

脂肪細胞機能発現における抗酸化食品因子の役割 <総説>

上野 有紀*¹⁾, 大澤 俊彦*¹⁾

酸化ストレスの亢進は、種々の生活習慣病の発症・進展に関与することが知られている。肥満では脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞数の増加が起こり、炎症・酸化ストレスが亢進し、糖代謝・脂質代謝が抑制される。脂肪細胞はアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌するが、肥満が発症すると、抗炎症作用・抗糖尿病作用を有するアディポネクチンは低下し、その一方でインスリン抵抗性を惹起するTNF- α 、IL-6、MCP-1等は増加する。

植物性食品中には抗酸化成分が多数存在しており、これらの物質が肥満由来の酸化ストレスを軽減することにより、脂肪細胞機能が改善する可能性を検討するため、我々は植物由来の色素成分アントシアニンに着目した。主要なアントシアニンであるシアニジン (cyanidin; Cy) とその配糖体であるシアニジン-3-O-D-グルコシド (cyanidin 3-O-D-glucoside; C3G) をラット単離脂肪細胞とヒト脂肪細胞に添加して培養することにより、脂肪細胞の機能発現に重要とされるアディポサイトカインや脂質代謝に関連する遺伝子発現に与える影響を、DNA マイクロアレイ法等により検討した。シアニジンは脂肪細胞において、アディポサイトカインであるアディポネクチンの発現を上昇させ、IL-6、plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) の発現を低下する作用を有していることが明らかとなった。肥満状態の肥大化した脂肪細胞ではアディポネクチンは低下し、IL-6、PAI-1はいずれも上昇することから、シアニジンは脂肪細胞に対して、アディポサイトカインの発現を改善する可能性が考えられた。今後、抗酸化食品因子の脂肪細胞機能および肥満への作用機序のさらなる解明が期待される。

キーワード: food factor, adipocyte, metabolic syndrome, oxidative stress, adipocytokine, inflammation, antioxidant

子発現制御機能を紹介する。

I はじめに

過剰な活性酸素の産生は、動脈硬化、がん、糖尿病合併症等の様々な生活習慣病の発症・進展に関与することが知られている。近年、メタボリックシンドロームの原因とされている肥満においても酸化ストレスや慢性炎症が脂肪細胞の機能低下に関与することが明らかにされ、注目を集めている。植物性食品中には抗酸化物質が含まれており、これらが肥満における肥大化した脂肪細胞の機能低下を改善すると考えられる。本稿では、抗酸化食品成分が脂肪細胞機能発現に与える影響に関する知見、特に遺伝

II 脂肪細胞機能とメタボリックシンドローム

脂肪細胞は、脂肪組織を構成する細胞であり、細胞内に中性脂肪を蓄積する。アディポサイトカインは、脂肪細胞にて産生される生理活性物質の総称である。アディポサイトカインには、アディポネクチン、レプチン、レジスチン、TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-6 (interleukin-6)、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) などが知られる。アディポネクチンは、糖代謝・脂質代謝調節作用、抗炎症作用があり、レプチンには食欲調節作用、エネ

*1) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

(連絡先) 上野有紀 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

ルギー消費亢進作用、インスリン作用増進などに働く。一方、レジスチンは、肝臓・骨格筋におけるインスリン情報伝達抑制に働くことにより、またインスリン抵抗性を惹起する物質として知られる。TNF- α 、IL-6、MCP-1は、肥満者の脂肪組織において過剰発現し、アディポネクチンの発現抑制に作用する。PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1)は、plasminogen activatorを阻害することによりフィブリン分解系を阻害し、血栓形成に関与することから、肥満での血管病変に寄与する(表1)。

また AMP-activated protein kinase (AMPK) は、AMPとの結合により活性化され、グルコースの細胞への取り込みおよび脂肪酸酸化の促進に働く。また AMPKは α 、 β 、 γ の3つのサブユニットからなり、 α サブユニットのThr172のリン酸化がAMPKの活性化に必要であることが知られている。糖尿病治療薬のメトホルミンはAMPKの活性化を介して抗糖尿病作用を示す。

peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は、ステロイド受容体スーパーファミリーに属する核内受容体である。主に白色脂肪組織やマクロファージに発現しており、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に必要な因子として知られている。

