

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00842

研究課題名(和文)トランス脂肪酸によるインスリン抵抗性発症機序の解析と臨床栄養学的応用

研究課題名(英文) Mechanisms of insulin resistance induced by trans fatty acids and applications in clinical nutrition

研究代表者

横山 嘉子 (YOKOYAMA, Yoshiko)

聖徳大学・人間栄養学部・准教授

研究者番号：40202395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランス脂肪酸の摂取によりインスリン抵抗性が増加することが知られているが、その詳細な生化学的解析は行われていない。今回の研究ではYMB-1-E細胞その他の細胞を用いて、エライジン酸によるインスリン受容体および同基質-1の量的変動、チロシン残基リン酸化の阻害、またこれら2つのタンパク質でセリン残基リン酸化阻害、TNF- $\alpha$ の産生亢進が起こることを明らかにした。EPAがこれらの反応について抑制的に働くことも明らかにした。これらの結果はトランス脂肪酸摂取を見直すことよりインスリン抵抗性が改善する可能性を示したものである。

研究成果の概要(英文)：It is known that insulin resistance is increased by ingestion of trans fatty acids, but detailed biochemical analysis of the process has not been conducted. In this study with YMB-1-E and other cells, I showed the attenuation of insulin receptor and its substrate-1 proteins, the inhibition of tyrosine residue phosphorylation, the inhibition of serine residue phosphorylation of these proteins and also the enhancement of TNF- $\alpha$  production by elaidic acid. EPA worked inhibitory to these responses. These results suggest the possibility of improving insulin resistance by reviewing trans fatty acid intake.

研究分野：食生活学

キーワード：インスリン抵抗性 トランス脂肪酸 TNF-

## 1. 研究開始当初の背景

植物油にはオレイン酸の含量が高い。そのため、植物油を原料とした硬化油に含まれるトランス脂肪酸のほとんどがエライジン酸であり(食品安全委員会平成18年度食品安全確保総合調査)硬化油を原料とする食品の生体への作用は多くはエライジン酸によるものと考えられる。トランス脂肪酸については、2015年にアメリカ食品医薬品局(FDA)より3年以内に工業的に産生されたトランス脂肪酸を含む油脂の使用を全廃する、また食品添加物としての安全性認可(GRAS)を撤廃するとの指針が出された。それに伴い、硬化油製造法の改良がおこなわれ、含まれるトランス脂肪酸量が減少したことから、トランス脂肪酸の危険性について研究する必要がなくなったとの主張も散見される。しかしながら、現在でもメロンパン1個につき1.4gのトランス脂肪酸が含まれていることも事実である。しかも日本の開示基準では0.3g以下の場合に表示義務がないといった事情もあり、甘いものを好む風潮から、まだまだ一定量のトランス脂肪酸を摂取しているのは疑いもない事実である。糖尿病は、中高年の男性で肥満の人の病気というイメージをもつが、20~30代の若い世代ややせ型の女性にも増えていることが疫学的研究で明らかにされている。これらの全てにトランス脂肪酸が関与しているとは考えにくい、国民病ともいわれる糖尿病に対するトランス脂肪酸関与についての生化学解析は急務であると考えられる。

申請者らの研究でトランス脂肪酸が細胞の細菌感染のセンサーであると考えられていたToll様受容体を介して、細胞内情報伝達系を駆動していることが明らかとなった。未だ詳細な機構については未解明な部分が多いが、肥満や2型糖尿病患者では骨格筋のTLR4発現が増加しており、トランス脂肪酸がTLR4を介して下流のJNKやIKKを活性化しインスリン抵抗性を起こす経路が推測されている。また食事の西洋化に伴う高脂肪食が腸内細菌叢のバランスを崩して、TLR4のリガンドであるLPSを増加させ、TLR4細胞内情報伝達系を介して炎症性サイトカイン産生を亢進させているとの報告もある。トランス脂肪酸によるインスリン抵抗性の発現に、どのような機構が関わっているのかを解明することは、糖尿病の治療、予防に非常に重要である。

