

フィトケミカルの保健機能についての検討

高橋 君子 (管理栄養学科)

飯塚 美伸 (平成会介護老人保健施設グリーンケアハイツ)

石橋 克之 (坂下厚生病院内科)

宍戸 昌一郎 (会津西病院内科)

谷口 亜希子 (会津大学短期大学部食物栄養学科)

眞鍋 久 (淑徳大学看護栄養学部栄養学科・会津大学短期大学部食物栄養学科)

Health Function of Phytochemicals

Kimiko Takahashi¹, Yoshinobu Iizuka², Katsuyuki Ishibashi³, Shoichiro Shishido⁴,
Akiko Taniguchi⁵ and Hisashi Manabe^{5,6}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Kamakura Women's University, ²Director of the Facilities, Heiseikai Green Care Heights, ³Department of Internal Medicine, Bange-Kosei Hospital, ⁴Department of Internal Medicine, Aizu-nishi Hospital, ⁵Department of Nutrition and Dietetics, Junior College of Aizu, ⁶School of Nutrition, Shukutoku University

Abstract

Phytochemicals have been suggested to be effective for reducing obesity. Rutin, a phytochemical, was added to murine adipocytes, and the production of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1, an adipocytokine), and lipoprotein lipase were measured. The addition of rutin resulted in both a dose-dependent increase in the expression of PAI-1 mRNA and a dose-dependent increase in the expression of lipoprotein lipase mRNA in the adipocytes; however, no change was observed in the secretion or activity of PAI-1. These results suggest that rutin may be effective for reducing body fat, and thus foods containing rutin should be included in the diet.

Key words: phytochemicals, adipocytes, lifestyle-related disease, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), lipoprotein lipase (LPL)

キーワード: フィトケミカル、脂肪細胞、生活習慣病、プラスミノゲンアクチベーター-1 (PAI-1)、リポプロテインリパーゼ (LPL)

はじめに

肥満とは脂肪細胞に脂肪が大量に蓄えられることであり、このような脂肪細胞から分泌される悪

玉アディポサイトカインが増加し、これらのアディポサイトカインがさまざまな病変を引き起こすと考えられている¹⁾。脂肪細胞からは多様なアディ

ポサイトカインが分泌されるが、主に正常な脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインには、満腹中枢刺激や脂肪分解に働くレプチン、血糖低下作用のあるアディポネクチンなどがある²⁾。一方、悪玉アディポサイトカインは脂肪を過剰に蓄えた脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性、脂質異常症、高血圧といった生活習慣病を起こすレジスチン、TNF α やアンジオテンシノーゲンなどを分泌する^{3) - 6)}。さらに、血管壁を異常増殖させ血管腔狭窄を起こすヘパリン結合性上皮細胞増殖因子や血栓形成を高める Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) も分泌され、肥満を放置すると生活習慣病の最悪の病態である動脈硬化の危険性が増大する^{7) - 8)}。

悪玉アディポサイトカインのひとつである PAI-1 とは、様々な細胞で産生・分泌され、フィブリンを分解する線溶酵素のプラスミン、ウロキナーゼや組織型 plasminogen activator (tPA) などの阻害物質である^{9) - 12)}。血液中に PAI-1 が増加すると、血液流動性の低下や血栓形成の亢進が起こりやすくなる^{9) - 10)}。通常生体内では、プラスミンやウロキナーゼ、tPA などの線溶酵素と PAI-1 のバランスが保たれているが、この PAI-1 分泌が亢進することで、血栓性疾患や線維化病変など種々の疾患の予後に影響を与えることが解ってきた^{13) - 17)}。

一方、脂肪細胞にはリポプロテインリパーゼ (LPL) が存在し、必要に応じて脂肪細胞内に蓄えられている中性脂肪から脂肪酸を遊離する酵素である^{18) - 19)}。LPL 活性やその量的な増加は、貯蔵脂肪の燃焼を促進する¹⁸⁾。

脂肪細胞から分泌される悪玉アディポサイトカインによる生活習慣病予防のため、肥満率の低下を目標に様々な健康増進を促す取り組みがなされているが、生活習慣病の有意な減少は未だ認められていない²⁰⁾。生活習慣病の原因となる肥満の予防や解消には運動と野菜を中心とした食事改善が重要であり、野菜・果物などに含まれる食物繊維が食事の糖質や脂質の吸収を穏やかにするばかりでなく、野菜・果物の過剰摂取は禁物であるが、これらの特徴的な色、香りや風味の元になってい

る化学物質 (フィトケミカル) が脂肪細胞の生理作用に効果をもたらすことが示唆されている^{21) - 26)}。

近年、生活習慣病の予防や健康維持のためにフィトケミカルの保健機能が大いに期待されており、その詳細な生理作用およびそのメカニズムの解明が待たれている。本研究では脂肪細胞に対するフィトケミカルの効果を悪玉アディポサイトカインのひとつである PAI-1 産生と貯蔵脂肪減少に関与する LPL 発現に着目して検討した。

