レスベラトロールの内臓脂肪蓄積抑制メカニズム

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	矢内,隆章
発行元	日本醸造協会
巻/号	113巻1号
掲載ページ	p. 2-8
発行年月	2018年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

レスベラトロールの内臓脂肪蓄積抑制メカニズム

赤ワイン中に含まれるポリフェノールの１種であるレスベラトロールには，アンチエイジング，抗がん作用などの作用が報告されており，サプリメントとして商品化されているが，肥満にも効果があるとの報告がある。著者らは，肥満の１つである内臓脂肪蓄積におけるレスベラトロールの抑制メカニズムを詳細な遺伝子発現機構解析によって明らかにしたので，解説していただいた。

矢　内　隆　章

1. はじめに

近年，肥満患者は世界中で増加しており，2030年には10億人に到達すると予想されている。肥満は動脈硬化，高血圧，脳血管障害，脂肪肝，糖尿病，癌など様々な疾患の発症と密接に関係しており，肥満に伴う医療費の増加は莫大になる。従って，肥満を改善することは極めて重要な社会的意義を有している。肥満を改善する最も有効な方法のひとつはカロリー制限（CR）である[1]が，赤ワインに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロール（RES）には肥満者におけるCRの効果を模倣して，抗肥満作用を示すことが報告[2]されているが，そのメカニズムに関しては不明な点も多く残されている。

我々は，食餌誘発肥満（diet-induced obese;DIO）ゼブラフィッシュ（ZF）と肥満患者の脂肪組織の比較トランスクリプトーム分析とバイオインフォマティクス解析により，肥満個体の脂肪組織において，RESはCRと一部共通する転写制御ネットワークを介して内臓脂肪の蓄積を抑制する可能性を見出した[3]。

2. RESのDIO ZFにおける作用

ZFは小型の魚類であるが，リポタンパク質による脂肪及びコレステロールの血漿中での輸送及び内臓，皮下，筋肉内含脂肪細胞内へのトリグリセリド（TG）としての貯蔵が人間と類似しているため，脂質関連疾患のための脂質代謝モデルとして使用されている。DIO ZFにRES（40mg/kgBW）を含む餌を5週間摂取後に体長，体重，血糖，血漿総コレステロールとTGを測定[4]した。腹腔内脂肪量はNile Red（東京化成）を含む飼育水中にZFを遊泳させることで腹腔内脂肪組織を染色させた後，蛍光顕微鏡を用いて脂肪を可視化して定量した。その結果，DIO ZFではBMI（体重と体長の関係から肥満度を示す体格指数），血漿TGと腹腔内脂肪量の増加を認めたが，肥満誘導期間のRES摂取により，血漿TGと腹腔内脂肪量の増加が抑制された。本結果はラットやヒトの肥満におけるRESの効果[5,6]と一致していた。本効果に関するRESの機序として，酸化的リン酸化及びミトコンドリア生合成分子をコードする遺伝子の誘導に関連することやNAD^+依存性デアセチラーゼSIRT1の活性化が重要であることが示されている[7]。