肥満状態は脂肪組織が蓄積された状態であり、脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞数の増加が寄与することが知られる。また、肥満状態の脂肪組織では、マクロファージ・好中球・T cell等の浸潤が見られることから、慢性炎症が引き起こされ、糖代謝・脂質代謝が抑制されることが明らかにされている。

III 脂肪細胞機能・肥満に対する酸化ストレス・炎症の関与

肥満が発症すると、脂肪組織においては脂肪細胞とマクロファージの相互作用による慢性炎症が誘導される^{1)・2)}。これにより、アディポサイトカイン産生が変化し、脂肪組織機能の低下、メタボリックシンドロームの発症につながる事が報告されている。脂肪組織へのマクロファージへの浸潤は、アディポサイトカインのMCP-1、TNF- α が主に関与することも明らかにされている³⁾。

肥満状態では酸化ストレスが亢進しており、酸化ストレスマーカーの一つとして知られるイソプロスタンが尿中で増加していることが報告された⁴⁾。肥大化した脂肪細胞ではアディポサイトカインの発現調節が変化するが、これに酸化ストレスが関与することが知られる。これまでの研究により、カルボニルストレスは脂肪細胞において、活性酸素種依存的にPAI-1の発現を上昇させることが明らかにされている⁵⁾。

また、マウス由来脂肪細胞3T3-L1を25mMの高グルコース濃度で培養すると、4mMの低グルコース濃度で培養した時と比較して、ミトコンドリア由来活性酸素種が産生増加する⁶⁾。これらのことから、肥満における脂肪細胞機能低下には酸化ストレス・炎症が関与しているといえる。

表1 アディポサイトカインの生理作用

アディポネクチン	糖代謝・脂質代謝調節作用 抗炎症作用 抗糖尿病作用
レプチン	食欲調節作用 エネルギー消費亢進作用 インスリン作用増進
レジスチン	インスリン抵抗性
TNF- α	炎症惹起 インスリン抵抗性 糖代謝異常
IL-6	インスリン抵抗性 糖代謝異常
MCP-1	炎症惹起 単球・マクロファージの浸潤
PAI-1	インスリン抵抗性 血栓形成

表2 ラット単離脂肪細胞におけるレプチン・アディポネクチン分泌・発現に対するアントシアニンの影響

	Cy		C3G	
	7時間後	24時間後	7時間後	24時間後
レプチン				
分泌量	↑	↑	→	→
mRNA量	nd	↑	nd	nd
アディポネクチン				
分泌量	↑	→	→	→
mRNA量	nd	↑	nd	nd

nd: no data

文献⁷⁾改変

IV 抗酸化食品因子による脂肪細胞機能改善の可能性

多くの生活習慣病の発症および進展に酸化ストレスが関与することが報告されている。これまでに酸化ストレスが関与する疾患として知られるものには、がん、動脈硬化、糖尿病、糖尿病合併症などがある。これらの疾病の進展抑制には、抗酸化物質を豊富に含む食品の摂取が有効となりうることが示唆され、その科学的根拠を証明する多くの研究が行われている。

1 抗酸化物質・抗酸化酵素

ヒトの体内には抗酸化酵素および抗酸化物質が存在し、過剰発生したラジカル・脂質過酸化物の消去に働く。抗酸化酵素の代表的なものとしては、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼがある。抗酸化物質としては、脂溶性のビタミンE、水溶性のビタミンC、グルタチオンなどがある。抗酸化物質の役割としては、ラジカル捕捉作用、過酸化分解作用、一重項酸素捕捉作用、酸化酵素阻害作用、金属キレート作用などがある。

