



椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)が肥満および脂肪細胞に与える影響

Effect of a water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on obesity and adipocyte.

○菊池 生実¹, 神内 伸也¹, 岩田 直洋¹, 久保田 真², 飯塚 大², 日比野 康英¹
¹城西大・薬, ²野田食菌工業(株)

目的

肥満は、運動不足や不規則な生活習慣などが原因となり、脂肪細胞への中性脂肪の蓄積が過剰になり、肥大した脂肪細胞が増加した状態である。脂肪細胞の分化は、およそ3段階のステージを経て行われる。初期ではC/EBPβやC/EBPδ、中期ではC/EBPαやPPARγなどの転写因子が発現する。後期では、それらの転写因子によって脂肪酸合成酵素であるFAS、脂肪酸や中性脂肪合成に関わる遺伝子の転写を促進するSREBP-1が脂肪蓄積を促進し、脂肪滴を生成し成熟する。成熟した脂肪細胞は、エネルギーをさらにトリグリセリドとして蓄えることで肥大脂肪細胞になる。肥大脂肪細胞は、酸化ストレスを惹起しTNF-αやレジスチンの分泌を促進させることでインスリン抵抗性の一因となっている。

椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)は、椎茸菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと粉砕し、熱水抽出、噴霧乾燥したもので健康食品として用いられる。LEMは、健康食品として用いられ、これまでに血圧上昇抑制や抗酸化などの生理作用が報告されており生活習慣病の予防効果が期待されている。

本研究では、3T3-L1細胞および、肥満・高血糖を呈するKKAYマウスを用いて、LEMが肥満および脂肪細胞に与える影響について検討した。

方法

【試料】

椎茸菌糸体培養培地抽出物は、野田食菌工業(株)において製造された「LEM」を使用した。LEMは、椎茸菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと粉砕し、熱水抽出、噴霧乾燥したものである。

【評価・解析方法】

<in vitro>

脂滴の評価

脂肪細胞へ分化した3T3-L1細胞を10%ホルマリン溶液に浸け、室温で10分間静置し固定した。その後、60%イソプロパノールを1分間浸透させ、オイルレッドO染色液で10分間染色した。染色後、オールインワン蛍光顕微鏡を用いて撮影および解析を行い、以下の式から脂肪滴割合を算出した。脂肪滴割合(%) = 染色された面積 ÷ 細胞面積 × 100