材料および方法

1. 脂肪細胞の分化およびフィトケミカル曝露

脂肪細胞に分化する Swiss albino マウス由来線維芽細胞 3T3-L1 細胞 (JCRB9014) を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより分株を受けた。培養は10%牛胎児血清 (Tissue Culture Biologics, Tulare, CA) 添加、ダルベッコ変革イーグル培地 (DMEM; Sigma Aldrich, St Louis, MO) で37°C、5%CO₂ 湿潤インキュベーターで行った。脂肪細胞への分化は、Caprio らの方法に従った²⁷⁾。すなわち、3T3-L1 細胞が 6-well プレート (Coster, Corning, NY) 中で confluent になった後、上記培地に167 nM インスリン、0.5 μ M イソプテルメチルキサンチン、1 μ M デキサメタゾン (いずれも和光純薬, 東京) を添加した培地で48時間培養して脂肪細胞へ分化させた。その後167 nM インスリンのみを添加した培地を48時間ごとに交換し分化状態を維持した。この操作による細胞数の変化は認められず、細胞内への脂肪貯蔵をオイルレッド (和光純薬) の取り込み増加により確認した²⁷⁾。

脂肪細胞へ分化させた 3T3-L1 細胞に、無血清培地すなわち 0.3mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA; Boehringer, Indianapolis, IN) 添加 DMEM にフィトケミカルを溶解・混和して添加した。溶解に際し、水溶性のフィトケミカルは DMEM 培地に、脂溶性のフィトケミカルは100%エタノール (和光純薬) に高濃度で溶解したストックを作成し、添加時に上記培地へ溶解して用いた。ここで用いた溶媒エタノール量では 3T3-L1 細胞への影響がないことを確認した。

フィトケミカルは、ソバに含まれるルチン (200 $\mu\text{g/ml}$; 和光純薬)、ぶどうやブルーベリーに豊富な代表的なアントシアニンであるデルフィニジン (10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma Aldrich) さらに、お茶、コーヒーにそれぞれ含まれるカテキン (0.2 $\mu\text{g/ml}$; 和光純薬)、クロロゲン酸 (1.25 $\mu\text{g/ml}$; 和光純薬) を 3T3-L1 細胞に加えた。それぞれの培養時間後に培養上清を試験管にとり -20°C で保存し、細胞から Trysol (Invitrogen; Carlsbad, CA) を用いて総 RNA を抽出した。

用いたフィトケミカルの濃度は、1日に摂取する平均的な食品に含まれるそれぞれのフィトケミカル量がすべて体液に移行したと考えられる濃度を最大として無血清培地に添加した^{21), 25), 28)-29)}。

2. RT-PCR 法による遺伝子発現量の比較

脂肪細胞中の総 RNA は TRIzol (Invitrogen) およびクロロホルム、イソプロパノール、エタノール (いずれも和光純薬) を用いて TRIzol の操作方法に従って抽出した。抽出した総 RNA は純水に溶解し、その量を 260nm での吸光度を測定して、等量となる試料を以下の RT-PCR 増幅操作に用いた。

上記の抽出総 RNA 1 μl 中の PAI-1、LPL およびグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA をそれぞれワンステップ RT-PCR キット (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて増幅した。マウス PAI-1 遺伝子増幅プライマーセットは、フォワードプライマーは 78-bp から開始する 5'-AGCTGAGCGACAGCCAACAAGAGCCAATCA-3'、リバーズ側配列は 450-bp からの 5'-CAGTACTGATCTTACTCTTGTCCTACGGCC-3' であり、403-bp の産物を得た³⁰⁾⁻³¹⁾。

マウス LPL プライマーセットは、フォワード側は 975-bp から開始する 5'-ACGTGGACCAGCTGGTGAAG-3'、リバーズ側配列は 1218-bp からの 5'-CTTTGTAGGGCATCTGAGAG-5' であり、244-bp の産物を得た¹⁸⁾⁻¹⁹⁾。GAPDH プライマーは哺乳類のコンセンサス配列部位を増幅し 540-bp の断片を得た³²⁾⁻³³⁾。

RT-PCR は、42°C-30分、95°C-5分を 1 サイクル、95°C-1 分、55°C-1 分、72°C-4 分を 25 サイクル、72°C-5 分を 1 サイクルの条件で増幅した。得られた産物の 7 μl を 4% アガロース-トリス-酢酸-EDTA (いずれも和光純薬) ゲルで電気泳動後、ゲルを臭化エチジウム (和光純薬) で染色した。電気泳動で分離した分画の密度を Scion Image (Frederick, MD) で解析し、それぞれの試料中の GAPDH mRNA を標準として PAI-1 および LPL mRNA 発現量を比較した。

3. PAI-1 の定量および測定

フィトケミカルを添加して培養した 3T3-L1 脂肪細胞から培養上清に分泌された総 PAI-1 (活性型および非活性型) 量を ELISA キット (コスモバイオ, 東京) を用いて定量した。PAI-1 抗体をコートした 96-well プレートに培養上清 100 μl を加え室温で振動しながら反応させた。30分間後に洗浄し、マウス PAI-1 一次抗体液を 100 μl ずつ添加し室温で 30分間反応を行った。反応後洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体を 100 μl ずつ添加し室温でさらに 30分間反応させた。二次抗体反応の後洗浄を行い、ペルオキシダーゼ基質を 100 μl ずつ加えて発色させ、1N 硫酸 (和光純薬) 50 μl を添加することで発色反応を停止させてから 450 nm での吸光度を測定した。