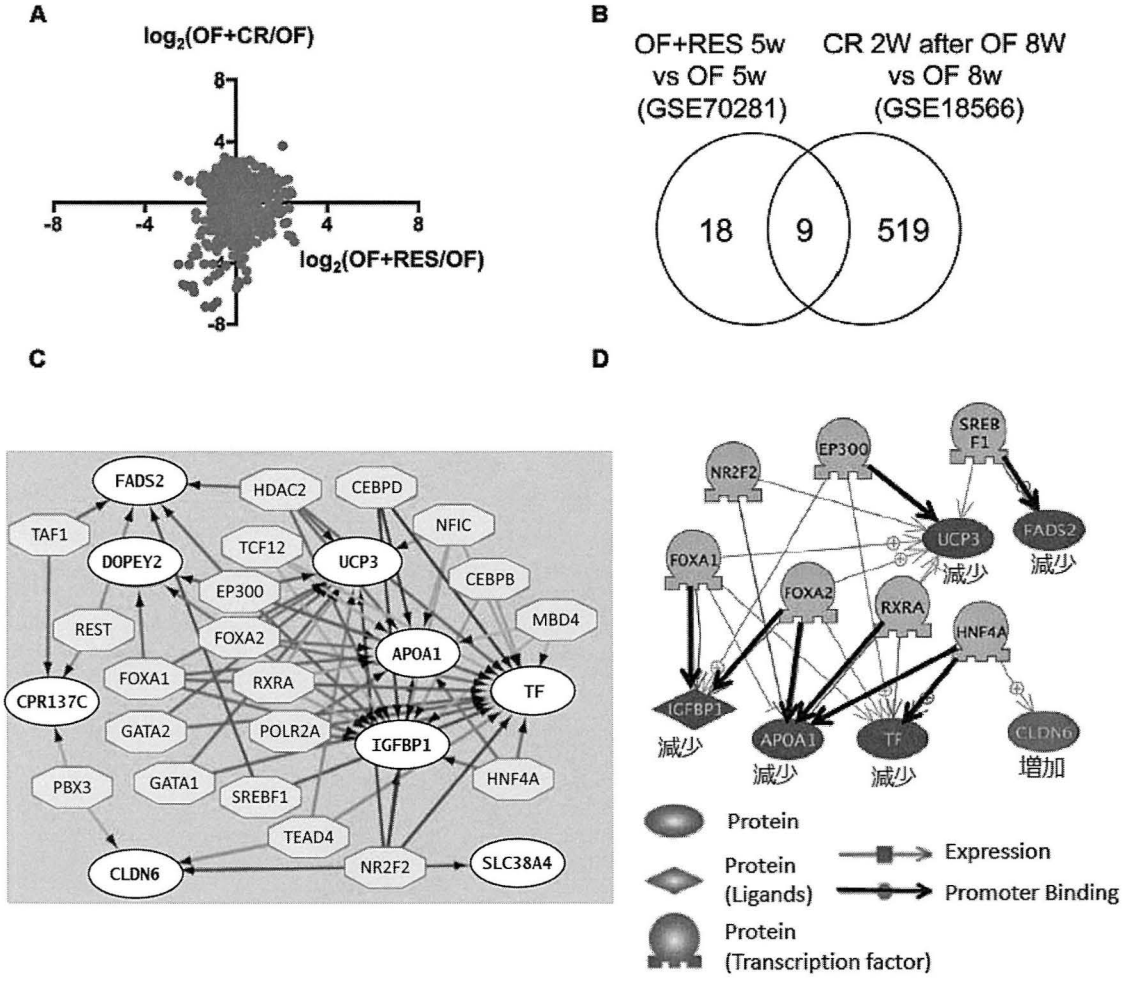
3. RESとCRで共通する遺伝子発現制御機構の解析

DIO ZFにおける血漿TGと腹腔内脂肪量の減少は肥満誘導後のCRでも認められている[4]ことから，RESとCRで共通する遺伝子発現制御機構を解明する目的で，内臓脂肪のトランスクリプトーム解析を行った。バイオインフォマティクス向けの機能を集めたソフトウェアのBioconductor[8]を用いてシグナルの標準化と発現変動遺伝子を抽出し，発現変動遺伝子の制御因子の同定には生物学上のパスウェイや分子間相互

Mechanism for Suppressing Visceral Fat Accumulation of Resveratrol
Takaaki YANAI (*Research Laboratories for Wine Technologies Research & Development Division, Kirin Company, Limited*)