また、染色した細胞から染色液を60%イソプロパノールにて抽出し、分光光度計にて吸光度を450nmで測定し、脂肪蓄積量とした。

<in vivo>

体重の測定

体重を週に1回測定した。

摂食量の測定

24時間の摂食量を週に1回測定し、それらより総摂食量を算出した。

総摂取エネルギー量

摂食量と飼料のエネルギー量から総摂取エネルギー量を算出した。

血糖値の測定

マウスを3時間絶食させた後、尾静脈から採血し、ニプロフリースタイルフリーダムライトを用いて、週に1回測定した。

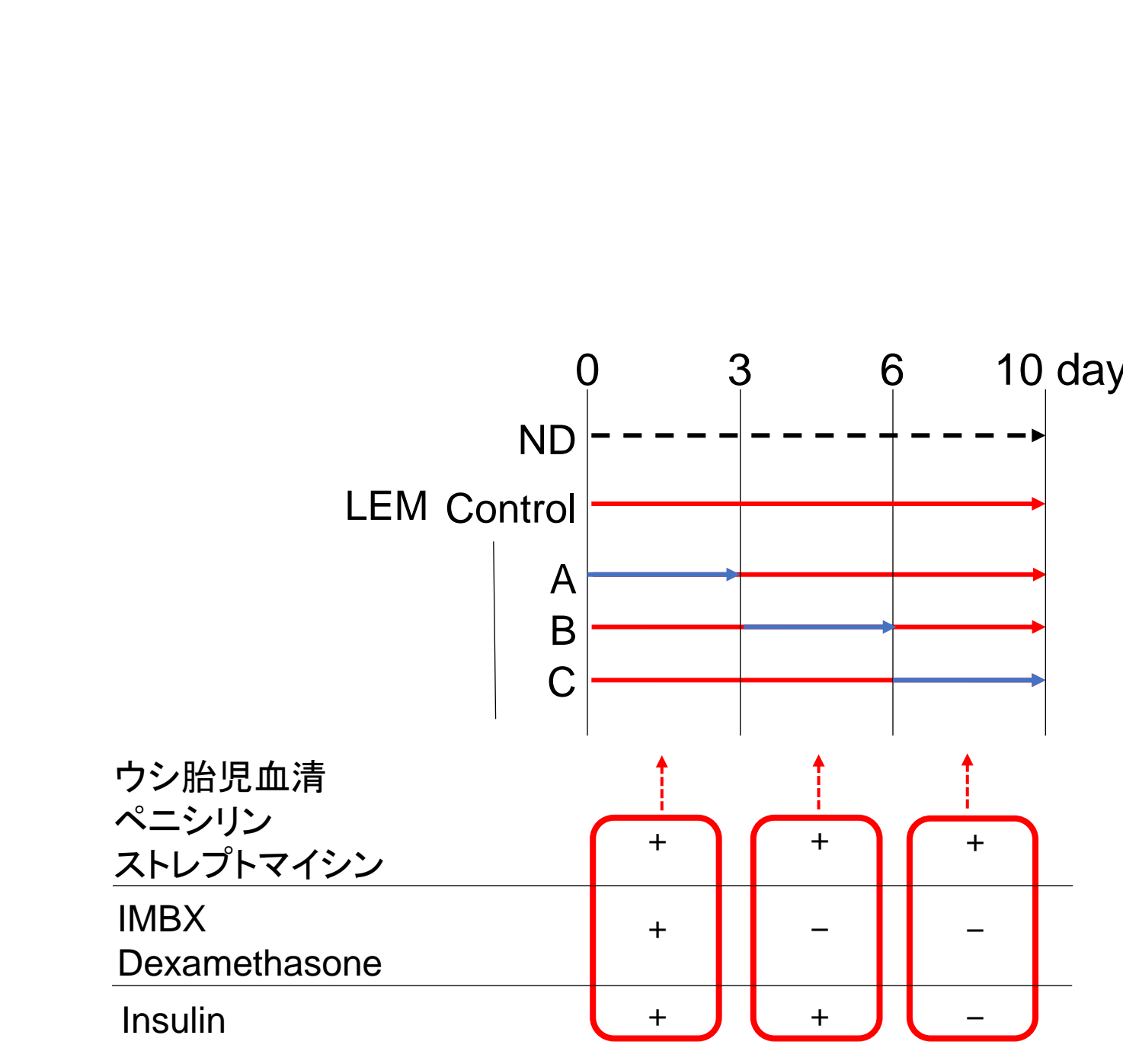
血中トリグリセリド濃度の測定

マウスの血漿を用いてELISA法により血中トリグリセリド濃度を測定した。

脂質代謝関連遺伝子発現量の解析

マウスの脂肪組織からtotal RNAを抽出し、逆転写したcDNAを用いてC/EBPα、PPARγ、FAS、SREBP-1のmRNA発現量をRT-PCRにて測定した。

結果(in vitro)



3T3-L1細胞を6 well plate に 3×10^4 cells/well播種し、2日間培養した後を0日目として分化誘導を開始した。0-3、3-6、6-10日の期間をそれぞれA,B,Cとしてその期間にのみ500 μg/ml のLEMを添加して培養した。ND群は、分化誘導試薬(IMBX, Dexamethasone)および維持試薬(Insulin)を添加しない群とした。

