

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

和歌山県特産食物由来の保健機能成分による抗肥満作用に関する研究

要旨

メタボリック症候群は、「過食」とこれに伴う余剰エネルギー蓄積による脂肪細胞の肥大、すなわち「肥満」が発症に大きく関与するため、これらを抑えることがメタボリック症候群の根本的治療として重要と考えられている。一方、脂肪組織には白色脂肪と褐色脂肪組織があり、前者はエネルギーの貯蔵所として機能する一方、後者はエネルギーを熱として消散させる。更に、白色脂肪中に褐色脂肪様の細胞（ベージュ細胞）が誘導・活性化される現象「褐色脂肪化（browning）」が報告され、肥満症治療の新たなターゲットとして注目されている。

これまで我々は、脂肪前駆細胞を用いた *in vitro* の検討で、和歌山特産果実の梅から作られる梅酢ポリフェノール(カフェ酸)が、脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現を抑制し、肥大化した脂肪細胞から分泌される悪玉アディポカイン(レジスチン)を抑制することを報告してきた。しかし、カフェ酸は褐色脂肪化に関与する遺伝子発現を亢進させなかった。また、褐色脂肪化には交感神経刺激を介した β 受容体刺激や脱ヨード酵素など複数の要因が関与するため、*in vitro* の検討ではこれ以上の評価が困難と考えられた。

そこで、肥満を背景としたメタボリック症候群改善作用を有する物質を探索するため、*in vivo* で検討を行うこととした。候補物質として、これまで十分検討されていなかった梅酢ポリフェノール成分であるケイ皮酸、*p*-クマル酸から探索を開始した。

肥満モデル動物として、50%高スクロース食を経口摂取させたSDラットにおいて、0.2%ケイ皮酸および*p*-クマル酸を120日間に渡り投与し、糖脂質代謝、抗肥満作用を検討した。その結果、総摂取カロリー、体重、肝・脂肪重量、血糖、脂質、肝機能、肝中脂質については群間で有意差を認めなかった。一方、ケイ皮酸投与群は、コントロール群に比して肝への脂肪蓄積に関与するとされるLXR α 、ABCA1、LDLR、SREBP2を有意に低下させた。両候補物質の糖脂質代謝に対する効果が限定的であり、体重抑制効果も認められなかったため、梅酢ポリフェノール成分とは異なる保健機能成分X(特許申請のため成分名は秘匿)について新たに検討を開始している。

注) 用紙はA4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。

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

和歌山県特産食物由来の保健機能成分による抗肥満作用に関する研究

1 目的

肥満を背景としたメタボリック症候群改善作用を有する和歌山県特産食物由来の保健機能成分を探索する。

2 実施方法

● 肥満モデル動物を用いた in vivo での検討

6 週令のオスSDラットを 50%高スクロース食群 (n=8) と 50%高スクロース食に 0.2% ケイ皮酸経口投与群 (n=8)、p-クマル酸経口投与群 (n=8) の 3 群に群分けし、120 日間の投与実験を行った。試験終了時に、ラットを非絶食下、麻酔下に下大動脈から全血採血を行い、解剖した。

a) 肥満に与える影響の解析

各群において、摂餌量測定、体重測定を行い、最終週 (120 日後) における積算摂取カロリー、体重を群間で比較した。解剖後に摘出した臓器のうち、脂肪 (精巢上体脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪組織)、肝臓の重量を測定した。

b) 糖代謝に与える影響の解析

非絶食下に解剖した際に全血採血で得られた血液を遠心 (3000rpm, 常温 10 分) し、上清を速やかに凍結保存した。すべてのラットを解剖後、同一条件にて解凍し、酵素比色分析法により血糖値を計測した。

c) 脂質代謝に与える影響の解析

非絶食下に解剖した際に全血採血で得られた血液を遠心 (3000rpm, 常温 10 分) し、上清を速やかに凍結保存した。すべてのラットを解剖後、同一条件にて解凍し、酵素比色分析法により血中脂質プロファイル (総コレステロール、中性脂肪、LDL、HDL、small dense LDL) および脂肪肝を反映する肝機能 (AST、ALT) を測定した。