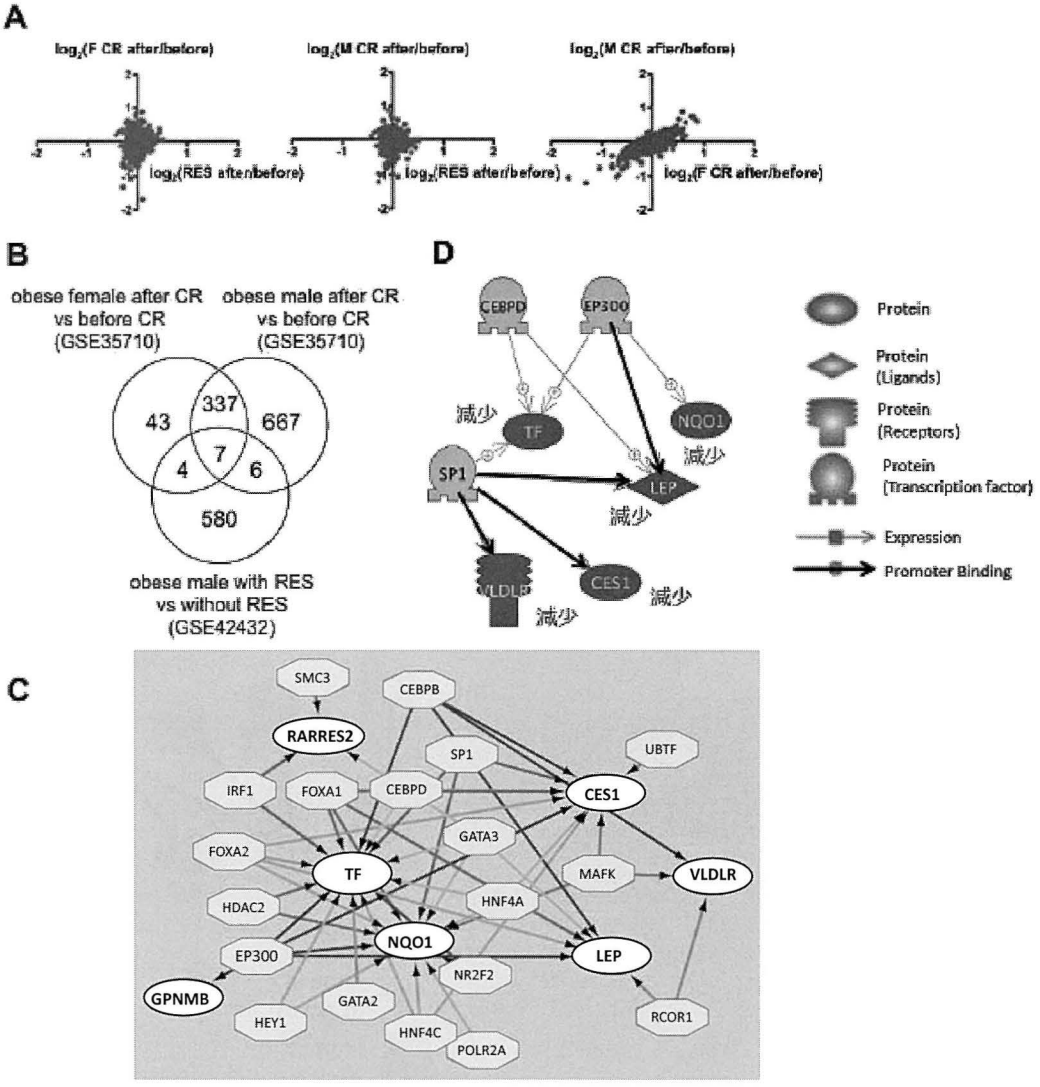
作用ネットワークを可視化&解析できるソフトウェアプラットフォームのCytoscape[9]と遺伝子発現制御・代謝経路・タンパク質間結合などの各種分子間相互作用情報を収集したデータベースとパスウェイ解析機能を搭載したツールのPathway Studio[10]を使用した。Cytoscapeは網羅的なクロマチン免疫沈降法のデータを基盤として制御因子を同定し，Pathway Studioは文献情報を自然言語処理したデータを基盤として制御因子を同定する。さらに，示差的に発現された遺伝子のリストをPathway Studioに供し，$p<5.0 \times 10^{-3}$を閾値としてサブネットワークモジュールへの分類を行い，遺伝子のリストに関連する細胞プロセスを予測した。