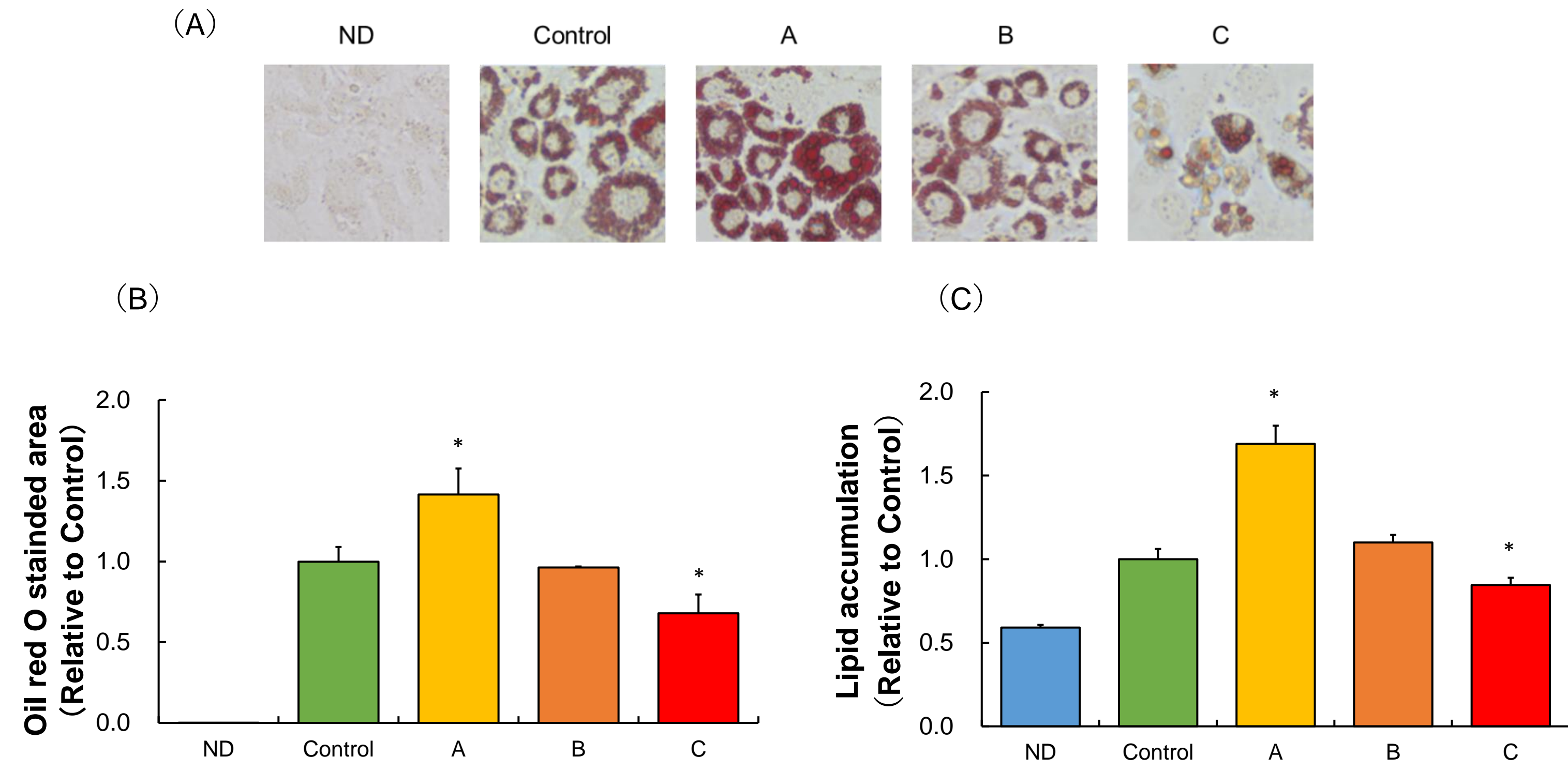
