

メタボリックシンドローム関連炎症に対する焼酎由来成分の抗炎症

効果

神戸 悠輝

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・生体情報薬理学

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 生体情報薬理学

099-275-5256

ukikambe@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp

要旨

「白麹」とは、米粒上に白麹菌を生育させたものを指し、焼酎製造に用いられる。我々はこれまでに、この日本独自の食品素材である白麹に着目して研究を進め、白麹の摂食は高脂肪食誘導性肥満マウスの体重増加の有意な抑制と共に、血糖値や血中脂肪酸濃度の値を正常化出来ることを見出している (Yoshizaki et al., 2014)。近年、生活習慣病の1つである肥満は、慢性炎症性疾患とも捉えられており、脂肪組織炎症を起点として慢性炎症が全身に拡大・波及する病態とも考えられている。それを支持するように炎症が脂肪酸などの自己代謝物によって惹起され、生活習慣病の発症要因ともなること、さらに肥満により体内量が増加するパルミチン酸は、炎症性反応を誘導し、炎症反応の慢性化に伴いインスリン抵抗性が引き起こされることが報告されている。そこで本研究では、抗肥満作用を持つ白麹が肥満に付随する炎症に対して抑制効果を有する可能性があると考え、パルミチン酸誘導性炎症に対する抗炎症効果について検討した。また細菌感染性炎症である LPS 誘導性炎症に対する抗炎症効果も検討し、両炎症モデルに対する効果の差異を比較した。

1. 緒言

肥満は、エネルギーの摂取量が消費量を慢性的に上回り、余剰なエネルギーが脂肪として蓄積することで生じ、様々なメタボリックシンドロームを誘発することが知られている。肥満のはじめのステップとして、インスリン抵抗性が挙げられ、インスリン抵抗性下ではインスリン効果の低下を補うために、インスリンの分泌量が増加することが知られている (高インスリン血症)。長期間高インスリン血症が続くと、膵β細胞が疲弊し、

インスリンを分泌できなくなり、2型糖尿病の発症につながると考えられている（中村、2014）。

この肥満に伴う糖尿病をはじめとしたメタボリックシンドロームは、世界的に深刻な健康問題のひとつである。日本では20歳以上の男性の2人にひとり、女性の6人にひとりがメタボリックシンドローム、またはその予備軍に該当すると見込まれている（厚生労働省統計、2007）。肥満が糖尿病や循環器系疾患などの健康被害をもたらし、それによる医療費の増加は、医療保険制度への圧迫にもつながっている（厚生労働省 国民医療費、2014）。したがって、肥満の予防法、治療法を確立することは、健康面においても経済面においても重要である。

近年肥満が原因となって起こるインスリン抵抗性に、慢性の炎症反応が関与していることが明らかになった^{2),3)}。肥満によって体内量が増加するパルミチン酸やステアリン酸といった遊離飽和脂肪酸が、パターン認識受容体のひとつであるToll様受容体（TLR）4を介してNF-κBを活性化し、IL-6やTNFα、COX2といった炎症性サイトカインの発現を亢進、そしてインスリン抵抗性の誘導に寄与することが報告されている^{2),3)}。以上のことから、肥満やインスリン抵抗性、2型糖尿病の治療として炎症反応を標的にすることが有望であると推察される。さらに肥満症の治療における大きな課題は安全性である。がんや心筋梗塞などの病態と比較して、肥満症は比較的ゆっくりと病態が進行していくため、長期的な治療や投薬が可能であるような、安全性の高い方法が望まれる。人類がこれまで長きに渡って食してきた食品であれば、長期間摂取しても安全性が高いといえる。そこで、肥満やメタボリックシンドロームが予防できるような食品の開発が強く望まれている。

焼酎や麹といった日本の伝統的な発酵食品に血糖値上昇抑制効果や肥満効果といったメタボリックシンドローム予防効果が報告されている^{1),4)}。食事と共に芋焼酎および清酒を摂取すると、血糖値の上昇が抑制され、特に芋焼酎において強い効果が報告されている¹⁾。焼酎と清酒は共に麹を原料とした酒であることから、共通成分である麹由来の成分が血糖値抑制効果に寄与していると考えられる。一方、肥満からインスリン抵抗性を誘導する過程に慢性炎症が関わっていることから、これらの麹の効果は、炎症の抑制を介した作用であると推察される。