2 天然抗酸化食品因子

植物は様々な抗酸化物質を有している。ポリフェノールは、ベンゼン環の2個以上の水素が水酸基(-OH)に置換された物質の総称であり、植物における紫外線防御作用、抗菌作用などに関与することが知られる。

アントシアニンは、シソ、ナス、ブドウ、ブルーベリーなどの赤色や紫色色素であり、アントシアニンに糖が結合した配糖体である。また、アントシアニンは赤インゲン豆、黒インゲン豆、黒大豆にも含まれる。

3 食品因子による脂肪細胞機能調節作用

3-1) ラット単離脂肪細胞におけるアントシアニ

ンの作用

アントシアニンの中でも、シアニジン(cyanidin; Cy) およびその配糖体であるシアニジン-3-O-D-グルコシド(cyanidin 3-O-D-glucoside; C3G) (図1) に注目して実験を行った。

7週齢の雄Wistarラットより副睾丸脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理することにより、脂肪細胞を単離した。この細胞を100 μM Cy または C3G を含む培地、また対照として0.1% DMSO を含む培地でCO₂ 5%、37°C、24時間培養した後、細胞からtotal RNAを抽出した。各遺伝子の発現量は、RT-PCR法を行い、アガロースゲル電気泳動により目的の遺伝子産物を検出し積算値を求めた。また遺伝子発現量は、内因性コントロールとしてβ-actinを使用して補正した。まず最初に脂肪細胞で特異的に発現しているアディポサイトカインのうち、レプチンおよびアディポネクチンの分泌と遺伝子発現量に着目した。

表2に示すように、培養7時間後および24時間後にCy投与群でレプチン分泌量が有意に増加したが、C3G投与群では変化が見られなかった。アディポネクチン分泌量は、Cy投与群では7時間後に有意に増加したが、24時間後には差は見られなかった。一方、C3G投与群はアディポネクチン分泌量に変動はなかった。遺伝子発現量については、レプチン、アディポネクチンともにCy投与群の24時間後に有意に増加することを明らかにした。

次に、脂肪細胞の機能発現において重要な遺伝子リポタンパク質リパーゼ(LPL)、脱共役タンパク質(UCP2)、脂肪酸結合タンパク質(aP2)のmRNA量に対するCyの影響を検討した。Cyは、LPL、UCP2、aP2のmRNA量をいずれも有意に増加した(表3)。さらにこれらのPPARγの関連遺伝子の発現調節に、PPARγの転写活性が関与するか測定したところ、CyはPPARγの転写活性に影響を与えなかったことから、別の遺伝子発現調節機構の存在が示唆

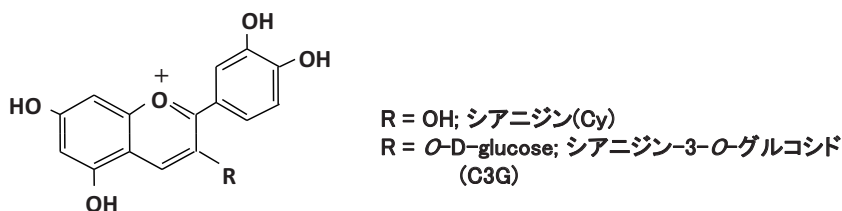


図1 CyとC3Gの化学構造

された。さらに、Cy が糖代謝・脂肪酸酸化亢進に関与する AMPK の活性化に与える影響を検討したところ、ウェスタンブロッティング法により、AMPK の Thr172 のリン酸化を促進することを見出した。この作用は C3G によっても引き起こされることが明らかとなった。これらの結果から、アントシアニンの Cy はラット単離脂肪細胞において、レプチンおよびアディポネクチン、LPL、UCP2、aP2 の mRNA 誘導作用を示すことにより、肥満・糖尿病の改善に働く可能性が示唆された⁷⁾。