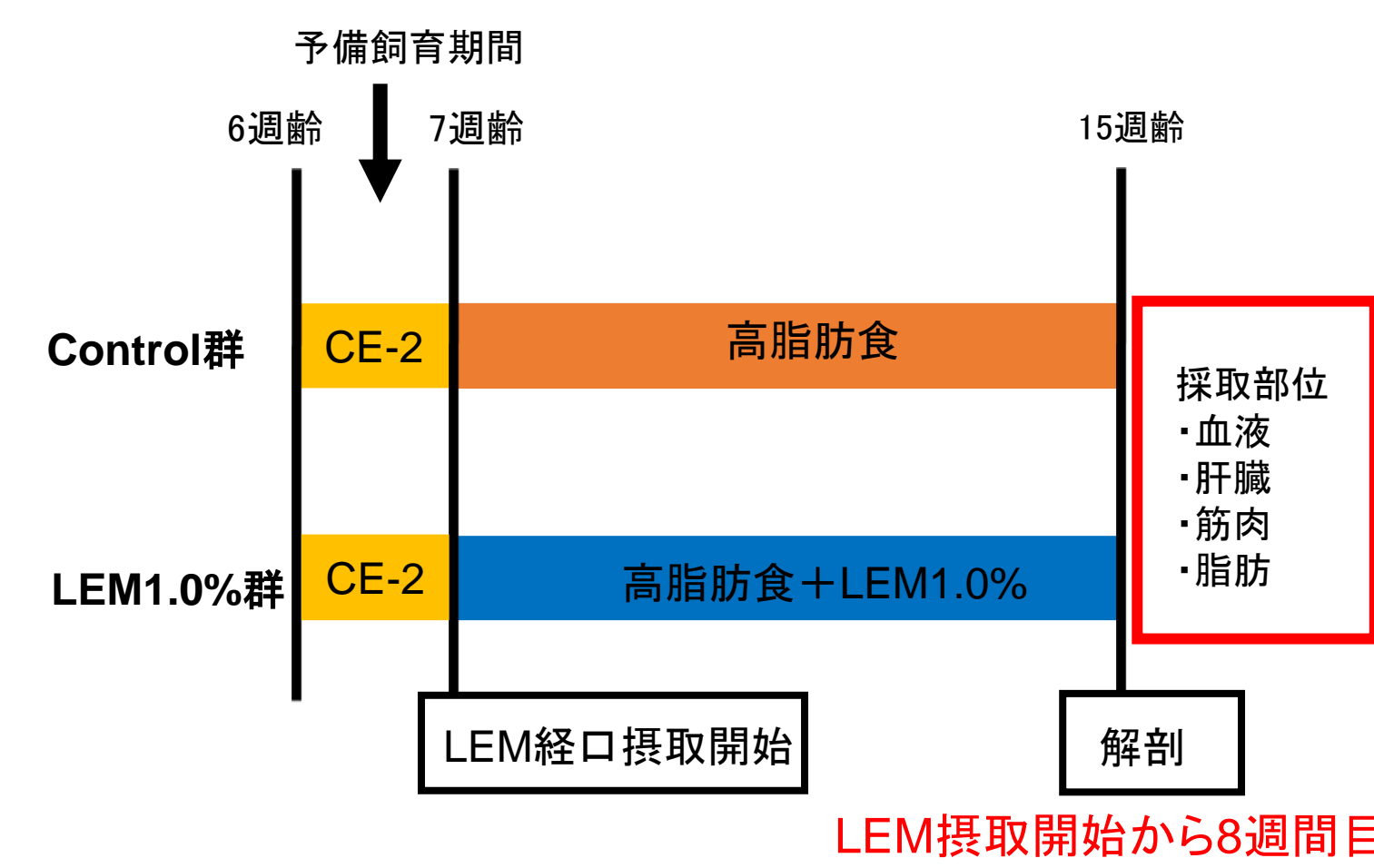