更に、摘出した肝臓をホモジナイズし、RNAeasy Lipid Tissue mini kit (QUIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。逆転写反応により RNA を cDNA に変換し、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現の対象として、脂肪肝および肝脂肪酸代謝に関与する遺伝子 (AC11, FAS, ME, G6PDH, SCD1, SREBP1c, ChREBP, CPT1a, PPAR α , MTP, CYP7A1 など) の評価を行った。

また、ホモジナイズした肝臓組織を用いて、肝中脂肪 (総コレステロール、中性脂肪、

リン脂質)の測定も行った。

3 結果

① 50%高スクロース食投与 120 日後の群間の糖脂質代謝パラメーター比較 (Table1)

50%高スクロース食投与ラットにおいて、ケイ皮酸添加群(CIN)、p-クマル酸添加群(COU)および非添加群(Control)の3群に分けてパラメータ比較を行った。120 日後の時点で、各群間で積算摂取カロリーに有意差を認めず、加えて体重差も認めず、摂食抑制効果や甲状腺肥満作用は認められなかった。

また、糖代謝に関しては、血糖が CIN 群 $228 \pm 12 \text{mg/dl}$ 、COU 群 $224 \pm 9.2 \text{mg/dl}$ 、Control 群 $253 \pm 51 \text{mg/dl}$ とコントロール群に比してポリフェノール成分投与群で低めながら有意差を認めるほどではなかった。

脂質代謝に関連しては、総コレステロール、中性脂肪、LDL、HDL、small dense LDL のいずれも群間で有意差を認めず、脂肪肝を反映した肝重量変化、AST、ALT などの肝機能、肝中脂肪プロファイル(総コレステロール、中性脂肪)に有意差を認めなかった。

脂肪燃焼に関連しては、各種脂肪重量を測定したが、精巣上体脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪のいずれの部位の脂肪重量においても群間で有意差を認めなかった。

Table1 Effect of dietary CIN and COU on food intake, body weight, tissue weights, serum biochemistry, and liver lipid concentrations

| | CIN | COU | Control | P value |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| Total food intake (g) | 2983 ± 160 | 2992 ± 105 | 2884 ± 131 | NS |
| Body weight (g) | | | | |
| Initial | 182 ± 3.7 | 185 ± 2.2 | 184 ± 3.1 | NS |
| Final | 635 ± 35 | 622 ± 25 | 636 ± 26 | NS |
| Liver weight (g) | 24.9 ± 1.3 | 23.8 ± 1.3 | 23.9 ± 0.9 | NS |
| Visceral fat weight (g) | | | | |
| Epididymal | 24.8 ± 2.3 | 24.9 ± 2.0 | 25.9 ± 2.2 | NS |
| Perinephric | 35.1 ± 3.4 | 33.5 ± 3.1 | 36.5 ± 3.3 | NS |
| Mesenteric | 24.8 ± 2.1 | 27.4 ± 2.9 | 25.1 ± 2.1 | NS |
| Total | 84.7 ± 7.0 | 85.8 ± 7.3 | 87.6 ± 6.6 | NS |
| Serum lipid concentrations (mg/dL) | | | | |
| Triacylglycerol | 133 ± 14 | 179 ± 21 | 133 ± 21 | NS |
| Total Cholesterol | 54.0 ± 4.8 | 53.0 ± 4.2 | 59.7 ± 5.8 | NS |
| HDL Cholesterol | 35.2 ± 3.2 | 32.9 ± 2.6 | 38.1 ± 3.4 | NS |
| LDL Cholesterol | 9.8 ± 1.5 | 9.3 ± 1.3 | 12.2 ± 1.8 | NS |
| Small dense LDL Cholesterol | 8.2 ± 1.5 | 7.3 ± 1.2 | 9.1 ± 1.4 | NS |
| Serum glucose concentrations (mg/dL) | 228 ± 12 | 224 ± 9.2 | 253 ± 51 | NS |
| Aspartate transaminase (AST, U/L) | 46.0 ± 1.5 | 51.6 ± 3.6 | 59.3 ± 8.3 | NS |
| Alanine transaminase (ALT, U/L) | 18.0 ± 1.5 | 21.5 ± 1.7 | 21.1 ± 1.8 | NS |
| Liver lipid concentrations (mg/g) | | | | |
| Triacylglycerol | 18.1 ± 2.0 | 23.8 ± 4.3 | 18.7 ± 2.9 | NS |
| Cholesterol | 3.0 ± 0.1 | 2.9 ± 0.1 | 2.8 ± 0.1 | NS |
| Phospholipid | 20.8 ± 0.3^a | 19.4 ± 0.3^b | 20.9 ± 0.2^a | .002 |