さらに、培養上清中の PAI-1 活性をウロキナーゼに対する合成基質 spectrozyme UK (American Diagnostica; Stamford, CT) を用いて測定した。3T3-L1細胞培養上清 32 μl に過剰量の 100 IU/ml ウロキナーゼ (田辺三菱製薬; 大阪) 32 μl を添加後のウロキナーゼ活性量を 5 $\mu\text{mol/L}$ spectrozyme UK の発色を 405nm で測定することにより、ウロキナーゼ活性の阻害量を PAI-1 活性量とした。

$$\text{PAI-1 活性量 (IU/ml)} = (\text{添加ウロキナーゼ活性値}) - (\text{検出したウロキナーゼ活性値})$$

それぞれの試料測定は triplicate で行った。統計的な比較は Student t test を用い、p 値 < 0.05

を有意差ありとし、グラフ上の表記は、平均値±SDで行った。

結果

カテキンおよびクロロゲン酸の添加量を上記のルチンおよびデルフィニジンと同等濃度(10~200 µg/ml)添加24時間後の観察では、接着性培養細胞である3T3-L1細胞の剥離、死滅が観察された。一方、デルフィニジン、ルチンの添加では細胞の形態に変化は認められなかった。

このためカテキンおよびクロロゲン酸は、それぞれ0.2、1.25 µg/mlを用い、添加24時間後のPAI-1 mRNA発現量をフィトケミカル非添加群と比較した(図1左)。デルフィニジン、ルチン、カテキンおよびクロロゲン酸添加によるPAI-1

mRNA発現量は、いずれもフィトケミカル非添加群との有意差は認められなかった。また同濃度のフィトケミカルを作用させた脂肪細胞培養上清中の総(活性型および不活性型)PAI-1量をELISA法で測定した(図1右)。フィトケミカル添加によるPAI-1分泌量に有意差は認められなかったが、デルフィニジンおよびクロロゲン酸ではPAI-1分泌(あるいは放出)量の増加傾向が認められた。ここでカテキンおよびクロロゲン酸は大量摂取による脂肪細胞傷害を考慮しなければならないこと、細胞への傷害性が低いと考えられるデルフィニジン添加によるPAI-1分泌量が増加傾向であったこと、および福島県会津地域で開発・栽培が活発に行われている農産品にルチン高発現ソバがあることから³⁴⁾、ルチンに絞って以下

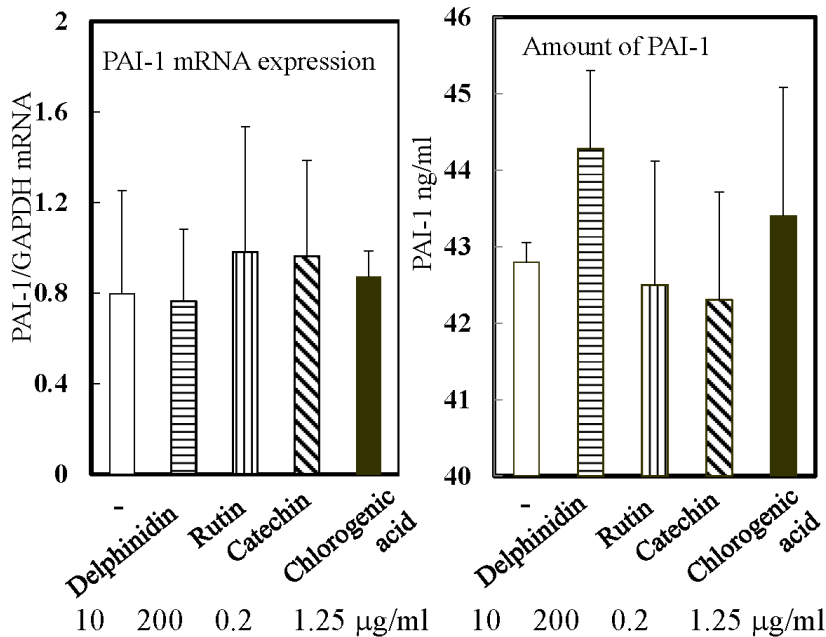


図1 各フィトケミカルの効果比較

脂肪細胞へ分化させた3T3-L1細胞に記載量のフィトケミカルをそれぞれ添加し24時間培養後、総RNAおよび培養上清をそれぞれ採取した。総RNA中のPAI-1およびGAPDH mRNAをRT-PCR法で増幅後、アガロースゲル電気泳動し、GAPDH mRNA分画密度に対するPAI-1 mRNA量(分画密度)をSicon Imageで数値化した(左)。培養上清中の総PAI-1量をELISAキットを用いて測定した(右)。

□ open bar: フィトケミカル無し; ▨ border bar: 10 µg/ml デルフィニジン; ▨ striped bar: 200 µg/ml ルチン; ▨ dashed bar: 0.2 µg/ml カテキン, ▨ solid bar: 1.25 µg/ml クロロゲン酸。