さらに Cy および C3G がラット単離脂肪細胞における遺伝子プロファイルに与える影響を検討するために、DNA マイクロアレイ法を行った。実験には、Rat Genome RG34A GeneChip Array (Affymetrix 社製) を用いた。マイクロアレイに搭載された全 8799 遺伝子のうち、検出できた 3962 遺伝子について解析を進めた。対照群と比較して発現の増減 2.0 倍を基準にして抽出すると、図 2 A に示すように、Cy あるいは C3G 投与により発現上昇がみられた遺伝子は 93 あり、Cy 投与群での発現上昇遺伝子は 35、C3G 投与群での発現上昇遺伝子 79、また Cy と C3G 投与群に共通した発現上昇遺伝子は 21 であった。Cy 投与群のみで発現上昇した遺伝子は 14、C3G 投与群のみで発現上昇した遺伝子は 58 であった。一方、Cy あるいは C3G 投与により発現低下にした遺伝子は 17 であり、Cy 投与群での発現低下遺伝子は 14、C3G 投与群での発現低下遺伝子は 7、Cy と C3G 投与群に共通した発現低下遺伝子は 4 であった。Cy 投与群のみで発

現低下した遺伝子は 10、C3G 投与群のみで発現上昇した遺伝子は 3 であった(図 2 B)。これらの結果から、Cy と C3G とではラット単離脂肪細胞において遺伝子発現に対する影響が一部異なることが明らかとなった。Cy と C3G とで共通して発現上昇した脂質代謝に関与する遺伝子は hormone sensitive lipase (HSL) と perilipin であった。また、Cy および C3G は、ラット単離脂肪細胞において、これらの遺伝子発現上昇とともに培養上清のグリセロール・脂肪酸を増加させたことから、脂肪分解活性を上昇させた可能性が示唆された⁸⁾。

3-2) ヒト脂肪細胞におけるアントシアニンの作用
次にヒト脂肪細胞 (33 歳、女性、BMI=25.77) におけるアントシアニンの作用を検討するために、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現プロファイルを解析した。対照群と比較して発現の増減 1.5 倍を基準に変動のあった遺伝子を抽出した。図 3 A に示すように、Cy と C3G 投与に共通して発現上昇した遺伝子は 33 であった。また Cy 投与群のみで発現上昇した遺伝子は 60、C3G 投与群のみで発現上昇した遺伝子は 16 であった。一方、Cy と C3G 投与群に共通した発現低下遺伝子は 29 であった。Cy 投与群のみで発現低下した遺伝子は 82、C3G 投与群のみで発現低下した遺伝子は 7 であった (図 3 B)。Cy、C3G のいずれにおいても遺伝子発現が上昇した遺伝子のうち、adiponectin、uncoupling protein2 (UCP2)、acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1)、脂肪細胞において脂

表3 ラット単離脂肪細胞における脂質代謝及び脂肪細胞分化関連遺伝子発現に対するCyの影響

	LPL	UCP2	aP2
24時間後	↑	↑	↑

表4 ヒト成熟脂肪細胞での遺伝子発現におけるアントシアニンの影響

	C3G	Cy
Apiponectin	↑	↑
PAI-1	↓	↓
IL-6	↓	↓
UCP2	↑	↑
ACOX1	↑	↑
PLN	↑	↑

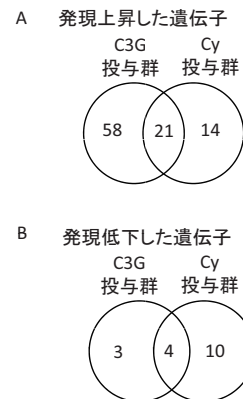


図2 ラット単離脂肪細胞においてアントシアニンにより変動した遺伝子数

文献⁸⁾改変

脂肪分解に働く perilipin (PLN) は、リアルタイム PCR 法においても有意に増加したことから、アントシアニンはヒト脂肪細胞において脂質代謝を亢進する可能性が示唆された (表 4)。また、PAI-1、IL-6 は Cy、C3G のいずれにおいても遺伝子発現が低下することから、アントシアニンはヒト脂肪細胞では、肥満 (細胞肥大化) により増加することが知られるアディポサイトカインを発現抑制する作用を Cy、C3G が持つことが明らかとなった (表 4)⁹⁾。