Values are means \pm S.E. (n = 8 /group). Different letters indicate significant differences.

② 脂質代謝に関連した遺伝子発現比較 (Fig1, 2)

肝臓における脂肪酸およびコレステロール代謝に関連した遺伝子発現について群間で比較検討を行った。ACC1, FAS, ME, G6PDH, SCD1, SREBP1c, ChREBP, CPT1a, PPAR α などの脂質代謝にかかわる遺伝子およびMTP, CYP7A1などのコレステロール代謝にかかわる遺伝子群では群間で明らかな有意差は認めなかったが、ケイ皮酸投与群ではLDLR, SREBP2,

ABCA1, LXRα などのコレステロール代謝にかかわる遺伝子群でコントロール群に比して有意な減少が認められ、何らかの肝コレステロール代謝に影響を与えると考えられた。しかし、総じて脂質代謝の遺伝子発現にダイナミックな変化は認められず、血中脂質プロファイルの群間差も認めなかったことから、その効果は限定的と思われた。

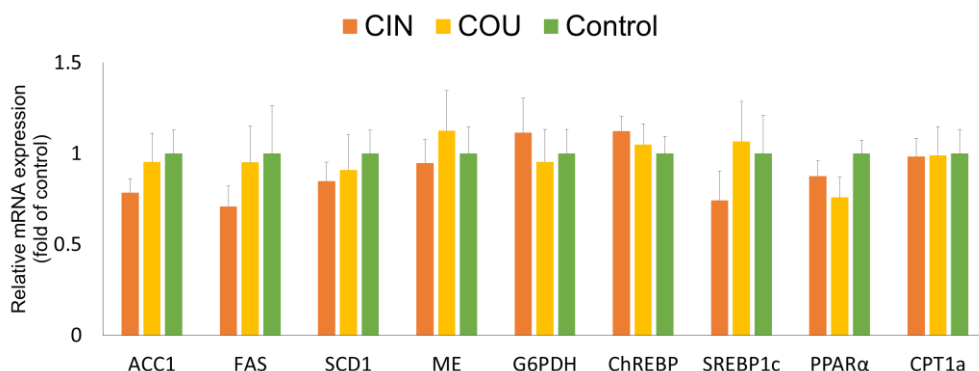


Fig 1. ケイ皮酸および p-クマル酸が脂肪酸代謝に関連した遺伝子発現に与える影響 (値は平均±S. E. で表記 (n=8x3 群))