数値は平均値±SDで示した。フィトケミカル無添加群と比較し有意差検定(student t test)を行った(n=5)。

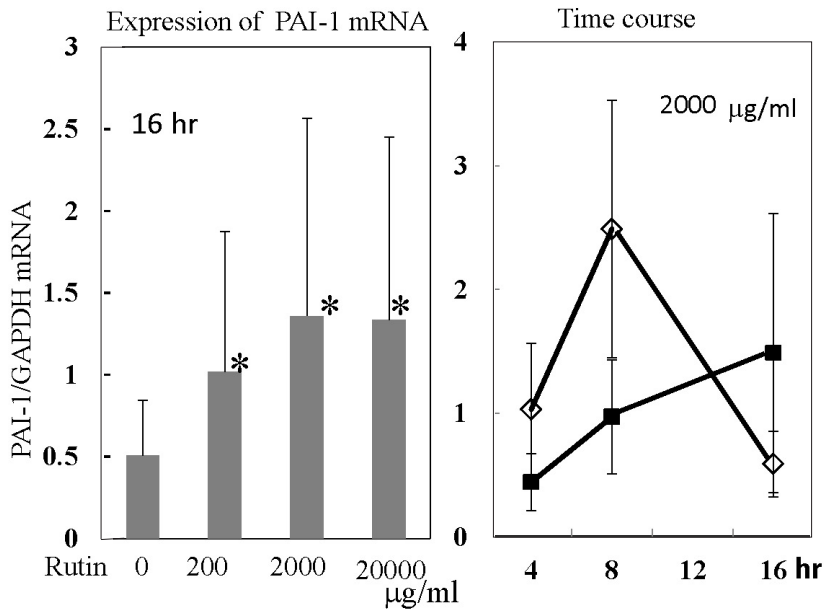


図2 ルチンのPAI-1 mRNA発現への影響

脂肪細胞へ分化させた3T3-L1細胞に0, 200, 2,000, 20,000 µg/mlルチンを添加し16時間後のPAI-1 mRNAを図1と同様の方法で測定した(左)。また、2,000 µg/mlルチンを添加し4, 8, 16時間後のPAI-1 mRNA量を比較した(右)。

■ : 2,000 µg/mlルチン添加群 ; ◇ : ルチン非添加群

数値は平均値±SDで示した。フィトケミカル無添加群と比較し有意差検定を行った(n=5)。* : p<0.05。

の検討を行った。

ルチン添加量を0, 200, 2,000, 20,000 µg/mlと設定し添加16時間後、それぞれのルチン添加3T3-L1脂肪細胞のPAI-1 mRNA発現量を比較した(図2左)。ルチン非添加対象群に比べて、200, 2,000, 20,000 µg/mlいずれの濃度においてもルチン添加群では、有意にPAI-1 mRNAの発現量が増加した。次に、2,000 µg/mlルチン添加によるPAI-1 mRNA発現量の経時的な変化を測定した(図2右)。ルチン添加4から16時間後まで、ルチン添加によるPAI-1 mRNA発現量はゆるやかに増加し、ルチン添加16時間後のPAI-1 mRNA発現量は4時間後に比べて有意に増加していた。また、ルチン非添加群は16時間後にPAI-1 mRNA発現の顕著な低下が認められ、PAI-1 mRNA発現量はルチン添加群と逆転した。

次に、3T3-L1細胞培養上清中への総PAI-1分泌量の経時変化をELISA法により測定した(図3左)。培養上清中の総PAI-1は経時的に分泌・

蓄積されていたが、ルチン添加による有意差は認められなかった。8から16時間の2,000 µg/mlルチン曝露によりPAI-1分泌量が抑制される傾向がみられた。さらに、3T3-L1細胞培養上清に過剰量のウロキナーゼを添加し、阻害されなかったウロキナーゼ活性を測定することで、分泌されたPAI-1活性(ウロキナーゼ阻害活性)を測定した(図3右)。高用量(2,000および20,000 µg/ml)ルチン添加群では、ルチン曝露4時間よりも8時間群でPAI-1活性が高い傾向にあったが、200 µg/mlルチンの8時間添加群では、PAI-1活性の減少傾向が認められた。

脂肪細胞のPAI-1 mRNA発現および分泌PAI-1量とその活性に関して、ルチン添加が一時的な抑制にとどまったことから、貯蔵脂肪を分解するLPL mRNAの発現について、上記と同様のルチン添加条件で測定した(図4左)。LPL mRNA発現量は、200および2,000 µg/mlルチン添加群で増加傾向を示したが、20,000 µg/mlル

チン添加群でのみ200および2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加群に比べて有意な低下が認められた。また、2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加後の LPL mRNA 発現の経時的な発現量は、4～16時間いずれでもルチン添加による有意差は認められなかった (図4右)。

考察

貯蔵脂肪が増加し容積を増した脂肪細胞がさまざまな生理活性物質を分泌・放出することで生活習慣病が発症することが知られている^{1)~3)}。すなわち、肥大化した脂肪細胞からはレジスチンや TNF α を分泌することでインスリン抵抗性を増加させ血糖値を上昇させる³⁾⁴⁾。またヘパリン結合性上皮細胞増殖因子の分泌により血管壁細胞の増殖を促し血管を硬化させ⁶⁾、アンジオテンジノーゲンの分泌により血圧を上昇させる⁵⁾。特に肥満の場合には脂肪細胞が PAI-1 分泌により血液流

