

平成16年度

肥満・糖尿病予防を目的とした香辛料成分によるアディポサイトカインの分泌・発現制御に関する研究

津田 孝 範

(同志社大学研究開発推進機構)

1. はじめに

平成15年国民健康・栄養調査によると、30歳から60歳の男性の3割以上が肥満者(BMIが25以上)であると報告されている。肥満の原因は遺伝因子の他に環境因子である過食、高脂肪食、運動不足が大きく関与している。肥満は、これを基盤として糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病を発症させる。近年の研究結果から脂肪組織は、種々のアディポサイトカイン(脂肪細胞から分泌される生理活性物質)を分泌する最も重要な内分泌臓器であり、その機能制御で肥満あるいは糖尿病を制御できることが明らかにされつつある¹⁾。アディポサイトカインの中でアディポネクチンは、脂肪細胞特異的に発現している重要なアディポサイトカインである。血漿中には高濃度で存在(5 - 10 µg/mL)し、肥満、インスリン抵抗性と負の相関を示す。その機能としては、脂肪酸酸化やインスリン感受性の増強、抗動脈硬化作用などが明らかにされている。現在その遺伝子発現、分泌の上昇作用を有する食品因子が注目されている。最近の研究結果から、肥満は脂肪組織の慢性炎症状態であり、TNF を始めとする炎症性サイトカインによるアディポサイトカインの異常がインスリン感受性の低下を始めとするメタボリックシンドロームの発症に関わることが明らかにされている。このような背景の中で本研究では、食品因子として香辛料に注目し、アディポサイトカインの発現、分泌に関わる香辛料成分を検討してその作用を

DNAマイクロアレイにより解析することを試み、肥満・糖尿病予防を標的とした新たな機能性食品の創製へ貢献することを目的とした。

2. 実験方法

〔実験材料〕

試料としては、紫バジルや赤シソなどに含まれているアントシアニン(シアニジン3 - グルコシド; C3G, シアニジン; Cy, デルフィニジン3 - ルチノシド; D3R, デルフィニジン; Del), ショウガの辛味成分である6 - ジンゲロール(図1)を始めとして市販されている香辛料成分について検討した。

〔アディポネクチンの発現低下を抑制する食品因子検索の評価系〕

マウス脂肪細胞株3T3 - L1は定法に従い培養、成熟脂肪細胞へ分化誘導したものをを用いた。アディポネクチンは炎症性サイトカインであるTNFにより遺伝子発現が低下することが知られている。そこでアディポネクチンの発現低下を抑制する食品因子検索の評価系として3T3 - L1へ各種食品因子を投与して1時間後にTNF を投与(最終濃度10ng/mL)し、15時間後に細胞を回収、総RNAを得た。得られた総RNAよりcDNAを作成

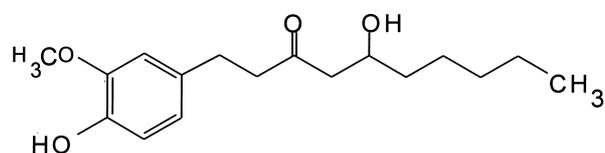


図1 6 - ジンゲロールの化学構造

し、アディポネクチンの遺伝子発現量をリアルタイムPCR法により定量、比較した。

〔DNAマイクロアレイを用いたヒト初代培養成熟脂肪細胞における香辛料成分による遺伝子発現変動の網羅的解析〕

市販品のヒト皮下脂肪組織より分離した前駆脂肪細胞を培養して、コンフルエントになったところで、定法に従い、分化用培地で3日間維持して分化誘導した後、成熟脂肪細胞維持培地へ交換、10日目でアディポネクチンの発現低下を抑制する食品因子検索の結果、抑制効果の明らかになったシアニジン (Cy) を投与した (最終濃度; 100 μ M) (図2)。なお、実験はn = 3として、24時間後に細胞を回収、総RNAを得た。

得られたトータルRNAはアフィメトリクス社のプロトコールに従い、1本鎖cDNA、2本鎖cDNAを経てcRNAを合成した。なおDNAマイクロアレイとしては、アフィメトリクス社のhuman genome focus arrayを用いた。このDNAマイクロアレイ (以下アフィメトリクス社の商品名に従いジーンチップと表記) は、human genome U133setよりアノテーション既知の8793遺伝子を搭載したチップであり、プロトコールに従い、発色・検出を行った。得られた発現強度の結果は、すべてを信頼できるデータとして採用できないためクオリティコントロールを行った。