RESとCRの作用の共通の機序を同定するために，公共遺伝子発現データベース（NCBI Gene Expression Omnibus）のDIO ZFの腹腔内脂肪細胞におけるCR（GSE18566）とRES（GSE70281）のトランスクリプトームデータを比較した。RESとCRとの間



第1図　DIO ZFの腹腔内脂肪細胞の遺伝子発現に対するRESとCRの効果
(A)RES及びCRによって誘導される遺伝子発現変化の相関
(B)RES及びCRによって発現が変化する遺伝子の同定
(C)(B)で同定された9遺伝子と20の転写制御因子との間のネットワーク
(D)(C)で見い出された7転写制御因子とそれらの標的遺伝子との間のネットワーク
：減少あるいは増加と示した遺伝子は，RESまたはCRによって，それぞれ，発現の減少あるいは増加を示す。

の遺伝子発現の変化の相関は低いが（第1図A），RESとCRで発現が変化した27個と528個の遺伝子の中で共通する9遺伝子が見いだされ（第1図B），Cytoscapeにより，この9遺伝子の発現の調節に関与する転写制御因子として20因子が同定された（第1図C）。さらに，CytoscapeとPathway Studioに共通する7個の転写制御因子とPathway Studioにより同定された標的遺伝子との間のネットワークを第1図Dに示した。DIO ZFの腹腔内脂肪細胞において，RESとCRに共通する遺伝子発現制御機構として，CytoscapeとPathway Studioともに，IGFBP1（インスリン様増殖因子結合タンパク質1），TF（トランス



第2図　ヒト肥満の皮下脂肪組織の遺伝子発現に対するRESとCRの効果
(A)肥満女性(左)，肥満男性(中)と肥満男女間における遺伝子発現変化の相関(右)。
(B)肥満女性及び肥満男性におけるRES及びCRによって発現が変化する遺伝子の同定
(C)(B)で同定された7遺伝子と19の転写制御因子との間のネットワーク
(D)(C)で見い出された3転写制御因子とそれらの標的遺伝子との間のネットワーク
：減少と示した遺伝子は，RESまたはCRによって，それぞれ，発現の減少を示す。

フェリン）とUCP3（ミトコンドリア脱共役タンパク質3）の正の転写制御因子としてFOXA1とFOXA2（フォークヘッドボックスタンパク質A1とA2）を同定した。このように原理の異なる解析により得られた結果に高い重複性が認められることは，これらの方法を用いた転写制御因子予測の妥当性を示唆している。

次に，この分析を適用して肥満患者において，RESとCRで共通する遺伝子発現制御機構を解析した。公共遺伝子発現データベースの肥満男性の皮下脂肪におけるRESの効果を検討したデータ（GSE42432）と肥満女性と肥満男性の皮下脂肪におけるCRの効果を検討したデータ（GSE35710）をそれぞれ解析した。RESとCRとの間の遺伝子発現の変化の相関は低い（第2図A，左と中）が，CRにより発現変化する男女間の遺伝子には高い相関を認めた（$r = 0.87$，$p<1 \times 10^{-4}$，第2図A，右）。肥満患者の皮下脂肪組織の遺伝子発現に対し，RESで発現が変化した597個の遺伝子，肥満女性と肥満男性のCRで発現が変化した391個と1017個の遺伝子の中で共通する7遺伝子が同定された（第2図B）。Cytoscapeにより，この7遺伝子の発現を制御する19の転写制御因子を同定し，これらの転写制御因子と標的遺伝子との間のネットワークを第2図Cに示した。さらに，CytoscapeとPathway Studioに共通する3転写制御因子とPathway Studioにより同定された標的遺伝子との間のネットワークを第2図Dに示した。肥満患者の脂肪組織において，RESとCRで共通する遺伝子発現制御機構として，LEP（レプチン），TFとNQO1（キノンオキシドレダクターゼ）の正の転写制御因子としてEP300（E1A結合タンパク質p300）が同定された。