動性の低下と血栓形成性が増加することで、閉塞性循環器疾患を誘発しやすくする^{7)~8)}。これらの複合的作用により、肥満が高血糖、高血圧、脂質異常症、動脈硬化等の生活習慣病を引き起こすと考えられている^{3)~8)}。

このような生活習慣病の予防や改善には、野菜中心の食生活への変換が必要である^{21)~26)}。野菜や果物には、ビタミン、ミネラル、水分といった生体に不可欠な栄養素だけでなく、それぞれの野菜・果物の特徴を発揮する成分すなわちフィトケミカルを含んでいる^{21)~26)}。これらのフィトケミカルが生理活性を持つ可能性が強く示唆されていることから、培養脂肪細胞への悪玉生理活性物質分泌抑制作用を検討する目的で、デルフィニジン、ルチン、カテキンおよびクロロゲン酸を添加し、PAI-1 mRNA および PAI-1 分泌量の測定を行った。

高濃度のカテキンおよびクロロゲン酸添加は、

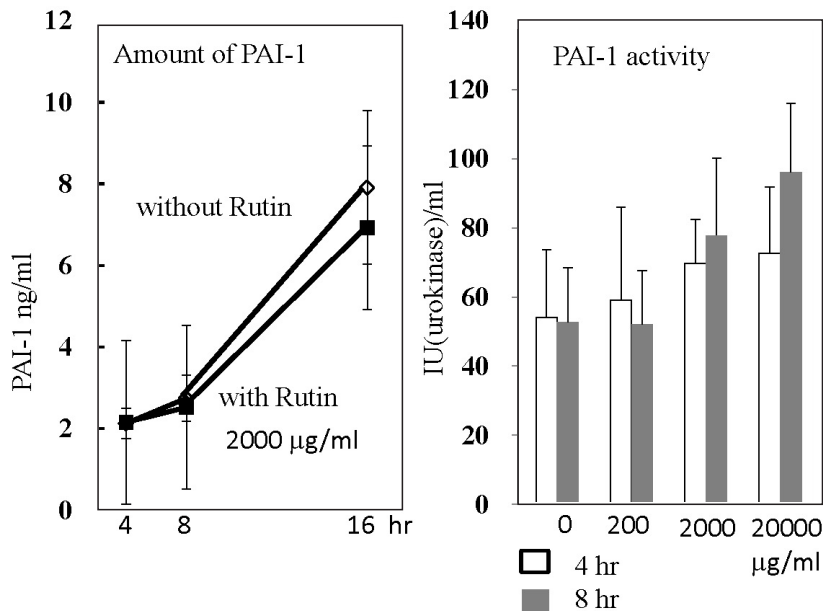


図3 ルチンによるPAI-1分泌量の変化

3T3-L1脂肪細胞へ2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加後の培養上清中に存在する総PAI-1量をELISAキットを用いて、ルチン添加4、8および16時間後に測定した(左)。■: 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加群; ◇: ルチン非添加群
さらに、この4 (open bar) および8 時間 (solid bar) 培養上清中のPAI-1 活性をウロキナーゼおよび合成基質を用いて定量した(右)。数値は平均値 \pm SDで示した。フィトケミカル無添加群と比較し有意差検定を行った(n=5)。