Fig. 1 LEM添加による脂肪蓄積量の変化

LEMを各期間添加し、分化させた3T3-L1細胞の中性脂肪をオイルレッドO染色法により解析した。(A)染色像、(B)脂肪滴割合、(C)脂肪蓄積量を示す。脂肪滴割合および脂肪蓄積量は、A群(添加0~3日)では、Control群と比較して有意に増加した。一方で、C群(添加6~10日)では、Control群と比較して有意に減少した。* P < 0.05 vs. Control

結果(in vivo)

実験概要(2)



KKAYマウス(6週齢、♀)を1週間予備飼育した後、Control群は高脂肪飼料(Quick Fat)、LEM群にはLEMを1%を含む高脂肪飼料を自由摂取させ8週間飼育した。8週間飼育した後解剖を行い、血漿および肝臓、筋肉、白色脂肪組織を採取した。

体重の推移

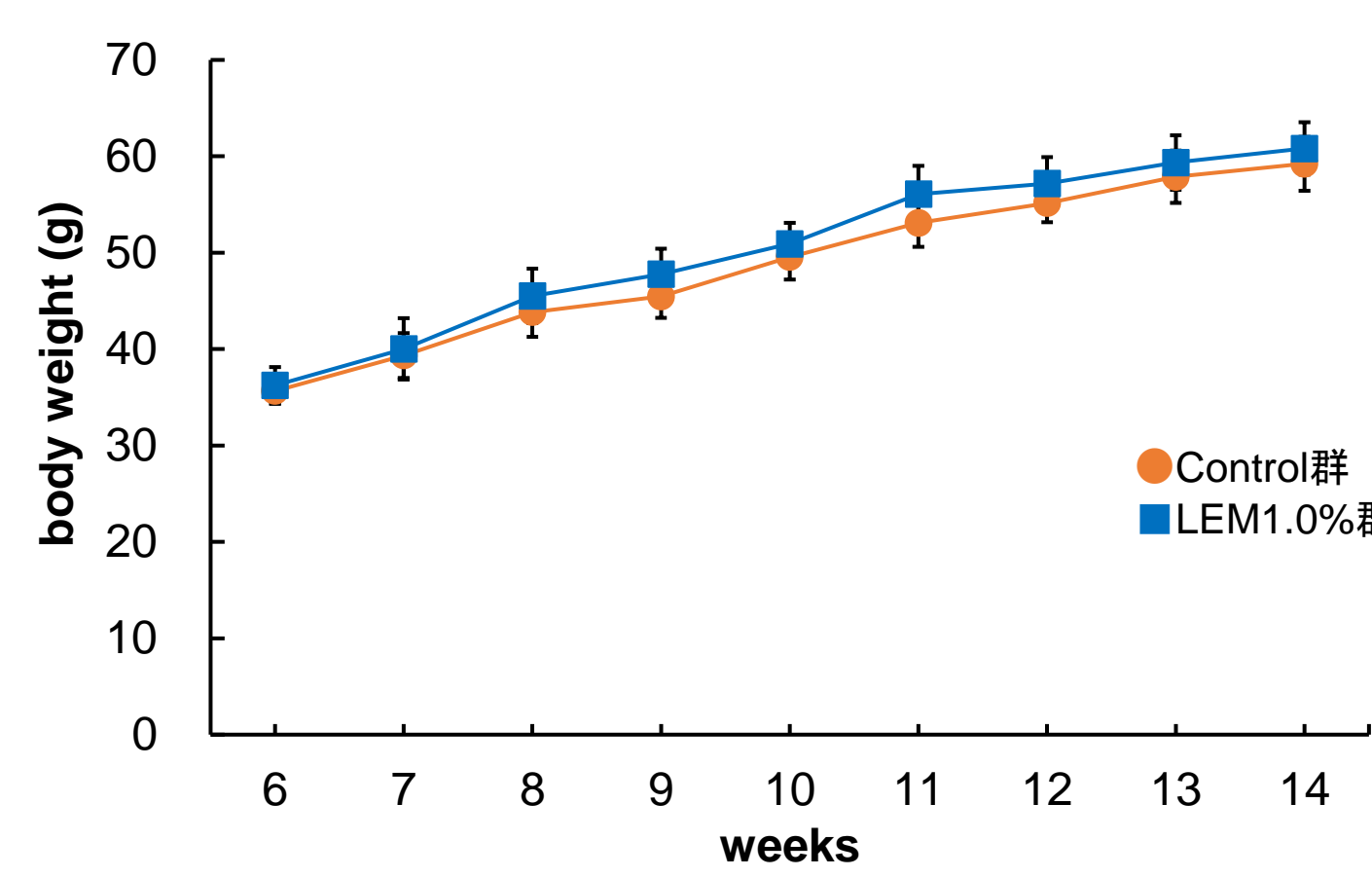


Fig. 2 体重の推移

高脂肪飼料またはLEM1.0%含む高脂肪飼料を摂取させたマウスの体重を測定し、体重の変化を観察した。その結果、2群間で差は認められなかった。

総摂食量

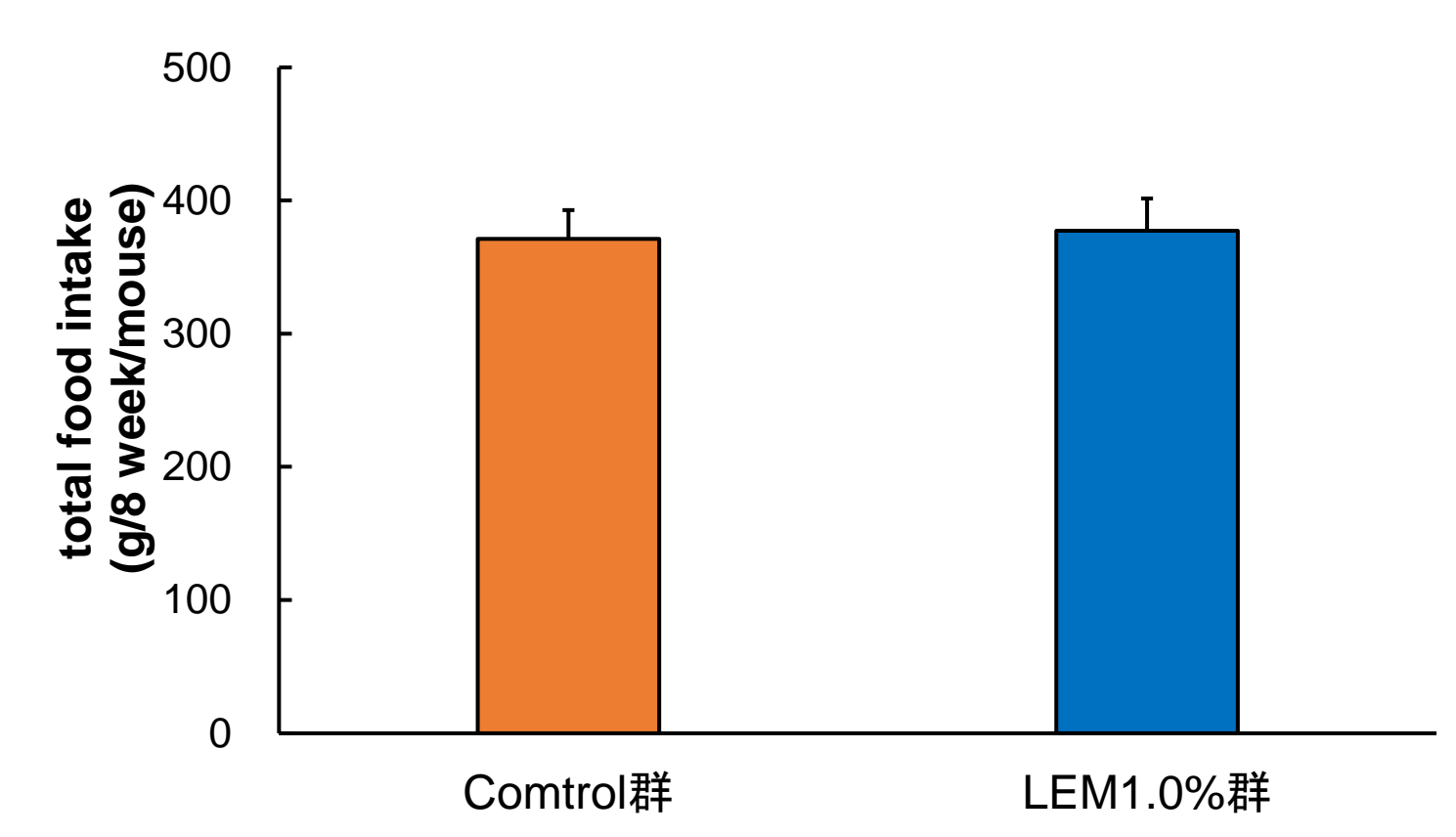


Fig. 3 摂食量の測定

高脂肪飼料またはLEM1.0%含む高脂肪飼料を摂取させたマウスの総摂食量を算出した。その結果、2群間で差は認められなかった。

総摂取エネルギー量

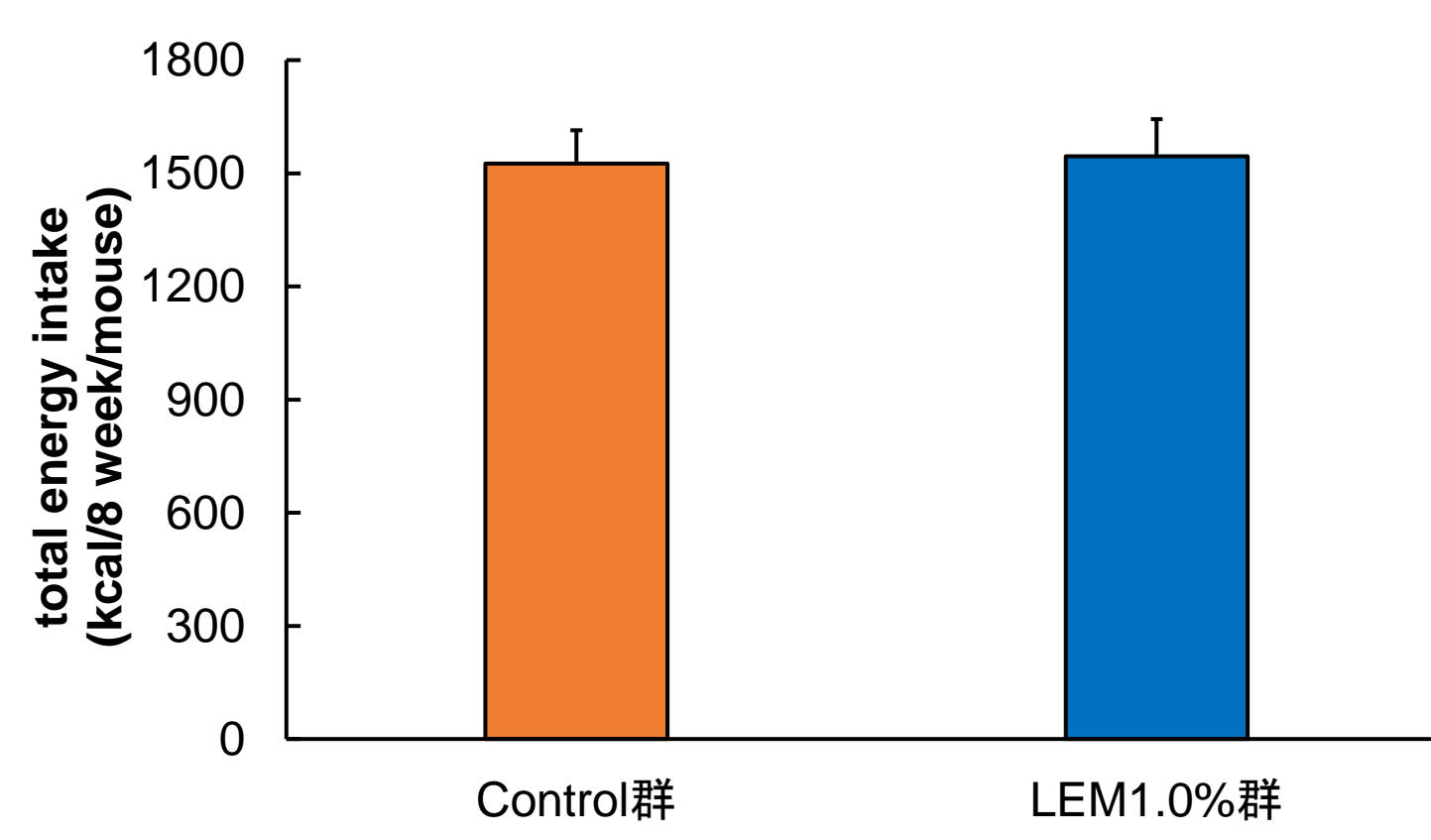