そこで、市販の解析ソフト (GeneSpring, シリコンジェネティクス社) を用いて、まずコントロ

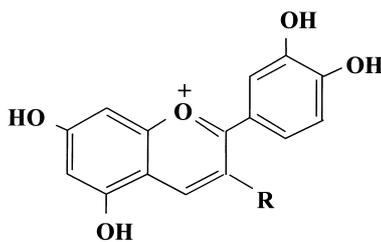
ール値を用いてノーマライゼーションを行った後、アフィメトリクス社のアルゴリズム、発現強度からシグナルのうまく検出できなかったものや発現強度の低い遺伝子を削除して信頼できると思われる4538遺伝子を抽出した。以下の解析はすべてこれを元にして行った。

3. 結果と考察

3.1 アディポネクチンの発現低下を抑制する食品因子の検索

最近の研究から、肥満と脂肪組織における炎症の関係が注目されている。これまでに脂肪組織でのTNF の発現の上昇とインスリン抵抗性がリンクすることは知られていた。最近、肥満マウスの脂肪組織において、単球走化性因子として知られるケモカインmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) のmRNAレベルが上昇すること、脂肪細胞においても、MCP-1はインスリン依存性のグルコースの取り込みを抑制し、インスリン抵抗性に関与するという可能性が示唆された²⁾。その後、肥満マウスの脂肪組織へのマクロファージの浸潤と脂肪組織由来の炎症性サイトカインの発現が、このような炎症細胞に由来することが明らかにされた^{3,4)}。

肥満と脂肪組織における炎症を整理すると、次のようになる。すなわち、肥満による脂肪細胞の肥大化 脂肪細胞あるいは前駆脂肪細胞からMCP-1をはじめとする炎症に関連するケモカインが分泌 脂肪組織への単球遊走、マクロファージへの分化 マクロファージはさらに炎症性サイトカイン (TNF など) の放出、炎症惹起、ケモカイン (MCP-1) 分泌刺激 脂肪組織へさらに炎症細胞をリクルート、サイトカイン、ケモカイン分泌 アディポサイトカイン発現の異常 インスリン感受性低下などのメタボリックシンドロームに関連する異常へ、という図式が考えられる。



R = OH: シアニジン (Cy)