そこで本研究では、麹の抗炎症効果を解明することを目的に、培養マクロファージ細胞を用いた肥満に不随する炎症モデルとしてパルミチン酸誘導性炎症に着目し、白麹および麹を用いた発酵食品の効果について検討した。また細菌内毒素（LPS）誘導性炎症に対する効果も検討し、両炎症モデルに対する効果の差異を比較した。

2. 方法

2-1 抽出物の調製

研究室で製造した白麹(種麹；河内菌白麹、河内源一郎商店、鹿児島)を、凍結乾燥後、粉碎しふるい(500 μm)にかけ、それぞれ20 gを300 mL溶三角フラスコに移し、脱塩水22 mL、メタノール52 mL、クロロホルム26 mLを加え、30°Cの水浴中で1時間振盪した。その後1,652 ×gにて10分間遠心分離し、上清をろ紙ろ過し、ろ液を分液ロートに移した。この溶液にクロロホルム26 mL、脱塩水25 mLを加えて混和し、静置して二層に分離させた。下層をナスフラスコに移し、エバポレーターで濃縮し、その後凍結乾燥機により乾固した。得られた抽出物を、50 mg/mLの濃度になるようDMSOに溶解し、細胞曝露実験の試料とした。

2-2 LPS およびパルミチン酸による炎症の誘導

Raw264細胞を 1.5×10^5 cells/cm²の密度で播種し、翌日、希釈した白麹抽出物を100 μL添加した。その後、終濃度100 ng/mLのLPS 100 μLおよび200 μMのパルミチン酸を添加した。LPS曝露開始30分後にタンパク質標品を、6時間後にRNA標品を回収した。パルミチン酸曝露開始6時間後にタンパク質標品を、24時間後にRNA標品を回収した。

2-3 RT-qPCR法

RNAの回収はSepasol(NACALAI TESQUE社、京都)を用い、添付文書に記載の方法で実施した。その後、総RNA量を分光光度計NanoDrop ND-1000(Thermo Fisher社、USA)を用いて測定後、0.5 μg当量のRNAをHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher社、USA)を用いて逆転写し、cDNAを作成した。*IL-6*、*COX2*、*TNFα*、*IL-1β*、*iNOS*の遺伝子発現量は、リアルタイムPCR Thermal Cycler Dice Real Time System TP800(タカラバイオ(株)、京都)を用いて測定した。遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子の*GAPDH*に対する相対値として表した。

2-4 ウエスタンプロット法

RAW264細胞からRIPA buffer(150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、50 mM NaF、10 mM Sodium pyrophosphate、1 mM Sodium orthovanadate、1% NP-40、0.5% Deoxycorrate、0.1% SDS)を用いてタンパク質標品を回収した。タンパク質標品5 μgをSDS-PAGEし、その後、PVDFメンブレンに転写した。転写されたタンパク質は、p38、pp38、NF-κB、pNF-κB、ERK、pERK、β-actinを特異的に認識する一次抗体と、西洋ワサビペルオキシダーゼによって標識されたrabbit IgGとmouse IgGを認識する二次抗体を用いて標識し、las-1000 mini(富士フィルム、東京)にて化学発光強度を測定した。

3. 実験結果および考察

3-1 LPS誘導性炎症に対する抗炎症効果

LPS の最適な曝露時間を検討するために、LPS を 0~6 時間曝露し、RNA をリアルタイム PCR 分析した結果を Fig. 1 (A) に示す。LPS の曝露によって、炎症性メディエーター (*IL-1 β* , *IL-6*, *COX2*, *TNF α* , *iNOS*) の遺伝子発現量は時間依存的に有意に増加し、曝露後 6 時間で最も遺伝子発現量が増加した。

次に LPS の最適な曝露濃度を検討するために、LPS を 0~100 ng/mL の濃度で曝露し、RNA をリアルタイム PCR 分析した結果を Fig. 1 (B) に示す。LPS の曝露によって、炎症性メディエーターの遺伝子発現量は濃度依存的に有意に増加し、100 ng/mL の濃度で最も遺伝子発現量が増加した。以上の結果から、LPS 曝露条件は 100 ng/mL、6 時間に決定した。