Fig. 4 エネルギー量の測定

高脂肪飼料またはLEM1.0%含む高脂肪飼料を摂取させたマウスの摂食量から総摂取エネルギー量を算出した。その結果、2群間で差は認められなかった。

血糖値

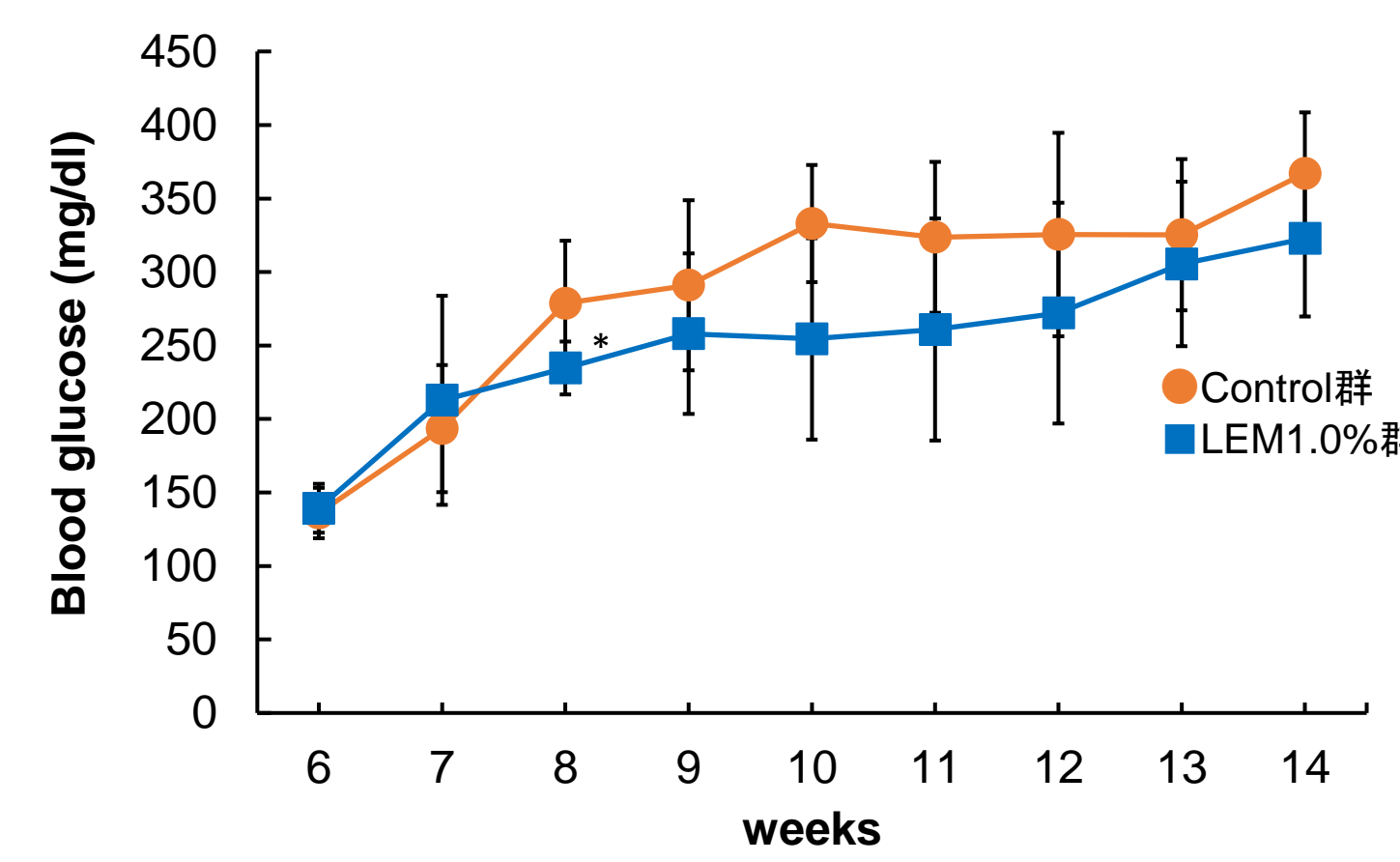


Fig. 5 血糖値の推移

飼育期間中に経時的な血糖値を観察した。その結果、Control群、LEM群ともに飼育期間の経過に伴い血糖値が上昇したが、LEM群はControl群と比較してその上昇は緩やかであり、8週目で有意に血糖値の上昇を抑制した。その他の週では、有意な差は認められなかったが低下傾向を示した。* P < 0.05 vs. Control