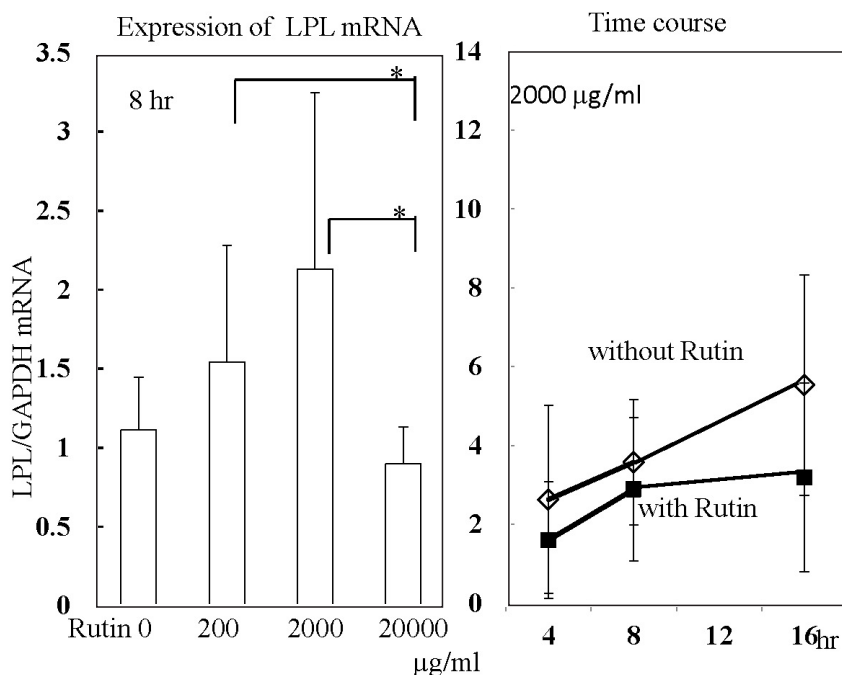


図4 ルチンのLPL mRNA発現への効果
 脂肪細胞へ分化させた3T3-L1細胞に0, 200, 2,000, 20,000 µg/mlルチンを添加し8時間後のLPL mRNA発現量を図1と同様の方法で測定した(左)。また、2,000 µg/mlルチン添加後のLPL mRNA発現量の経時変化を4, 8, 16時間後に測定した(右)。■: 2,000 µg/mlルチン添加群; ◇: ルチン非添加群
 数値は平均値±SDで示した。フィトケミカル無添加あるいは各濃度群と比較し有意差検定を行った(n=5)。*: p<0.05.

3T3-L1 脂肪細胞の剥離・浮遊に加え、GAPDH mRNA 発現の低下、PAI-1 分泌量の急増を認めたことから、高濃度のカテキンおよびクロロゲン酸は脂肪細胞に毒性を持ち、脂肪細胞内に蓄えられていた PAI-1 も放出したと考えられた。この細胞傷害作用が脂肪細胞特異的であれば、体脂肪の減少につながり肥満解消に有効であると考えられるが、一時的であるにせよ細胞内に蓄えられた PAI-1 の大量放出があることは、循環器系疾患のリスクを高めてしまう可能性があると考えられる。このような急激な作用が体内で起こらないように、消化管でフィトケミカルの吸収量が限定されていることが示唆されている³⁵⁾。

低濃度のカテキン (0.2 µg/ml) およびクロロゲン酸 (1.25 µg/ml) は、脂肪細胞剥離を起こさなかったが、PAI-1 mRNA発現量および分泌量

への効果は、カテキンおよびクロロゲン酸ともに無添加群と有意差を認めなかった(図1)。一方、デルフィニジンおよびルチンの添加による培養脂肪細胞の剥離は認められず、GAPDH mRNA の低下も認めなかったことから、これらのフィトケミカルによる脂肪細胞への細胞毒性は認められないと考えられた。しかし、デルフィニジンおよびルチン添加によって PAI-1 mRNA 発現および分泌量に有意な低下は認められなかった。デルフィニジン添加による脂肪細胞からの PAI-1 分泌は有意差が認められないものの増加傾向があるため、また福島県会津地域でルチン産生能の高いソバの研究・栽培が活発に行われていることから³⁴⁾、ルチン添加量および曝露時間による脂肪細胞への作用を調べた。

ルチン濃度200~20,000 µg/mlで濃度依存的に

PAI-1 mRNA 発現量の増加が認められた (図 2)。経時的な PAI-1 mRNA 発現量は、4～8 時間まではルチン添加は抑制的に働いたが、16 時間ルチン曝露では非添加群に比べ PAI-1 mRNA 発現は増加に転じた。この結果は、ルチン曝露 8 時間以内であれば、脂肪細胞の PAI-1 mRNA 発現は抑制される可能性を示唆した。

PAI-1 の増加は血液流動性の低下や血栓形成性の亢進を起こすばかりでなく、肝硬変や肺線維症、ケロイド形成といった線維化病変の指標となる³⁶⁾⁻³⁹⁾。このため肥満脂肪細胞からの PAI-1 が増加し、血流によって線維化病変部位へ大量に流入することは、線維化を増悪する可能性が高くなるため、脂肪細胞の PAI-1 活性が増加することも健康増進には好ましくない。

そこでルチン添加による脂肪細胞からの PAI-1 分泌量の変化を測定すると、ルチン添加により 3T3-L1 脂肪細胞が分泌する総 PAI-1 分泌量は、経時的に蓄積した (図 3 左)。しかし、有意差は認められなかったがルチンの添加で PAI-1 分泌量の抑制傾向を示した。また、分泌 PAI-1 によるウロキナーゼ阻害活性は、2,000 あるいは 20,000 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度ルチン存在下では、有意差は認められなかったが増加傾向を示した。しかし 200 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加群では、4～8 時間の曝露で有意差を認めないものの阻害活性の低下が認められた。この結果は、PAI-1 mRNA の発現がルチン濃度依存的に増加するものの、曝露 8 時間まではルチンが PAI-1 mRNA 発現に対して抑制的に働いていることと一致した。

生体内で PAI-1 は、必要に応じて活性を持たない前駆型からペプチド結合の一部が分解されて活性型となる⁹⁾⁻¹⁰⁾。この PAI-1 がウロキナーゼ等のプラミノーゲンアクチベーターと結合した複合体を形成すると、PAI-1 の阻害活性は消失する。本研究で使用した PAI-1 ELISA キットは活性の有無にかかわらず総 PAI-1 を検出したため、ルチンの総 PAI-1 分泌抑制効果は認められなかったが、PAI-1 活性の測定により、低用量ルチン (200 $\mu\text{g/ml}$) 添加後 4～8 時間で PAI-1 活性の低下傾向が認められたことから (図 3 右)、脂肪