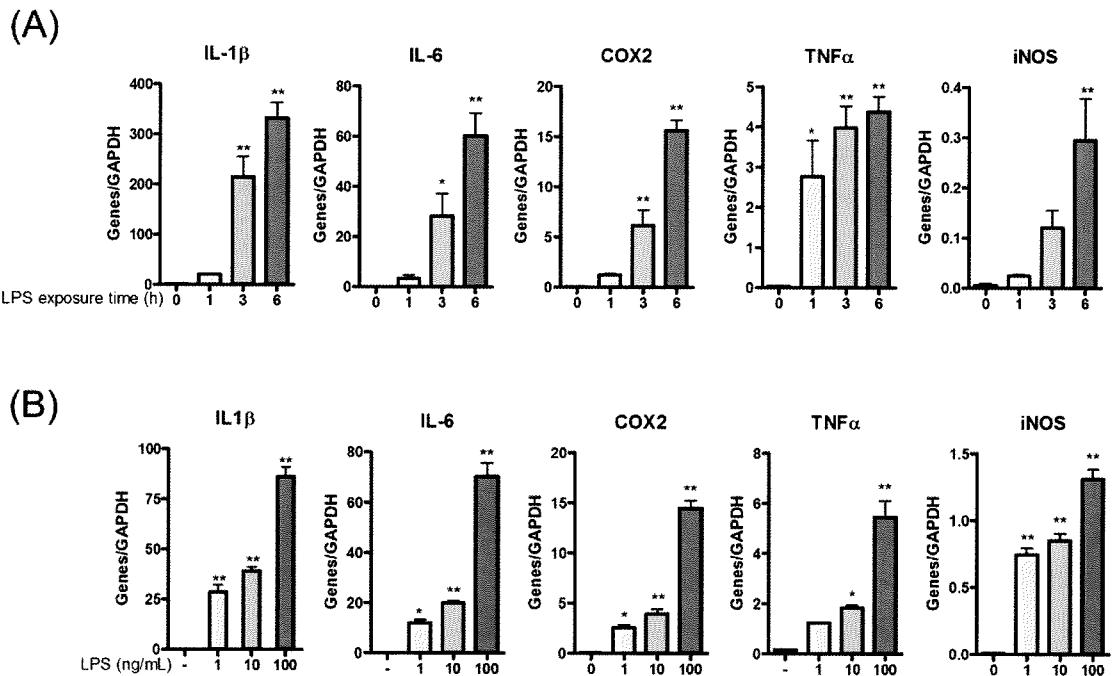


Fig. 1. Pro-inflammatory effect of LPS in Raw264 cells. (A) Raw264 cells were exposed with 100 ng/mL of LPS for indicated times, and mRNA expressions of *IL-1 β* , *IL-6*, *COX2*, *TNF α* , *iNOS* were determined by real-time PCR analysis. (B) Raw264 cells were exposed with indicated concentration of LPS for 6 hours, and mRNA expressions of *IL-1 β* , *IL-6*, *COX2*, *TNF α* , *iNOS* were determined by real-time PCR analysis. (Results are mean±S.E.M. (n = 3), *p<0.05, **p<0.01)

上記の条件で LPS を曝露し誘導した炎症に対する麹に関する各成分の抗炎症効果をリアルタイム PCR 分析した。白麹抽出物は LPS による炎症性メディエーターの遺伝子発現量増加を抑制せず、抗炎症効果は見られなかった (Table. 1)。

	コントロール		LPS		LPS + 白麹	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
IL1 β	0.096	0.0074	165 *	10.5	175 *	13.7
IL-6	0.0053	0.0002	30.1 *	2.20	35.4 *	2.50
COX2	0.076	0.0056	10.9 *	0.20	15.0 *	0.33
TNF α	0.28	0.0012	4.23 *	0.25	4.55 *	0.053
iNOS	0.0236	0.0015	1.60 *	0.035	2.22 *	0.091

Table. 1. Inhibitory effect of white *koji* extract on mRNA expression which is related to inflammation in LPS-stimulated Raw264 cells. The cells were exposed with 100 ng/mL LPS with presence or absence of white *koji* extract., and followed by real-time PCR analysis to determine of mRNA expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *COX2*, *TNF α* , *iNOS*. (n = 3, *p<0.001 vs. コントロール)

