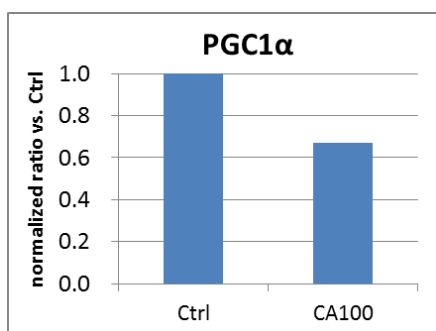


図 11. 褐色脂肪化関連遺伝子発現比較（他の褐色脂肪化関連遺伝子である UCP-1、Prdm16、BMP7 などは発現が弱く評価困難。)

以上、in vitro における検討をまとめると、

- ・ 3T3-L1 を用いた in vitro の検討では、カフェ酸 100 μ M は脂肪細胞分化のメッセージを

抑制し、糖尿病・インスリン抵抗性に関わる悪玉アディポカインであるレジスチンのプロモーター活性および遺伝子発現を抑制することが分かった。

・一方で、他のアディポカインに関しては、本検討における評価の範疇においては、レジスチン以上にその発現を抑制する候補は認められなかった。

・また、褐色脂肪化に関わる遺伝子発現については、発現亢進は認めず、褐色脂肪化を積極的に示唆する所見は認められなかった。

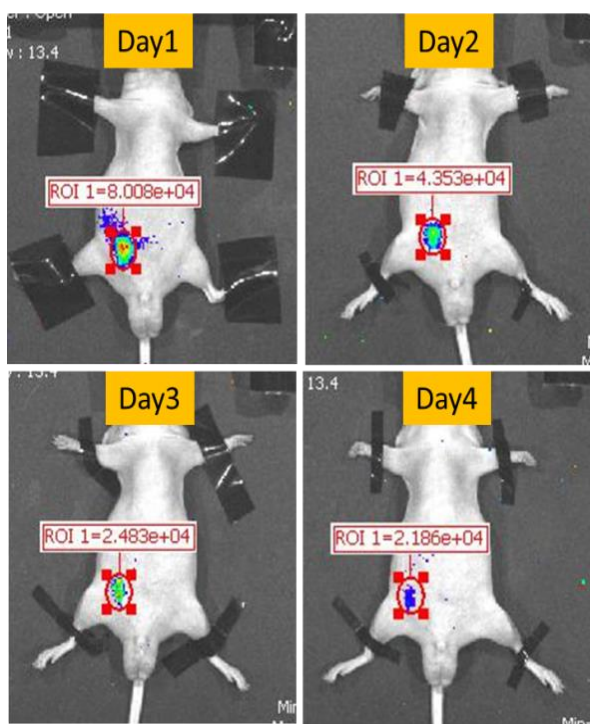
・生体内イメージング法 (in vivo イメージング)

レジスチンプロモーター/ルシフェラーゼ安定発現細胞をヌードマウスに皮下移植し、カフェ酸投与後の時間経過で、移植細胞からのルシフェラーゼによるルシフェリン発光を測定することでレジスチンプロモーター活性が生体内でどのような発現を示すかを検討した。

限定的な条件での検討ではあったが、梅酢ポリフェノール成分投与後の時間経過では、レジスチンプロモーター活性を示すルシフェリン発光の減弱が、画像上も定量的にも確認された (図 1 2 a, b)。

今後の検討課題としては、移植した安定発現細胞のルシフェラーゼ活性評価にあたり、移植細胞の皮下移植部位・広がりや、発色基質である腹腔内投与したルシフェリンの広がりや部位の違いに伴う吸収率の違い、非特異的な発光の検出など移植細胞からの発光によるプロモーター発現解析には種々の条件を考慮した上での慎重な解析が必要であり、IVISでの撮影に当たっては今後更なる条件検討を行っていく必要であると考えられた。また、肥満誘発時もしくは肥満マウスにおいてもアディポカインプロモーター活性に候補物質が与える影響を検討していく必要があると考えられた。

図 1 2 a.



b.