4. 肥満により異常化する遺伝子発現制御機構の解析

一般的にRESの代謝に与える効果は，肥満患者において認められ，代謝異常を伴わない場合には認められない[11,12]ことから，RESの標的が肥満患者において異常化している因子である可能性を示唆している。そこで，DIO ZFの腹腔内脂肪において，オスとメスで共通して異常化する遺伝子発現制御因子を解析した。オスとメスで共通した発現変化を示す遺伝子を15個同定し，この15遺伝子の発現を制御する因子としてCytoscapeとPathway Studioに共通する4因子を同定した。この4個の転写制御因子と標的遺伝子との間のネットワークから，ZFのオスとメスの肥満により異常化する遺伝子発現制御機構として，SERPINA1（セリンプロテアーゼインヒビターファミリーA1），CP（セルロプラスミン），IGFBP1，FGB（フィブリノーゲンβ）がCEBPB（CCAAT/エンハンサー結合タンパク質β）の標的遺伝子として同定した。

肥満患者の皮下脂肪において，女性と男性で共通して異常化する遺伝子発現制御因子を解析した。公共遺伝子発現データベースの男性の皮下脂肪における肥満と痩せを検討したデータ（GSE29718）と女性の皮下脂肪における肥満と痩せを検討したデータ（GSE44000）をそれぞれ解析すると，男女の肥満で共通する発現変化を示す遺伝子を46個同定し，これらの遺伝子の発現を制御する因子としてCytoscapeとPathway Studioに共通する5因子を同定した。この5個の転写制御因子と標的遺伝子との間のネットワークから，肥満男女の皮下脂肪で異常化する遺伝子制御機構として，NQO1，VEGFA（血管内皮細胞増殖因子A），LEPとCCND2（サイクリンD2）の正の転写制御因子としてEP300を同定した。