3-2 パルミチン酸誘導性炎症に対する抗炎症効果

パルミチン酸の最適な曝露時間を検討するために、パルミチン酸 200 μ M を 3~24 時間曝露し、*IL-1 β* , *IL-6*, *COX2*, *TNF α* , *iNOS* の mRNA 発現をリアルタイム PCR 分析した結果を Fig. 2 (A) に示す。パルミチン酸の曝露によって、*IL-6*, *COX2*, *TNF α* の遺伝子発現量は曝露後 24 時間で有意に増加した。次にパルミチン酸の最適な曝露濃度を検討するために、パルミチン酸を 10~200 μ M の濃度で曝露し、*IL-6* と *COX2* の mRNA 発現をリアルタイム PCR 分析した結果を Fig. 2 (B) に示す。パルミチン酸の曝露によって *IL-6*, *COX2* の遺伝子発現量はパルミチン酸 200 μ M の曝露で有意に増加した。以上の結果から、パルミチン酸の曝露条件を 200 μ M, 24 時間に決定した。

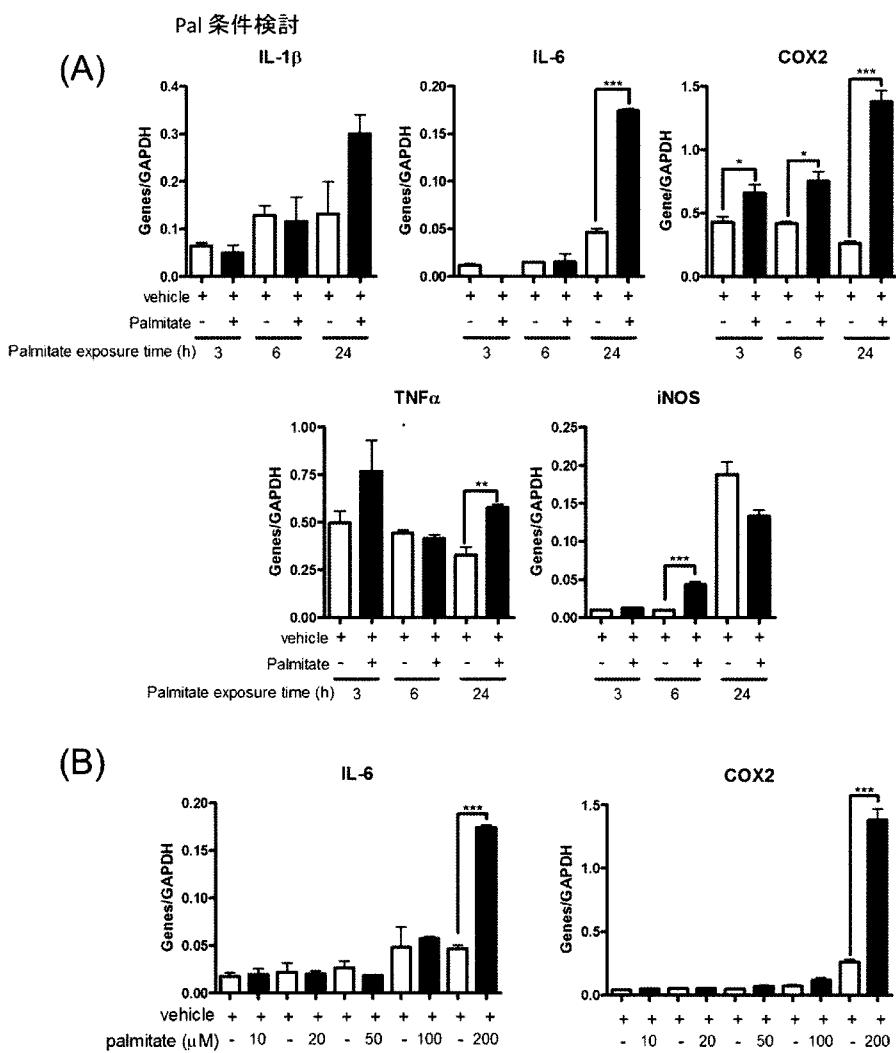


Fig. 2. Pro-inflammatory effect of palmitate in Raw264 cells. (A)The cells were exposed with 200 μ M palmitic acid or vehicle (0.04% ethanol and 18 μ M BSA in PBS), and mRNA expression was quantified 3, 6 or 24 hrs after the exposure. (B)The cells were exposed with indicated concentration of 200 μ M palmitic acid or vehicle (0.04% ethanol and 18 μ M BSA in PBS) for 24 hours, and mRNA expressions of were determined by real-time PCR analysis. (Results are mean \pm S.E.M. ($n = 3\sim 6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