細胞周囲で 8 時間以内適量のルチンが存在することは、PAI-1 活性抑制に効果を示す可能性が示唆された。また、ルチン曝露 16 時間で濃度依存的な PAI-1 mRNA 発現量の増加が認められたが (図 2)、曝露 8 時間までは、むしろ PAI-1 mRNA 発現が抑制されていたことから、食事からのルチン摂取は過多でも、継続的でも PAI-1 mRNA 発現を増加させる可能性を示唆していると考えられる。ルチン摂取により PAI-1 活性を抑制させるためには、継続して摂取した場合を想定し、長期間継続したルチン濃度の維持による脂肪細胞への効果をより詳細に検討する必要がある。

さらに、脂肪細胞に蓄えられている脂肪を分解する酵素 LPL mRNA 発現に対するルチンの効果を検討した (図 4)。200、2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加では、濃度依存的に LPL mRNA 発現の増加傾向が認められ、ルチン添加による経時的で有意な増加は認められなかった。しかし、20,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン曝露では、LPL mRNA 発現量は 200 および 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ルチン添加群に比べ有意に減少した。

LPL は血中遊離脂肪酸の増加をもたらすため、肝機能が正常であり、運動等でのエネルギー消費を高めている場合には、ルチンの積極的な摂取が肥満解消に役立つと考えられる。しかしこの場合でもルチンの血中濃度維持や脂肪細胞への曝露時間を考慮すると、摂取方法の検討により効果を十分発揮できる可能性が示唆された。

以上の結果から、ルチンを含むフィトケミカルは脂肪細胞に生理作用を有していることが明らかになった。フィトケミカルの中の一つであるルチン短時間曝露で PAI-1 活性が僅かで限定的ではあるが抑制される可能性を示し、LPL mRNA 発現の増加により脂肪細胞に蓄えられた脂肪の分解を促進する可能性が示唆された。ソバ等の飲食によるルチンの生理的濃度、生体内分布、脂肪細胞への取り込み等の脂肪細胞周囲のルチン動態に関する詳細な検討データは乏しく、これが解明されるとさらに脂肪細胞に対するルチン効果がより詳細に解明できると考えられる。しかし、経時的な測定から毎回ルチンを食事で補い血中濃度を高く

長時間保つことは、脂肪細胞の脂肪代謝に影響を与え、血液流動性にも僅かながら影響を与えることが示唆された。

日常の食生活にソバを取り入れることが生活習慣病予防に役立つ可能性を示唆しているが、ルチン含有農産物の含有量の育成条件による変動、その調理法を含めた摂取方法、同時に摂取する食品成分間の相互作用および摂取間隔や生物学的利用率を考慮しなくてはならないことから、有効な生理作用を期待するには、ルチン含有食品の摂取量と摂取回数を最適化する献立等のさらなる検討や工夫が必要になると考えられる。

謝辞

本研究は、財団法人福島県学術教育振興財団助成および福島県立病院医学研究助成により行った。関係各位に謝意を表する。

参考文献

- 1). Matsuzawa Y: Adipocytokines and metabolic syndrome. *Semin Vasc Med*, 5: 34-39, 2005.
- 2). Nishimura K, Soda T, Nakazawa S, Yamanaka K, Hirai T, Kishikawa H, Ichikawa Y: Serum adiponectin and leptin levels are useful markers for prostate cancer screening after adjustments for age, obesity-related factors, and prostate volume. *Minerva Urol Nefrol*, 64: 199-208, 2012.
- 3). Majumadar I, Mastrandrea LD: Serum sphingolipids and inflammatory mediators in adolescents at risk for metabolic syndrome. *Endocrin*, 41: 442-449, 2012.
- 4). Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS: Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*, 276: 25651-25653, 2001.
- 5). Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Thatcher S, Charnigo R, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA: Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in mice. *Hypertension*, 60: 1524-1530, 2012.
- 6). Matsuzawa Y: White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19: 637-647, 2005.
- 7). Fain JN, Madan AK: Insulin enhances vascular endothelial growth factor, interleukin-8, and plasminogen activator inhibitor 1 but not interleukin-6 release by human adipocytes. *Met Clin Exp*, 54: 220-226, 2005.
- 8). Sharma AM, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 386-395, 2007.
- 9). Takahashi K, Uwabe Y, Sawasaki Y, Kiguchi T, Nakamura H, Kashiwabara K, Yagyū H, Matsuoka T: Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 275: L47-L54, 1998.
- 10). Takahashi K, Kiguchi T, Sawasaki Y, Karikusa F, Nemoto N, Matsuoka T, Yamamoto M: Lung capillary endothelial cells produce and secrete urokinase-type plasminogen activator. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7: 90-94, 1992.
- 11). Marshall BC, Sageser DS, Rao NV, Emi M, Hoidal JR: Alveolar epithelial cell plasminogen activator. Characterization and regulation. *J Biol Chem*, 265: 8198-8204, 1990.
- 12). Bowen RM, Hoidal JR, Estensen RD: Urokinase-type plasminogen activator in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid from normal and smoke-exposed hamsters and humans. *J Lab Clin Med*, 106: 667-673, 1985.
- 13). Hattori N, Mizuno S, Yoshida Y, Chin K, Mishima M, Sisson TH, Simon RH, Nakamura T, Miyake M: The plasminogen activator system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 164: 1091-1098, 2004.
- 14). Loskutoff DJ, Quigley JP: PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *J Clin Invest*, 106: 1441-1443, 2000.