血中トリグリセリド濃度

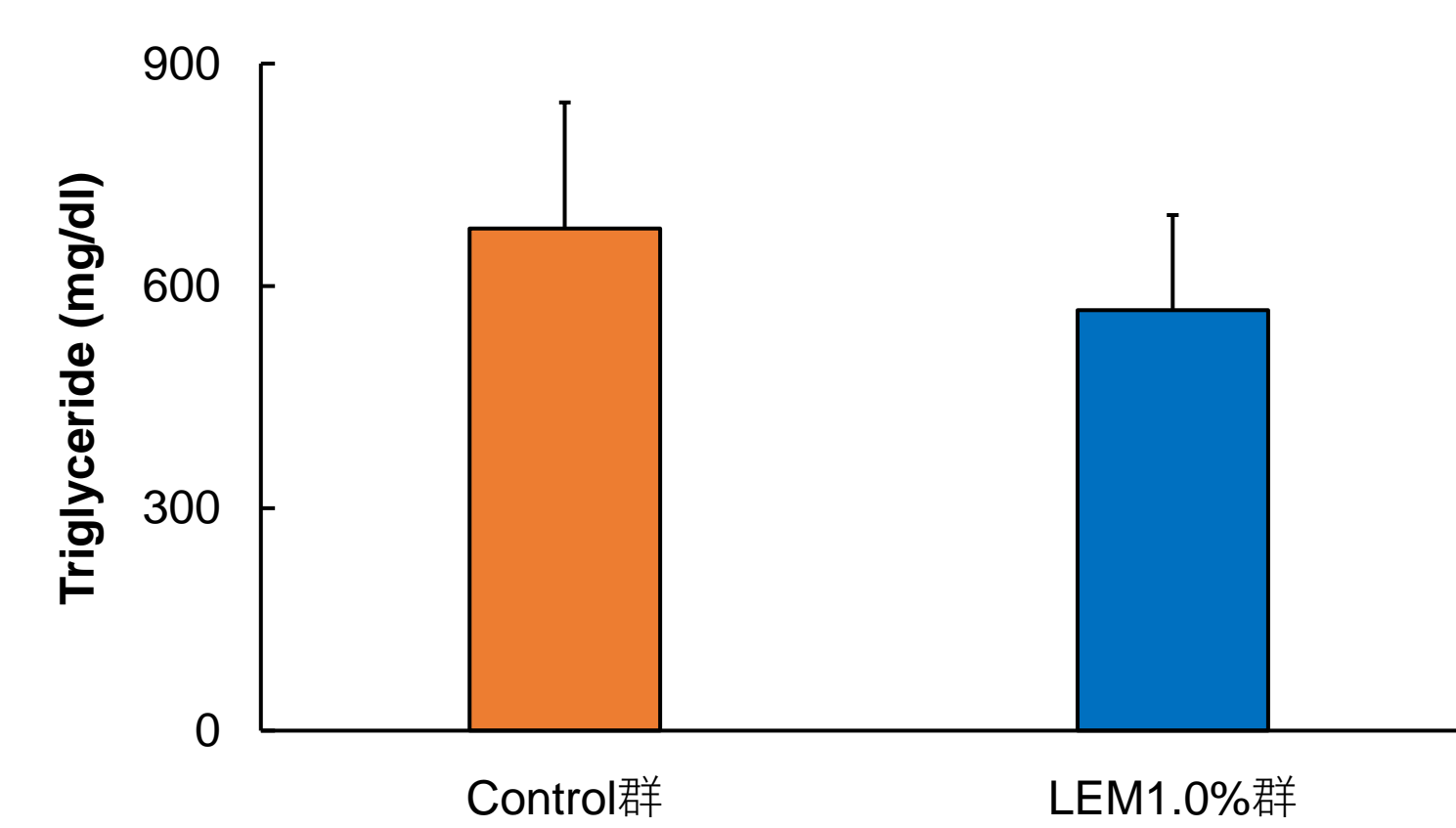


Fig. 6 血中トリグリセリドの測定

高脂肪飼料またはLEM1.0%含む高脂肪飼料を摂取させたマウスの血中トリグリセリド濃度を測定した。その結果、2群間で差は認められなかった。

脂肪組織中の脂質代謝関連遺伝子発現の解析

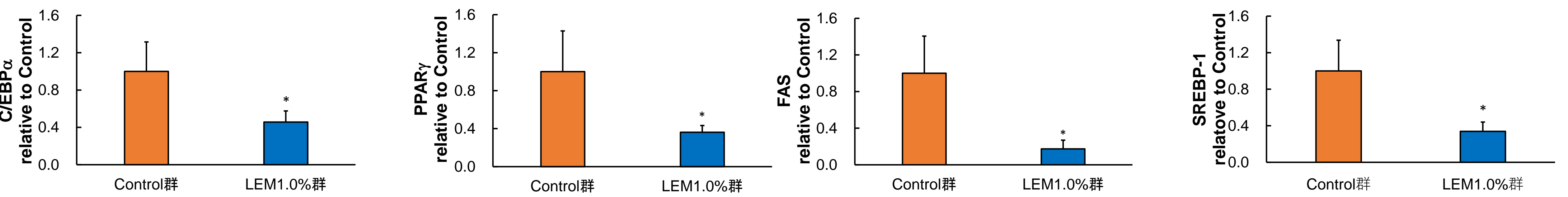


Fig. 7 脂肪組織中の脂質代謝関連遺伝子発現量の解析

高脂肪飼料またはLEM1.0%含む高脂肪飼料を摂取させたマウスの脂肪組織中のC/EBPα、PPARγ、FAS、SREBP-1の発現量をRT-PCR法により解析した。その結果、C/EBPα、PPARγ、FAS、SREBP-1の発現量がControl群と比較してLEM群で有意に減少した。* P < 0.05 vs. Control

結果・考察

脂肪細胞中の中性脂肪量は、Control群と比較してLEMを0~3日添加した群では有意に増加した。一方で、LEMを6~10日添加した群では有意に減少した。このことから、LEMの添加は脂肪細胞分化過程の後期に影響を与えることが示唆された。KKAYマウスにおいては、体重、総摂食量及び総摂取エネルギー量は飼育期間を通して2群間で差が認められなかった。血糖値は飼育期間に伴って上昇したが、8週目でControl群と比較してLEM群で上昇の抑制を示した。また、PPARγ、C/EBPα、SREBP-1、FASのmRNA量はControl群と比較してLEM群で有意に減少した。これらの結果から、LEMの添加は分化初期で肥大脂肪細胞を増加させ、脂肪を蓄積させるが、分化後期では分化を抑制し、脂肪蓄積を阻害することが考えられた。さらに、LEMの摂取は体重には影響することなく血糖の上昇を抑制したこと、脂肪細胞の分化に伴うアディポサイトカイン産生に影響を与える可能性が示唆された。今後、血中のアディポネクチン量やレプチン量、インスリン量などの測定を行い、解析していく必要があると考える。