図2 アンチシアニン (Cy) の化学構造

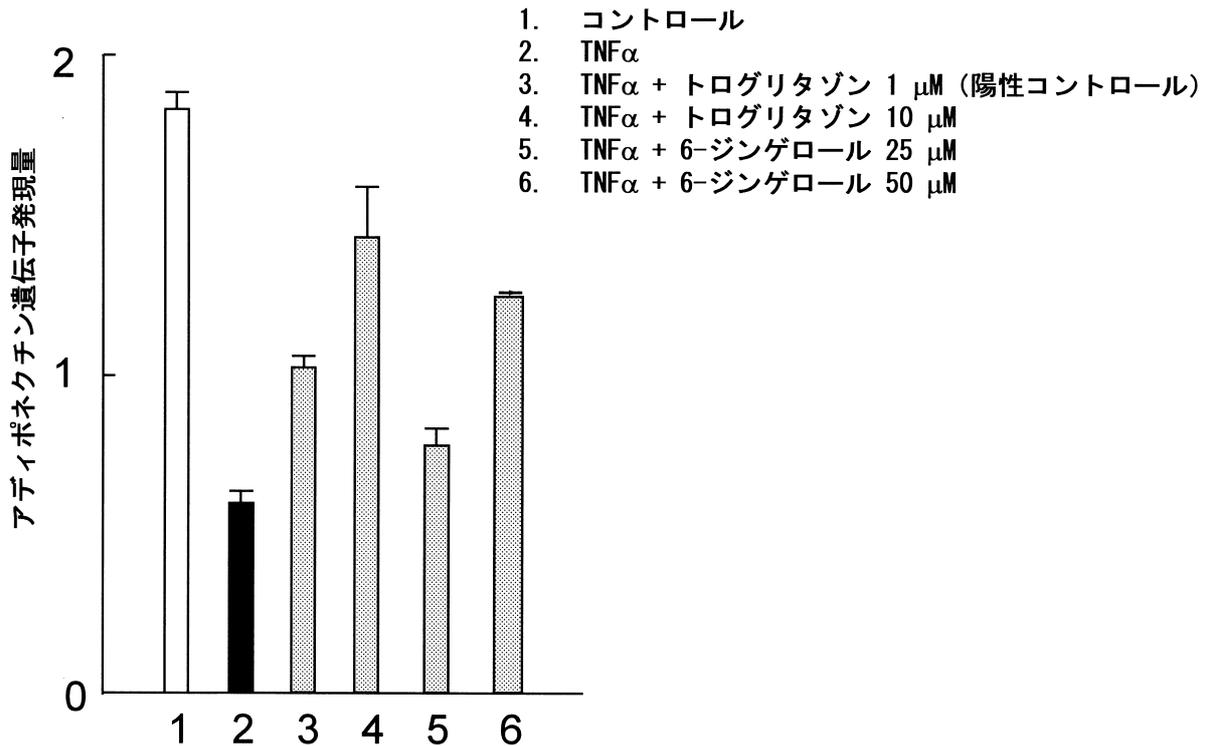


図3 TNF により誘導されるアディポネクチンの遺伝子発現量低下に対する6-ジンゲロールの抑制作用

つまり、肥満 = 脂肪組織の慢性炎症状態であり、これがアディポサイトカインの異常をきたし、その結果メタボリックシンドロームを引き起こす。従って最上流の肥満（内臓脂肪蓄積）の抑制はもちろんであるが、肥満によるアディポサイトカインの発現・分泌異常の正常化は脂肪細胞の機能を維持しメタボリックシンドロームを治療、予防する重要な標的の一つと考えられる。

そこでマウス脂肪細胞株3T3-L1を用いて、TNF の投与によるアディポネクチンの遺伝子発現低下を抑制する香辛料成分を検索した。数十種類の試料を検討した結果、ショウガ中の辛味成分である6-ジンゲロールに抑制効果を見出した（図3）。さらに検討を進めたところ、これまでに著者が高脂肪食による肥満、高血糖に対する抑制作用を明らかにしているアントシアニン類に同様の活性を見出した（図4）。アントシアニンは配糖体よりもアグリコンにより強い活性が認められたので、これまでも研究実績のあるCyについ

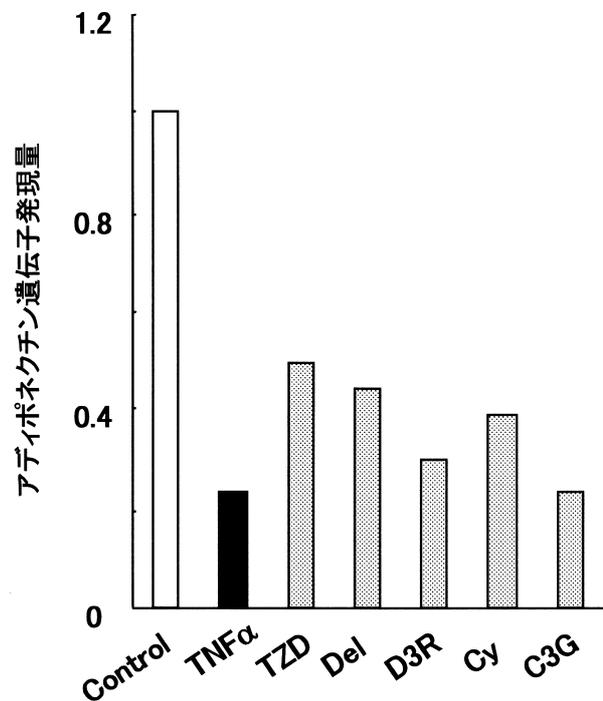


図4 TNF により誘導されるアディポネクチンの遺伝子発現量低下に対するアントシアニンの抑制作用

て、ヒト成熟脂肪細胞へ投与した時の遺伝子発現変動の網羅的解析を行い検討した。

3.2 DNAマイクロアレイによる解析

表1 ヒト脂肪細胞においてCy投与により遺伝子発現量が上昇するアディポサイトカイン，脂質及びエネルギー代謝関連遺伝子

遺伝子 no.	相対発現量 ¹	遺伝子名
U94592	2.24	uncoupling protein 2 (UCP2)
NM_004797	1.82	adipose most abundant gene transcript 1 (Adiponectin)
NM_002666	1.80	perilipin
NM_004364	1.75	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha
NM_005195	1.69	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) delta
S69189	1.68	acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1)
NM_001928	1.67	D component of complement (adipsin)
NM_001909	1.52	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)