上記の条件でパルミチン酸を曝露し誘導した炎症に対する麹に関連する各成分の抗炎症効果をリアルタイムPCRで分析した。白麹抽出物はパルミチン酸による COX2 および TNF α の遺伝子発現量増加を濃度依存的に有意に抑制し、IL-6 の遺伝子発現量増加も濃度依存的に抑制傾向にあり、抗炎症効果が見られた (Table. 2)。

	コントロール		パルミチン酸		5 ug/mL 白麹		20 ug/mL 白麹		50 ug/mL 白麹	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
IL-6	0.0029	0.0012	0.022 *	0.0077	0.012	0.0023	0.0075	0.0026	0.0042	0.0015
COX2	0.069	0.0044	0.26 *	0.035	0.13 #	0.010	0.083 #	0.010	0.085 #	0.00072
TNF	0.21	0.0073	0.36 *	0.025	0.20 #	0.014	0.16 #	0.021	0.15 #	0.0042

Table. 2. Inhibitory effect of white *koji* extract on mRNA expression which is related to inflammation in palmitate-stimulated Raw264 cells. The cells were exposed with 200 μ M palmitic acid or vehicle (0.04% ethanol and 18 μ M BSA in PBS) with presence or absence of white *koji* extract, and followed by real-time PCR analysis to determine of mRNA expression of *IL-6*, *COX2*, *TNF α* . ($n = 6$, * $p < 0.05$ vs. コントロール, # $p < 0.05$ vs. パルミチン酸)

このように、白麹抽出物はパルミチン酸誘導性炎症に対してのみ抗炎症効果を発揮し、白麹抽出物の抗炎症効果が炎症誘発因子に対して選択的であることが示唆された。

3-3 パルミチン酸誘導性炎症に対する抗炎症効果の作用機序の解明

LPS は Toll 様受容体 (TLR) 4 に結合し、下流のシグナル伝達経路を活性化させ、炎症性メディエーターの遺伝子発現量を増加させることで炎症を誘導する (Fig. 3)。LPS は、炎症のシグナル伝達経路において、炎症性メディエーターの上流にある p38 MAPK、NF- κ B、ERK を活性化し炎症を惹起するという報告があるが、パルミチン酸がどのような経路で炎症を惹起するのかを検討した研究は少ない。そこで、まずは p38 MAPK、NF- κ B、ERK それぞれの、パルミチン酸によるリン酸化体の発現量の変化をウェスタンブロッティング法で測定した結果を Fig. 3 に示す。その結果、リン酸化 p38 MAPK の発現がパルミチン酸曝露によって選択的に増加し、曝露後 3 時間から少なくとも曝露後 24 時間まで持続した。

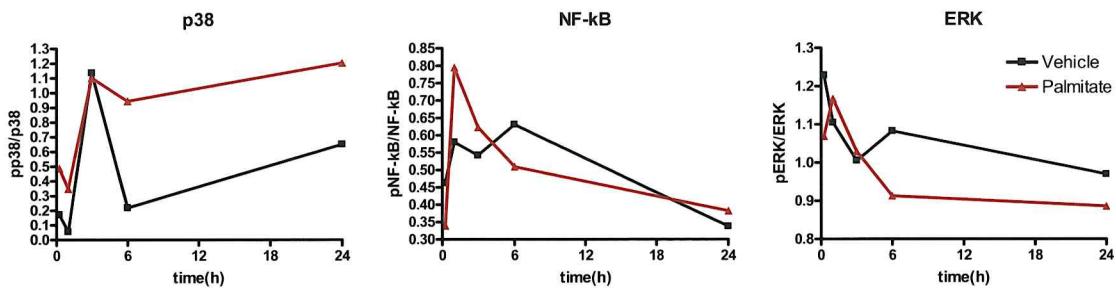


Fig. 3. The effect of palmitate on the phosphorylation of p38, NF-κB and ERK. The cells were exposed with 200 μM palmitic acid or vehicle (0.04% ethanol and 18 μM BSA in PBS), and protein expression was quantified 0.25, 1, 3, 6 or 24 hrs after the exposure.