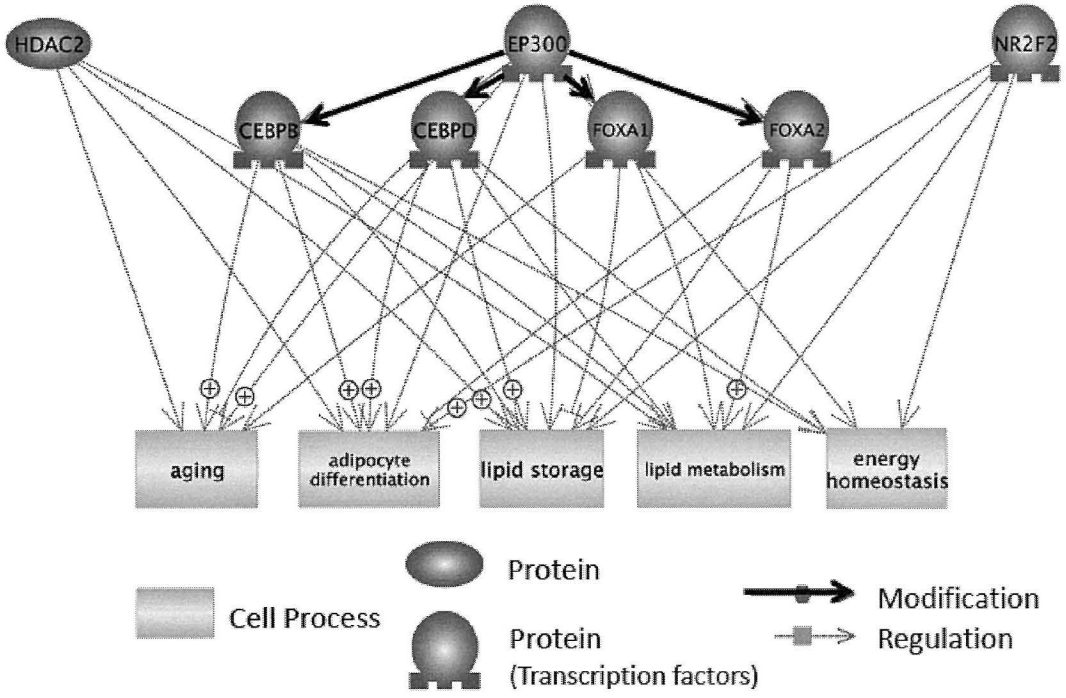
5. 肥満におけるRES及びCRの標的となる転写制御因子の同定

肥満におけるRESとCRの共通機構に関与する転写制御因子を明らかにするために，Cytoscapeにより同定された転写制御因子の階層的クラスタリングを行った[13]。階層的クラスター分析は，個体間の類似度あるいは非類似度（距離）に基づいて，最も似ている個体から順次に集めてクラスターを作っていく方法であり，ここでは転写制御因子の発現プロファイル間の類似性を階層的な形で明らかにする。その結果，転写制御因子は7つのクラスターに分類され，クラスター7のHDAC2（ヒストンデアセチラーゼ2），CEBPBとEP300は，肥満において調節不全な遺伝子の転写制御因子であり，DIO ZF及び肥満患者の両方において，RESとCRによって正常化された制御因子であることが明らかになった。EP300とCEBPBは肥満によりその活性が上昇し，RESとCRによりその活性上昇が正常化する一方で，HDAC2は肥満において活性が低下し，RESとCRによりその活性が上昇する可能性が示唆された。クラスター5のNR2F2（核内受容体NR4A2），POLR2A（DNA依存性RNAポリメラーゼⅡサブユニットRPB1），CEBPD（CCAAT/

エンハンサー結合タンパク質δ）及びクラスター6のFOXA1とFOXA2は，DIO ZFで調節不全な遺伝子の転写制御因子であり，DIO ZFと肥満ヒトの両方でRESとCRによって正常化する制御因子であった。遺伝子オントロジー解析より，クラスター5，6，7に含まれる7個の制御因子は脂肪細胞の分化，老化，エネルギー恒常性，脂質代謝と脂質蓄積という細胞プロセスの遺伝子に富んでいることが明らかになり，これらの制御因子と細胞プロセスとの間のネットワークを第3図に示した。さらに，EP300とCytoscapeにより同定された標的遺伝子との間のネットワークにおいて，EP300はTF，IGFBP1，NQO1及びLEP遺伝子の発現を増加させるが，これらの遺伝子の発現は，肥満で増加し，ZF及びヒトの脂肪組織においてRESとCRによって正常化されることが認められた。これらの結果は，EP300が肥満において活性化され，RESとCRの両方が脂肪組織におけるEP300の活性を抑制し得ることを示唆している。そこで，脂肪細胞に対するEP300の効果を検討したところ，アセチル補酵素A（AcCoA）に競合的に拮抗するEP300阻害剤C646（ChemBride#5838646）[14]及びRESによって，幼魚ZFの脂肪分泌が減少したことから，EP300の阻害がRESの主要な脂肪減少の機序である可能性を示唆している。

6. 考察

本研究では，EP300の阻害が肥満個体の脂肪組織におけるRESとCRとに共通する内臓脂肪蓄積抑制のメカニズムの一つであることを示した。EP300はヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性によりクロマチン構造を緩和することやリシルアセチルトランスフェラーゼ活性を介して，CEBPB，CEBPD，



第3図　RESとCRによる肥満に関与する転写制御因子の同定
クラスター5，6，7における転写制御因子と細胞プロセスとの間のネットワーク
：肥満で調節不全となるが，RESやCRにより正常化される，遺伝子や転写制御因子が関与する細胞機能（脂肪細胞の分化，老化，エネルギー恒常性，脂質代謝と脂質蓄積）を示す。EP300は，アセチル化によってCEBPB/D，FOXA1/A2を活性化する。このことより，EP300が，肥満個体の脂肪組織におけるRESおよびCRの一般的な治療メカニズムに関与する重要な転写調節因子である可能性が示唆されている。