1; コントロールの発現量を1.0とした時の各処理群での相対発現量

表2 ヒト脂肪細胞においてCy投与により遺伝子発現量が低下するアディポサイトカイン

遺伝子 no.	相対発現量 ¹	遺伝子名
AL574210	0.388	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1) member 1 (PAI-1)
NM_000600	0.56	interleukin-6 (IL-6)

1; コントロールの発現量を1.0とした時の各処理群での相対発現量

(1) Cyにより変動した遺伝子数

コントロールとの発現強度の比較を行い，Cy投与により遺伝子発現量が1.5倍以上に上昇，あるいは低下した遺伝子を検討したところ，上昇するものとして158遺伝子，逆に低下するものは215遺伝子が認められた。また1.8倍以上に上昇，あるいは低下した遺伝子としては，上昇するものとして40遺伝子，逆に低下するものは72遺伝子が認められた。

(2) Cy投与によるアディポサイトカインの遺伝子発現に対する影響

次にCyのヒト成熟脂肪細胞への作用について，アディポサイトカインと脂質代謝，エネルギー代謝などに関連すると考えられる遺伝子群に注目し，1.5倍以上上昇した遺伝子，逆に低下した遺伝子を抽出した(表1, 2)。その結果Cyの投与により，アディポネクチンの発現上昇が観察された。アディポネクチンは，脂肪細胞特異的に発現しており，肥満や糖尿病で低下し，そのエネルギー消費促進やインスリン抵抗性の改善作用を有する重要なアディポサイトカインの一つであり，その発現，分泌上昇作用を有する食品因子が注目されている⁵⁻⁸⁾。アントシアニン(Cy)はその候補とし

て重要であり，すでに我々によりアントシアニンの高脂肪食負荷による抗肥満，血糖上昇抑制作用やラット脂肪細胞での作用を報告している^{9, 10)}。CyはTNF誘導によるアディポネクチンの遺伝子発現低下を抑制するだけでなく，単独で投与しても発現を上昇させることが明らかになった。

他のアディポサイトカインの発現に対する作用としては，興味深いことにプラスミノゲンアクティベーターインヒビター1(PAI-1)とインターロイキン-6(IL-6)がCyの投与により低下することが明らかになった(表2)。PAI-1は，血管内皮細胞から産生されるが，脂肪細胞からも産生されるアディポサイトカインの一つであり，血栓をとかず線溶能の活性化を阻害，動脈硬化の進展に関わるとしてその制御と脂肪細胞からの分泌の役割が重要視されており，肥満，糖尿病態での血中濃度の上昇が知られている¹⁰⁾。またIL-6は炎症性サイトカインの一つであるが，やはり脂肪細胞からも産生され，インスリン抵抗性に関係し，PAI-1の上昇にも関与することが報告されており，肥満，糖尿病との関連が知られている^{11, 12)}。これらの結果から，Cyの新たな作用として，PAI-1やIL-6の遺伝子発現の制御が示された。

(3) 脂質代謝，エネルギー代謝関連遺伝子の発現に対する影響

脂質代謝，エネルギー代謝などとの関連が考えられる遺伝子群について検討したところ，脱共役タンパク質2 (UCP2)，アシルCoAオキシダーゼ1 (ACOX1)，ペリリピン (PLN) 遺伝子の発現上昇を認めた(表1)。UCP2は主として脂肪細胞に発現しており，ミトコンドリア内膜に存在し，ATPとして合成されるエネルギーを熱として外界へ放出することから細胞内エネルギー消費分子として知られているが，脂肪組織に発現しているUCP2がどの程度エネルギー消費分子として作用しているかどうかは議論が分かれている。一方ACOX1は脂肪酸燃焼に関わる酵素であるが，UCP2，ACOX1の上昇はアントシアニンによるエネルギー代謝，脂質代謝の亢進作用のひとつとして考えられる。一方PLNは，脂肪滴に局在するタンパク質で脂肪滴の蓄積と分解の制御に関連するが，この結果はCyによる発現上昇を介した脂肪滴への影響の可能性を示唆するものと考えられるが，詳細については今後の検討が必要である。