そこで、パルミチン酸による p38 MAPK のリン酸化に対する白麹抽出物の効果をウエスタンブロッティング法で測定した結果を Table. 3 に示す。白麹抽出物は、パルミチン酸による p38 MAPK のリン酸化を有意に阻害した。それに対して、LPS による p38 MAPK のリン酸化は阻害しなかった。これは LPS による炎症性メディエーターの遺伝子発現量増加は抑制せず、パルミチン酸による炎症性メディエーターの遺伝子発現量増加のみを抑制するという結果と一致する。

	コントロール		LPS or パルミチン酸		50 ug/mL 白麹	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
パルミチン酸	100	8.78	267 *	32.5	213 #	31.1
LPS	100	25.3	1112 *	94.8	1183 *	54.4

Table. 3. Inhibition of p38 MAPK phosphorylation by white *koji* extract. The cells were exposed with 200 μM palmitic acid with presence or absence of white *koji* extract for 6 hrs, the expressional level of phosphorylated p38 was determined by western blotting (n = 9). The cells were exposed with 100 ng/ml LPS with presence or absence of white *koji* extract for 30 min, the expressional level of phosphorylated p38 was determined by western blotting (n = 3). (*p<0.05 vs. コントロール, #p<0.05 vs. パルミチン酸)

以上のことから、白麹抽出物はパルミチン酸誘導性炎症に対して p38 MAPK によるシグナル経路を阻害することで抗炎症効果を持つ可能性が示唆された。肥満によって増加する脂肪酸は、TLR4 を介して TNFα といった炎症性サイトカインの発現が亢進し、そしてインスリン抵抗性の誘導に寄与することが報告されている^{2), 3)}。また白麹は食餌性肥満モデルマウスの血糖値を正常化することから⁴⁾、白麹は炎症の抑制を介してインスリン抵抗性を改善することが推察される。

これらの結果から、パルミチン酸は LPS とは異なる経路で炎症を惹起し、さらに白麹抽出物は直接 p38 MAPK 活性化を阻害するのではなく、パルミチン酸によって活性化するシグナル伝達経路において p38 MAPK より上流に作用することで抗炎症効果を発揮することが推察される。

5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に感謝申し上げます。

6. 引用文献

- 1) M. Kido, A. Asakawa, K. Koyama, T. Takaoka, A. Tajima, S. Takaoka, Y. Yoshizaki, K. Okutsu, K. Takamine, Y. Sameshima, A. Inui : Acute effects of traditional Japanese alcohol beverages on blood glucose and polysomnography levels in healthy subjects, PeerJ, DOI 10.7717/peerj.1853, 2016
- 2) H. Shi, MV. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, JS. Flier : TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance, The Journal of Clinical Investigation Volume 116 Number 11 November, 2006
- 3) MJ. Song, KH. Kim, JM. Yoon, JB. Kim : Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes, Biochemical and Biophysical Research Communications 346:739–745, 2006
- 4) Y. Yoshizaki, C. Kawasaki, KC. Cheng, M. Ushikai, H. Amitani, A. Asakawa, K. Okutsu, Y. Sameshima, K. Takamine, A. Inui : Rice koji reduced body weight gain, fat accumulation, and blood glucose level in high-fat diet-induced obese mice, PeerJ 2:e540; DOI 10.7717/peerj.540, 2014

The inhibitory activity of white *koji* against the palmitic acid-induced inflammation on Raw264 cells

Yuki Kambe

Dept. Pharmacol. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ.

8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken, 890-8544, Japan

099-275-5256

ukikambe@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp

We previously reported that white *koji* (WK) ameliorated insulin resistance in mice which are fed with high-fat diet. This would be suggested that chronic inflammation mediated by palmitic acid might be the cause of the insulin resistance. Hence, in order to clarify the anti-inflammatory action of WK, we investigated the effect of the WK extract on the palmitic acid-induced inflammation in rat macrophage cells, Raw264. WK extract was prepared by Bligh-Dyer method, and dissolved in DMSO. The cells were exposed to palmitic acid with absence or presence of the WK extract, and the gene expressions of pro-inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α , IL-6 or iNOS) were measured by qPCRs. In result, WK extract (5 ~ 50 μ g/mL) dose-dependently inhibited palmitic acid-induced TNF- α , COX-2 or IL-6 expression. Further, the effect of WK extract (50 μ g/mL) on phosphorylation of p38, JNK or NF- κ B induced by palmitic acid was measured by western blotting. Palmitic acid specifically augmented the phosphorylation of p38, which was significantly inhibited by the WK extract. These results indicated that WK inhibits palmitic acid-induced inflammation by the inhibition of p38 MAPK activation, implying the possible application of WK for anti-obese supplement.