## 2. 研究の目的

インスリン抵抗性は、現在では肥満をはじめとして、糖尿病、高血圧、高脂血症などといった、現代人を悩ます生活習慣病の根本的な背景メカニズムのひとつととらえられている。多くの研究により、複雑なホルモンやサイトカインのネットワークや脂肪細胞を介した発症と進展の病態生理が明らかにされつつある。本研究ではエライジン酸による

インスリン受容体および同基質のリン酸化を検証することを目的とする。さらに2型糖尿病の発症に重要な役割を持つといわれるTNF- $\alpha$ 産生に対するエライジン酸の阻害機構を明らかにすることをもう一つの目的とする。併せて、膵細胞を減少させるとされるミトコンドリア誘発性のアポトーシスについて検討を行った。また家庭内での調理でもトランス脂肪酸が生成されるとの報告もあることから、揚げ物調理での生成について検証を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト乳がんYMB-1-E(YMB)細胞を用いて、エライジン酸存在下での、インスリン受容体チロシンリン酸化、インスリン受容体基質1のチロシンおよびセリン残基リン酸化についてウェスタンブロッティング法で解析を行った。インスリン受容体チロシン残基リン酸化については、エライジン酸の濃度、暴露する時間などについて検討を行った。さらに、エライジン酸を添加した培地で、YMB細胞、ヒト単球系U937細胞およびTLR4ノックアウトBalb/cマウスから調整した初代脂肪細胞を培養し、TNF- $\alpha$  mRNA発現をリアルタイムPCRで解析した。

また、トランス脂肪酸については、家庭での調理によって、トランス脂肪酸が産生されるとの報告がある。そこで、一般家庭で、使用している調理器具についてその材質、油の種類と温度、調理時間などについて調査し、それを参考として、調理を行い、使用後の油についてガスクロマトグラフィーによる分析を行なった。使用した鍋の材質はステンレス、てんぷら油はオレイン酸を約40%含むものを使用した。調理は野菜、エビ、イカ、豚肉、牛肉などを約180 $^{\circ}$ Cの温度でてんぷらを揚げた。使用後のてんぷら油は食環境衛生研究所(前橋市)に委託して解析した。

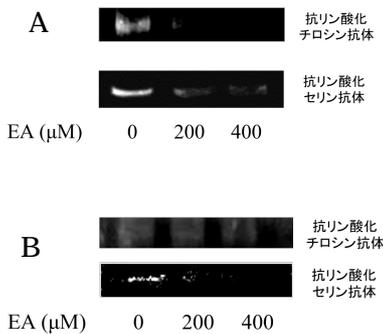
## 4. 研究成果

### (1) エライジン酸によるインスリン受容体情報伝達の抑制

今回の研究ではエライジン酸によるインスリン受容体および同基質1のリン酸化を抑制すること、さらに2型糖尿病の発症に重要な役割を持つといわれるTNF- $\alpha$ 産生に対するエライジン酸の作用を明らかにした。インスリン受容体および同基質1はチロシンあるいはセリン残基のリン酸化により活性が制御される。インスリン受容体ではチロシン残基がリン酸化されると活性化され細胞内に情報が伝えられるが、セリン残基がリン酸化されると活性が抑制される。YMB細胞を用いた実験では、下記の図1Aのようにチロシン残基のリン酸化はエライジン酸によって阻害された。しかしながらセリン残基のリン酸化も同じように阻害された。このことは予想外であるが、エライジン酸が細胞内リン酸化経路を阻害している可能性を示すものかもし

れない。

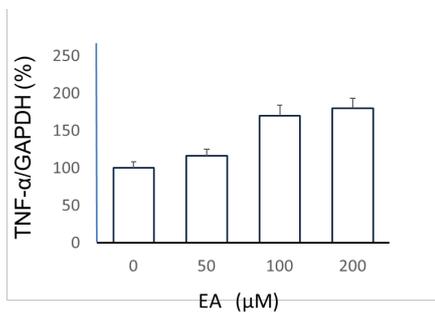
インスリン受容体基質1のリン酸化に対するエライジン酸の作用を解析したものが図1Bである。受容体基質1リン酸化に対して、エライジン酸は、セリン残基リン酸化を明らかに阻害することがわかった。しかしながら、チロシン残基のリン酸化については減少傾向にあるが、セリン残基における現象ほど大きな変化は認められなかった。これはチロシン残基のリン酸化が少ないためか、使用した抗体に原因があるのかは現在まで不明である。また受容体基質1はエライジン酸の処理により減少傾向がみられた。この点についてはさらなる検討が必要と思われる。