(4) リアルタイムPCR法による遺伝子発現量の検討

ジーンチップでCy投与群に変動が認められたアディポサイトカイン(アディポネクチン，PAI-1，IL-6)と脂質代謝，エネルギー代謝関連遺伝子(UCP2，ACOX1，PLN)についてリアルタイムPCR法による発現定量を行って確認，比較した。いずれもCy投与群において有意な上昇を認めており，ジーンチップの結果を裏付けることができた(図5)。

以上の結果，Cyの投与によりアディポサイトカイン，脂質代謝，エネルギー代謝に関連した遺伝子発現に変動が認められ，これらの変動がその生理機能に関わることが示唆された。特にアディポサイトカインに対する作用については，香辛料

成分の新たな機能を示唆するものとして今後の検討が重要である。

4. おわりに

香辛料成分の脂肪細胞機能の制御を目指してアディポネクチンの発現低下を抑制する香辛料成分の検索を行ない，ショウガ辛味成分である6-ジゲロールやアントシアニンに活性を見出した。アントシアニン(Cy)については，作用機構の解明を目指して脂肪細胞へCyを投与した時の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより解析することを試み，脂肪細胞機能の制御(アディポサイトカインの発現制御)を標的とした新たな機能性食品の創製へ貢献することを目的とした。

その結果，Cyのヒト成熟脂肪細胞への投与により，アディポネクチンの発現上昇が観察されたので，ジーンチップの結果の確認のために，リアルタイムPCR法によるアディポネクチンの遺伝子発現量の定量を行ったところ，ジーンチップと同様の有意な上昇が認められた。またアディポサイトカイン遺伝子発現に対する新たな作用としてPAI-1やIL-6の発現低下作用を見出した。同様に脂質代謝あるいはエネルギー代謝に関連すると考えられる遺伝子群について検討したところ，UCP2，ACOX1，PLNの上昇を認め，これらについてもリアルタイムPCRによる発現定量により有意な上昇が確認できた。

以上により香辛料成分の生理機能としてアディポサイトカインの発現変動への作用を見出すとともに，脂質代謝に関連した遺伝子発現変動についても新たな知見を得ることができた。そしてこれらの変動がその生理機能に関わることが示唆された。今後は種による差，内臓脂肪組織由来の細胞と皮下脂肪組織由来の細胞の相違，個体レベルでの結果を含め，さらに検討を有するが，本研究助成により，香辛料成分の有効利用に関する研究の