- 15). Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, Simon RH: Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Pathol*, 163: 445-52, 2003.
- 16). Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H: Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res*, 66: 276-85, 2005.
- 17). Margaglione M, Cappucci G, d'Addetta M, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Msacolo G, Grandone E, Di Minno G: PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis. Relation to environmental and genetic determinants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 562-567, 1998.
- 18). Zechner R, Steiner NE, Breslow JL: The structure of the mouse lipoprotein lipase gene: A B1 repetitive element is inserted into the 3' untranslated region of the mRNA. *Genomics* 11: 62-76, 1991.
- 19). Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RE: Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*, 279: 48968-48975, 2004.
- 20). 厚生労働省: 平成21年国民健康・栄養調査報告; 第4部年次結果: 184-185, 2011.
- 21). Choi, I, Park Y, Choi H, Lee EH: Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet. *BioFactors*, 26: 273-281, 2006.
- 22). Hsu C-L, Yen G-C: Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem*, 55: 1730-1736, 2007.
- 23). Hsu C-L, Yen G-C: Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem*, 55: 8404-8410, 2007.
- 24). Morikawa K, Ikeda C, Nonaka M, Suzuki I: Growth arrest and apoptosis induced by quercetin is not linked to adipogenic conversion of human preadipocytes. *Metab Clin Exp*, 56: 1656-1665, 2007.
- 25). Lin J, Della-Fera MA, Baile CA: Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity Res*, 13: 982-990, 2005.
- 26). Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA: Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutri Biochem*, 19: 717-726, 2008.
- 27). Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C: Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*, 21: 2185-2194, 2007.
- 28). 石井ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 堀江正男, 安井明子, 中里光男: ブルーベリーエキスを含有する健康食品中のアントシアニンの分析. *食衛誌*, 49: 339-346, 2008.
- 29). 紙谷雄志, 岩井和也, 福永泰司, 木村良太郎, 中桐理: 脱カフェインコーヒー豆抽出物の糖質分解酵素阻害活性とクロロゲン酸類の寄与. *日本食品化学工学会誌*, 56: 336-342; 2009.
- 30). Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Geleherter TD: cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest*, 78: 1673-1680, 1986.
- 31). Prendergast GC, Diamond LE, Dahl D, Cole MD: The c-myc-regulated gene *mrl* encodes plasminogen activator inhibitor 1. *Molec Cell Biol*, 10: 1265-1269, 1990.
- 32). Fabry S, Lang J, Niermann T, Vingron M, Hensel R: Nucleotide sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the mesophilic methanogenic archaeobacteria *Methanobacterium bryantii* and *Methanobacterium formicicum*. Comparison with the respective gene structure of the closely related extreme thermophile *Methanothermobacter ferredoxinus*. *Eur J Biochem*, 179: 405-13, 1989.
- 33). Vincent S, Fort P: Nucleotide sequence of hamster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. *Nucleic Acids Res*, 18: 3054, 1990.

- 34). 渡部隆, 遠藤浩志: 会津地域に適したソバ優良系統の選抜. 東北農業研究, 59: 67-68, 2006.
- 35). 寺尾純二: ケルセチン配糖体の吸収代謝と活性発現機構. Vitamins, 79: 3-11, 2005.
- 36). Wu Y, Zhang Q, Ann DK, Akhondzadeh A, Doung HS, Messadi DV, Le AD: Increased vascular endothelial growth factor may account for elevated level of plasminogen activator inhibitor-1 via activating ERK1/2 in keloid fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol, 286: C905-C912, 2004.
- 37). Geiser T: Idiopathic pulmonary fibrosis—a disorder of alveolar wound repair? Swiss Med Wkly 133: 405-411, 2003.
- 38). Chambers RC: Role of coagulation cascade proteases in lung repair and fibrosis. Eur Respir J, 22: 33s-35s, 2003.
- 39). de Gouville A-C, Boullay V, Krysa G, Pilot J, Brusq J-M, Loriolle F, Gauthier J-M, Papworth SA, Laroze A, Gellibert F, Huet S: Inhibition of TGF- β signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. Br J Pharmacol, 145: 166-177, 2005.

要旨

肥満解消に植物性化学物質（フィトケミカル）が有効であることが示唆されている。そこでマウス脂肪細胞へソバ含有のルチンを作用させ、悪玉アディポサイトカインである PAI-1 産生を測定した。ルチン添加で濃度依存的に PAI-1 mRNA 発現量の増加が認められたが、分泌量およびその活性の減少には有意差を認めなかった。一方ルチンによる脂肪分解酵素発現は、用量依存的に増加した。この結果はルチンが貯蔵脂肪分解に有効であると考えられ、4～8時間のルチン曝露による PAI-1 活性は抑制傾向であったことから、ルチン摂取量や摂取間隔を検討し、食生活にソバを積極的に取り入れることは健康増進に意義があると考えられた。

(2014年9月24日受稿)