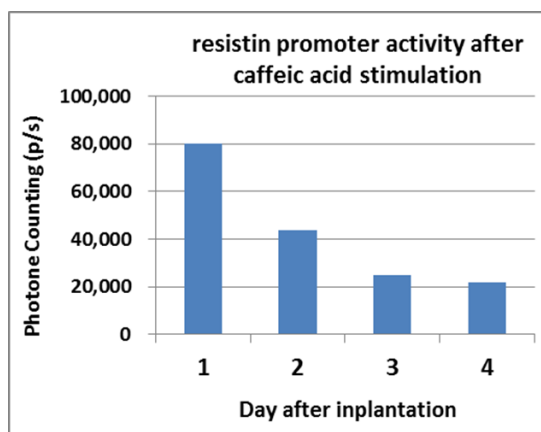


図 1 2 (a, b). 生体内イメージング法を用いた梅酢ポリフェノール成分投与後のルシフェラーゼ活性に与える影響 (day1-4) (限定的な検討)。

・肥満モデルマウスを用いた in vivo での検討（条件検討）

以下、肥満モデルマウスを用いた検討を行うための評価系について、高脂肪食を用いた食餌誘発性肥満モデルマウスでの条件検討を開始している。

マウスは、高脂肪食負荷により肥満を起こしやすい C57BL/6 を用い、スタンダード食（AIN-93M、オリエンタル酵母）投与群（n=5）、高脂肪食 60%kcal（HFD-60、オリエンタル酵母）投与群（n=5）の 2 群（合計 n=10）で条件検討を行った。各粉末飼料 15g を給餌瓶に入れ、2 日置きに給餌瓶+餌の重さを測定し、その差を計算した。また、ケージ内のこぼれた餌についても測定を行い、摂餌量に加えた。1-2 週間の慣らし期間において、群分けを行い各飼料をマウスに与えた。

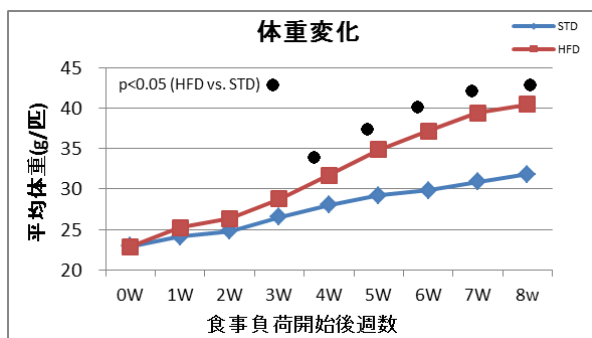
下記グラフは、スタンダード食、高脂肪食 60%kcal を 8 週間与えた際の体重変化と摂取カロリーを示す。高脂肪食群（以下 HFD 群）はスタンダード食群（以下 STD 群）に比して体重増加が強く、4 週間で HFD 群が有意に STD 群より体重が高くなった（図 13a）。

一方、各群の摂取カロリー（kcal/週）について、下記に示す（図 13b）。1-4 週にかけては、ケージ内での餌こぼしや給餌瓶へのおが屑、糞の混入が多く、正確な摂餌量を測定することが困難であった。4 週目以降、徐々にマウスの餌こぼしが少なくなり、ケージ内のこぼしを計測することができるようになったため、比較的正確に摂餌量が測定できるようになった。そのため、1-4 週における摂取カロリーは HFD 群で過剰評価されており、4 週以降の摂取カロリーで評価すると、HFD 群は STD 群に比して摂取カロリーが多い傾向にあったが、有意な差が出る程度ではなかった。

8 週間後に各マウスを解剖し、肝および精巣上体脂肪（eWAT）重量を測定すると、いずれも HFD 群で重量増加が認められた（図 14）。

今後、候補物質添加群を加え、肥満モデルマウスにおいても糖・脂質代謝、エネルギー代謝に関連した遺伝子発現や組織学的検討を加えていく予定である。

a.



b.

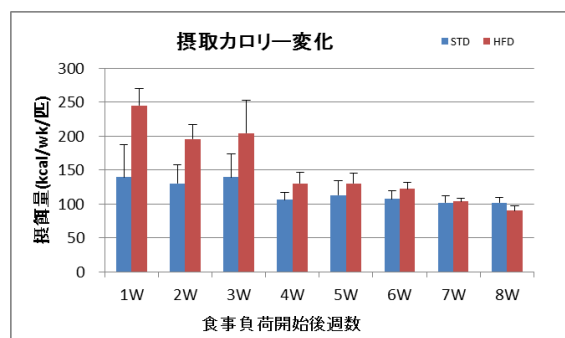


図 1 3 a, b 高脂肪食負荷による食餌誘発性肥満モデルマウスの体重変化（g/週）および摂取カロリー変化（kcal/週）

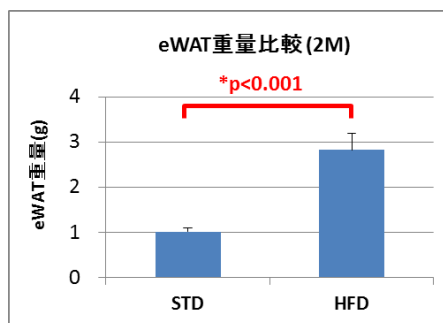
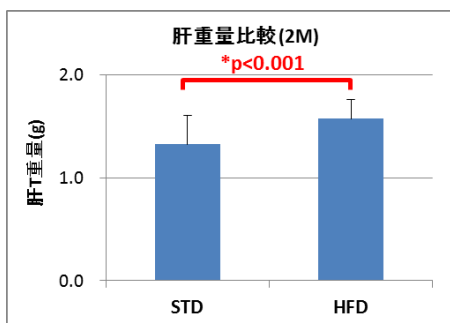


図 1 4. 高脂肪食負荷による食餌誘発性肥満モデルマウスの肝および精巣上体脂肪重量（eWAT）の比較

4 その他
特記事項なし

注) 用紙はA4版縦長横書きとし、20頁から25頁程度(約35,000字程度)とすること。(写真、図表挿入可)

(県補助金等交付規則第13条関係)