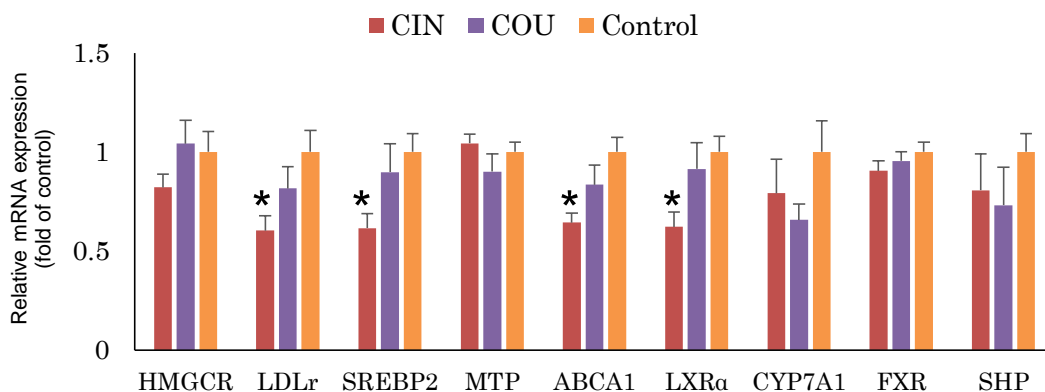


Fig 2. ケイ皮酸および p-クマル酸がコレステロール代謝に関連した遺伝子発現に与える影響 (値は平均±S. E. で表記 (n=8x3 群))

ケイ皮酸の経口投与は LDLr, SREBP2, ABCA1, LXRα などの遺伝子発現を有意に抑制した (*P<0.05 vs Control)。

③ 糖代謝に関連した肝遺伝子発現比較 (Fig 3)

糖代謝にかかわる遺伝子群は、グルコキナーゼ(GK) 活性においてケイ皮酸群、p-クマル酸群で Control 群に比して減少傾向を示した (P = 0.094, P = 0.088, respectively) が群間で有意差を認めず、G6Pase, F1,6BP, PEPCK1, PEPCK2 などの他の糖代謝にかかわる遺伝子発現には影響を与えず、群間で血糖の有意差を認めなかったことも踏まえると、その作用はあっても限定的と考えられた。

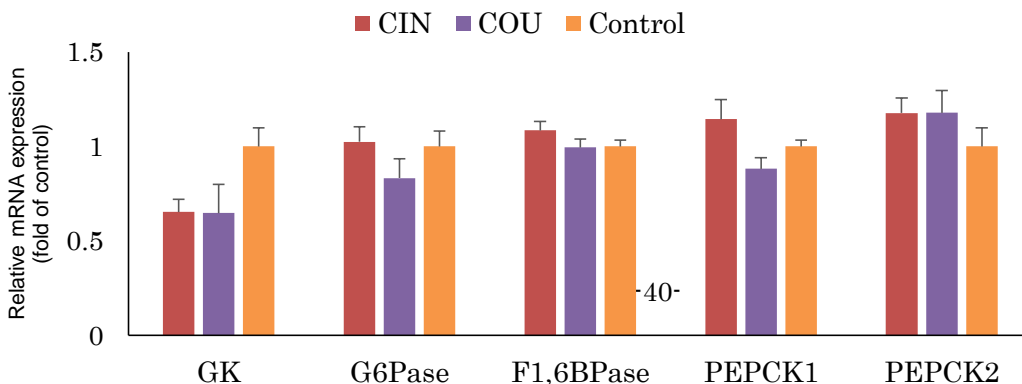


Fig 3. ケイ皮酸および p-クマル酸が糖代謝に関連した遺伝子発現に与える影響（値は平均±S. E. で表記(n=8x3 群)）

グルコキナーゼ(GK) 活性はケイ皮酸群、p-クマル酸群で Control 群に比して減少傾向を示した(P = 0.094, P = 0.088, respectively)。

以上から、ケイ皮酸および p-クマル酸は糖脂質代謝の遺伝子発現に一定の影響を与える可能性はあるが限定的で、抗肥満作用を含むメタボリック症候群改善作用は乏しいと考えられた。

今後、現在進行形で検討中の保険機能成分 X において、メタボリック症候群改善作用が期待されるため、褐色脂肪化の評価に加え、病理組織学的検討、脂肪前駆細胞を用いた in vitro での検討などを加えていく方針である。同検討は、特許申請、論文化の状況を踏まえて次年度以降の実績報告で追って報告予定である。

4 その他
特記事項なし

注) 用紙は A 4 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、図表の挿入可）