FOXA1, FOXA2を含む[15,16,17,18]様々なタンパク質の機能を調節する多様な機能を有する転写コアクチベーター[19]である。脂質恒常性のマスターレギュレーターのコレステロールから合成される胆汁酸をリガンドとする核内受容体のFarnesoid X receptor (FXR)をEP300はアセチル化することが報告されているが[20]，肥満においてFXRのアセチル化は構成的に活性化されていることが知られている[21]。さらに，EP300は脂肪酸やTG合成酵素をコードする遺伝子の転写を活性化する[22]ことやマウスのEP300の機能を破壊すると，白色脂肪組織と血漿TGの減少[23]が報告されている。これらの知見は，EP300が肥満において活性化され，EP300の阻害が肥満における潜在的な内臓脂肪蓄積抑制の機序であることを強く示唆している。

RESはSIRT1の活性化を介してEP300を阻害する[24]が，SIRT1が活性化されるとEP300上のリシン残基の脱アセチル化が促進され，EP300のアセチルトランスフェラーゼ活性が阻害される[25]。一方，CRもSIRT1を活性化[2]するが，CRにはSIRT3を介した細胞内AcCoAの減少[26]や細胞内AcCoAの枯渇によるEP300活性の阻害[27]が報告されていることから，EP300が脂肪組織において，RESとCRによってSIRT1に依存または独立して阻害される可能性があることを示唆している。

また，転写制御因子CEBPBとHDAC2がRESとCRの内臓脂肪蓄積抑制の標的となる可能性も示した。

EP300は標的遺伝子のプロモーターでCEBPBと相互作用[28]し，HDAC2とEP300はそれらの標的遺伝子のプロモーターとの結合において競合する[29]するが，本研究により，TF，IGFBP1とNQO1のプロモーターにおけるEP300，CEBPBとHDAC2の結合領域は肥満において増加し，CRとRESにより正常化することが明らかとなっている。

7. おわりに

EP300の阻害は，ZFからヒトに共通する肥満における内臓脂肪蓄積抑制のメカニズムであり得ることを示した。EP300を阻害する化合物はCR模倣物として機能して，肥満を未然に防ぎ，進行を抑制する可能性があるため，苦痛なくCRと同様の効果を期待できるCR模倣食品の開発は，産業的に非常に大きなインパクトを有していると考えられる。

謝辞

本研究の遂行に御協力頂きました三重大学大学院医学系研究科田中利男教授ならびに西村有平博士に深謝申し上げます。また，多くの共同研究者の方々にもこの場を借りまして心より感謝申し上げます。

〈キリン株式会社 R&D本部 ワイン技術研究所〉

参考文献

1) Harvey-Berino J. (1999). *Ann Behav Med.* **21** 35-39.
2) Guarente L. (2013). *Genes Dev.* **27** 2072–2085.
3) Nishimura Y., Sasagawa S., Ariyoshi M., Ichikawa S., Shimada Y., Kawaguchi K., Kawase R., Yamamoto R., Uehara T., Yanai T., Takata R., and Tanaka T. (2015). *Front. Pharmacol.* **6** 199.
4) Oka T., Nishimura Y., Zang L., Hirano M., Shimada Y., Wang Z., Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, and Tanaka T. (2010). *BMC Physiol.* **10** 21.
5) Rocha K. K., Souza G. A., Ebaid G. X., Seiva F. R., Cataneo A. C.,and Novelli E. L. (2009). *Food Chem. Toxicol.* **47** 1362–1367.
6) Timmers S., Konings E., Bilet L., Houtkooper R. H., Van De Weijer T., Goossens G. H., Hoeks J, van der Krieken S., Ryu D., Kersten S., Moonen-Kornips E., Hesselink M K., Kunz I., Schrauwen-Hinderling V B., Blaak E E., Auwerx J., and Schrauwen P. (2011). *Cell Metab.* **14** 612–622.
7) De Ligt M., Timmers S., and Schrauwen P. (2015). *Biochim. Biophys. Acta* **1852** 1137-1144.
8) Gentleman R. C., Carey V. J., Bates D. M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J Y., and Zhang J. (2004). *Genome Biol* **5** R80.
9) Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., and Ideker T. (2003). *Genome Res.* **13**