以上の結果から、シアニジンは脂肪細胞において、アディポサイトカインであるアディポネクチンの発現を上昇させ、IL-6、PAI-1 の発現を低下する作用を有することが明らかとなった。肥満状態の肥大化した脂肪細胞では炎症・酸化ストレスが亢進した状態であり、アディポネクチンは低下し、IL-6、PAI-1 はいずれも上昇することから、シアニジンは肥満状態の脂肪細胞に対して、アディポサイトカインの発現を改善する可能性が考えられた。

おわりに

これまで我々の研究室では、抗酸化食品因子の生活習慣病における作用機序の解析を進めてきた。抗酸化食品因子は生体内における抗酸化作用を示すだけでなく、がん・糖尿病・肥満等の発症および進展に関与する遺伝子発現調節にも関わるということが明らかとなった。

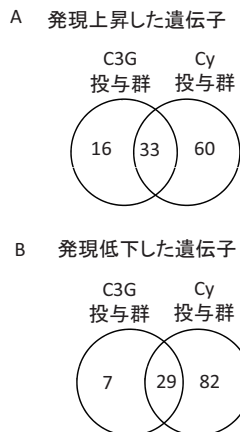


図3 ヒト脂肪細胞において
アントシアニンにより変動した遺伝子数

文献⁹⁾改変

近年では、肥満の発症にも酸化ストレスが関与することが明らかとなり、抗酸化食品因子の摂取が肥満・メタボリックシンドロームの予防・進展の抑制に有効ではないかと期待され、基礎研究が進められている。本稿で紹介したように、抗酸化食品因子は抗酸化性だけでなく、抗炎症作用、脂質代謝改善作用など、種々の活性を示すことが明らかにされつつある。

今後、抗酸化食品因子の肥満・メタボリックシンドロームの予防・進展の抑制機構のさらなる詳細な機序解明とともに、ヒト臨床への応用が期待される。

参考文献

- Xu, H. et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112: 1821-1830
- Weisberg, S. P. et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796-1808
- Kanda, H. et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116: 1494-1504
- Keaney, J. F. Jr. et al. (2003) Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (3): 434-439
- Uchida, Y. et al. (2004) Cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat white adipocyte via reactive oxygen species-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 279 (6): 4075-4083
- Lin, Y. et al. (2005) The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 280 (6): 4617-4726
- Tsuda, T. et al. (2004) Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 149-157
- Tsuda, T. et al. (2005) Gene expression profile of isolated rat adipocytes treated with anthocyanins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1733 (2-3): 137-147
- Tsuda, T. et al. (2006) Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem. Pharmacol.* 71 (8): 1184-1197

(平成28年1月6日 受理)

“Role of antioxidative food factors in adipocytes”

Yuki UENO, Toshihiko OSAWA

Abstract

Oxidative stress is involved in the onset and progress of various lifestyle diseases. Obesity causes hypertrophy and an increase of adipocytes. Additionally, it enhances oxidative stress and suppresses glucose metabolism and lipid metabolism. Adipocytokines are secreted from adipocytes. In the case of obesity, adiponectin is downregulated, and TNF- α , IL-6, and MCP-1 are upregulated.

Antioxidants are abundant in plants, and we focused on anthocyanins, which is a pigment and has antioxidant activity. Cyanidin (Cy) or cyanidin-3-*O*-D-glucoside was administrated to isolated rat adipocytes and human adipocytes and analyzed by techniques such as DNA microarray. Cy upregulated the expression of adiponectin mRNA and downregulated the expression of IL-6 and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in adipocytes. In the hypertrophic adipocytes, the expression of adiponectin is decreased, and the levels of IL-6 and PAI-1 are increased. Therefore, Cy has the potential to improve the expression of adipocytokines in adipocytes. In future, we expect that further studies would uncover the mechanism of action of antioxidative food factors on adipocytes and obesity.

Key words: food factor, adipocyte, metabolic syndrome, oxidative stress, adipocytokine, inflammation, antioxidant