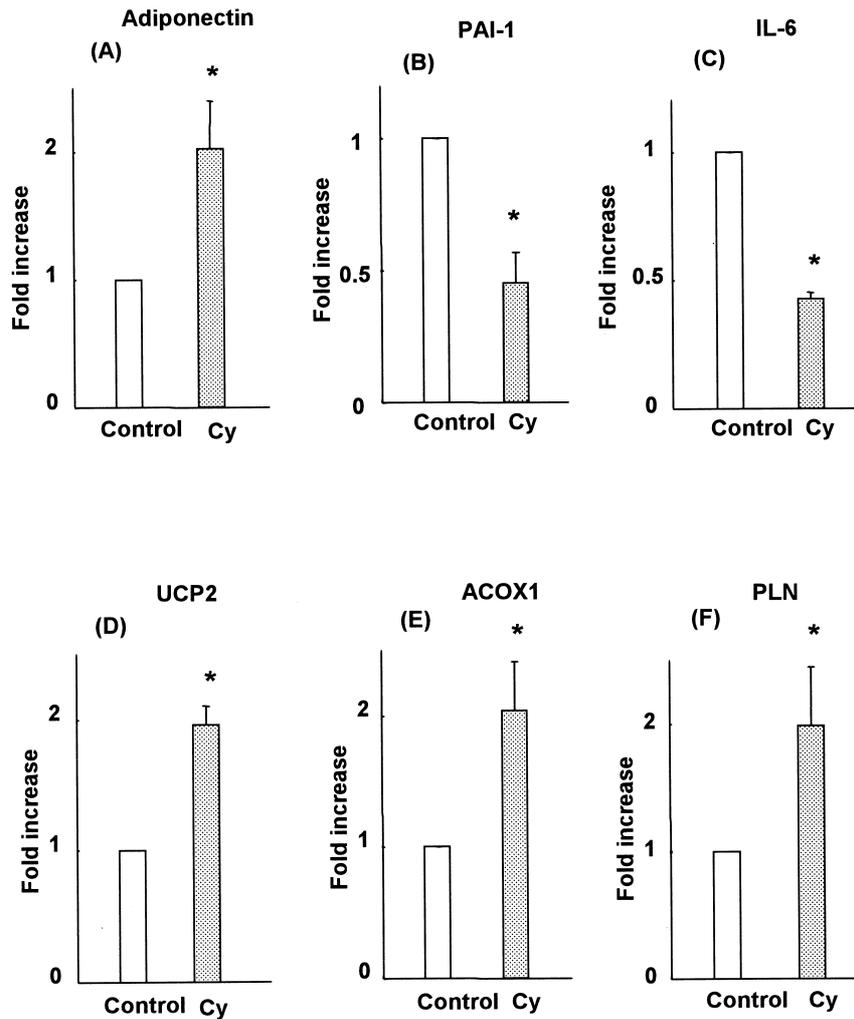


図5 リアルタイムPCR法による遺伝子発現量の定量 * P < 0.05

進展とDNAマイクロアレイをツールとした食品機能研究の一端を担うことができたものと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Shimomura, I., Funahashi, T., Takahashi, M., Maeda, K., Kotani, K., Nakamura, T., Yamashita, S., Miura, M., Fukuda, Y., Takemura, K., Tokunaga, K., Matsuzawa, Y. *Nat. Med.* 2: 800-803, (1996)
- 2) Sartipy, P., Loskutoff, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7265-7270 (2003)
- 3) Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, Jr, A. W. *J. Clin. Invest.* 112, 1796-1808 (2003)
- 4) Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830 (2003)
- 5) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 16286-16289, (1996)
- 6) Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoaka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83, (1999)
- 7) Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota,

- N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., Kadowaki, T. *Nat. Med.* 7: 941-946 (2001)
- 8) Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E., Lodish, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 2005-2010, (2001)
- 9) Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T. *J. Nutr.*, 133: 2125-2130, (2003)
- 10) Tsuda, T., Ueno, Y., Aoki, H., Koda, T., Horio, F., Takahashi, N., Kawada, T., Osawa, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316: 149-157, (2004)
- 11) Skurk, T. and Hauner, H. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28: 1357-1364, (2004)
- 12) Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J. and Caron, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 372-379, (2003)
- 13) Rega, G., Kaun, C., Weiss, T. W., Demyanets, S., Zorn, G., Kastl, S. P., Steiner, S., Seidinger, D., Kopp, C. W., Frey, M., Roehle, R., Maurer, G., Huber, K., Wojta, J. *Circulation*, 111: 1938-45, (2005)

Studies for regulation of adipocytokine gene expression and secretion by the components of spices

Takanori Tsuda

(Office for Research Initiatives and Development, Doshisha University)

Adipocyte dysfunction is strongly associated with the development of obesity and insulin resistance. It is accepted that the regulation of adipocytokine secretion or the adipocyte specific gene expression is one of the most important targets for the prevention of obesity and amelioration of insulin sensitivity. Adiponectin is one of the most important adipocytokines, and is specifically and highly expressed in adipocytes. The plasma adiponectin concentration and mRNA expression level are decreased in the obese and insulin resistant state. In this study, we evaluated the inhibitory activity of reduction of adiponectin expression by the components of spices. 6-Gingerol and anthocyanins (cyanidin; Cy) had the significant activity in vitro using 3T3-L1 adipocytes. Based on these results, we examined the gene expression profile in human adipocytes treated with Cy. The human adipocytes were treated with 100 μ M Cy or vehicle for 24h. The total RNA from the adipocytes was isolated and carried out GeneChip microarray analysis. Based on the gene expression profile, we demonstrated the significant changes of adipocytokine expression (up-regulation of adiponectin and down-regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and interleukin-6) The lipid metabolism related genes(uncoupling protein2, acylCoA oxidase1 and perilipin)also significantly induced by the treatment of adipocytes with Cy. These data have provided a new aspect of physiological functionality of spices related with regulation of obesity and diabetes that merit further investigation.