2498–2504.
10) Nikitin A., Egorov S., Daraselia N., and Mazo I. (2003). *Bioinformatics* **19** 2155-2157.
11) Yoshino J., Conte C., Fontana L., Mittendorfer B., Imai S., Schechtman K B., Gu C., Kunz I., Rossi Fanelli F., Patterson B W., and Klein S. (2012). *Cell metabolism* **16** 658-664.
12) Barger J L. (2013). *Ann N Y Acad Sci* **1290** 122-129.
13) Howe E. A., Sinha R., Schlauch D., and Quackenbush J. (2011). *Bioinformatics* **27** 3209–3210.
14) Bowers E. M., Yan G., Mukherjee C., Orry A., Wang L., Holbert M. A., Crump N. T., Hazzalin C. A., Liszczak G., Yuan H., Larocca C., Saldanha S. A., Abagyan R., Sun Y., Meyers D. J., Marmorstein R., Mahadevan L. C., Alani R. M.,and Cole P. A. (2010). *Chem. Biol.* **17** 471–482.
15) Wang J. M., Ko C. Y., Chen L. C., Wang W. L., Chang W. C. (2006). *Nucleic Acids Res.* **34** 217–231.
16) Wang R. H., Xu X., Kim H. S., Xiao Z., and Deng C. X. (2013). *Int. J. Biol. Sci.* **9** 934–946.
17) Cesena T. I., Cardinaux J. R., Kwok R., and Schwartz J. (2007). *J. Biol. Chem.* **282** 956–967.
18) Kohler S. and Cirillo L. A. (2010). *J. Biol. Chem.* **285** 464–472.
19) Wang F., Marshall C. B., and Ikura M. (2013). *Cell. Mol. Life Sci.* **70** 3989–4008.
20) Modica S., Gadaleta R. M., and Moschetta A. (2010). *Nucl. Recept. Signal.* **8** e005.
21) Kemper J. K., Xiao Z., Ponugoti B., Miao J., Fang S., Kanamaluru D., Tsang S., Wu S. Y., Chiang C. M., and Veenstra T. D. (2009). *Cell Metab.* **10** 392–404.
22) Bricambert J., Miranda J., Benhamed F., Girard J., Postic C., and Dentin R. (2010). *J. Clin. Invest.* **120** 4316–4331.
23) Bedford D. C., Kasper L. H., Wang R., Chang Y., Green D. R., and Brindle P. K. (2011). *Cell Metab.* **14** 219–230.
24) Shakibaei M., Buhrmann C., and Mobasheri A. (2011). *J. Biol. Chem.* **286** 11492–11505.
25) Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, Isono M, Uzu T, Guarente L,Kashiwagi A, Koya D. (2007). *J Biol Chem.* **282** 151–159.
26) Hebert A. S., Dittenhafer-Reed K. E., Yu W., Bailey D. J., Selen E. S., Boersma M. D., Carson J. J., Tonelli M., Balloon A. J., Higbee A. J., Westphall M. S., Pagliarini D. J., Prolla T. A., Assadi-Porter F., Roy S., Denu J. M., and Coon J. J. (2013). *Mol. Cell* **49** 186–199.
27) Marino G., Pietrocola F., Eisenberg T., Kong Y., Malik S. A., Andryushkova A., Schroeder S., Pendl T., Harger A., Niso-Santano M., Zamzami N., Scoazec M., Durand S., Enot D. P., Fernández Á. F., Martins I., Kepp O., Senovilla L. , Bauvy C., Morselli E., Vacchelli E., Bennetzen M., Magnes C., Sinner F., Pieber T., López-Otín C., Maiuri M. C., Codogno P., Andersen J. S., Hill J. A., Madeo F., and Kroemer G. (2014). *Mol. Cell* **53** 710–725.
28) Rastogi R., Jiang Z., Ahmad N., Rosati R., Liu Y., Beuret L., Monks R., Charron J., Birnbaum M. J., and Samavati L. (2013). *J. Biol. Chem.* **288** 33966–33977.
29) Meng F., Han M., Zheng B., Wang C., Zhang R., Zhang X. H., and Wen J. K. (2009). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387** 13-18.