(図1) エライジン酸によるインスリン受容体(A)およびインスリン受容体基質1(B)リン酸化の阻害

### (2) エライジン酸による TNF- $\alpha$ 発現促進

TNF- $\alpha$  はインスリン抵抗性が発現する際に重要な役割を果たすサイトカインとして知られている。現在までにエライジン酸とTNF- $\alpha$  発現との関係は検証されていない。本実験ではYMB細胞を播種し24時間後にエライジン酸を添加し、72時間後にTNF- $\alpha$  mRNA量を測定した(図2)。TNF- $\alpha$  mRNA産生はエライジン酸の濃度依存的に上昇していることが示された。

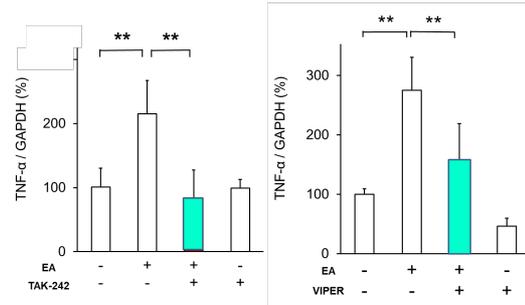


(図2) エライジン酸がTNF- $\alpha$  発現に及ぼす影響

### (3) TLR4の関与の検証

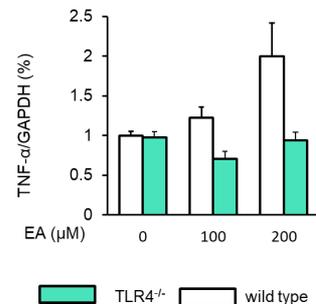
TNF- $\alpha$  は細胞内情報伝達系においてNF- $\kappa$ Bを活性化し、発現することが知られている。エライジン酸がどのような方式で細胞内情報

伝達を駆動するののかについて実験を行い、TLR4の阻害剤によりTNF- $\alpha$  発現が抑制されることを見出した。図3ではTLR4細胞内情報伝達系を阻害するTAK-242とVIPERの投与によりTNF- $\alpha$  mRNA発現が有意に抑制されることを示している。また、EPAがTAK-242やVIPERよりやや弱い、抑制活性を有することを明らかにした。



(図3) TLR4阻害剤がエライジン酸に誘導されるTNF- $\alpha$  発現に及ぼす影響

上記の結果をさらに確認するために、TLR4ノックアウトBalb/cマウスの脂肪細胞を用いてエライジン酸によるTNF- $\alpha$  発現を解析した。図4に示したようにTLR4ノックアウトマウスではエライジン酸によるTNF- $\alpha$  mRNA発現は起きなかった。



(図4) TLR4欠損マウス脂肪細胞におけるTNF- $\alpha$  mRNA発現に及ぼすエライジン酸の影響

### (4) エライジン酸のアポトーシス誘導機構への影響

ミトコンドリアが関与するとされるタモキシフェンおよびTNF- $\alpha$  誘発性のアポトーシスについてU937細胞を用いて検証を行った。この実験ではエライジン酸、パルミチン酸はタモキシフェンによるアポトーシスを抑制するが、TNF- $\alpha$  によるアポトーシスは抑制しないという結果であった。インスリン抵抗性発症との関連についてはマウス脾細胞インスリノーマ細胞などを用いて解析を行っているところである。トランス脂肪酸、飽和脂肪酸がTNF- $\alpha$  の細胞情報伝達を阻害するとの報告がある。アポトーシスとインス

リン抵抗性については更なる解析が必要である。

#### (5) 調理過程でのトランス脂肪酸生成の検証

家庭での調理の際にトランス脂肪酸が発生するのかを確認するために方法に記したような方法でてんぷらを作成し、残った油脂中のトランス脂肪酸を測定した。本実験の範囲内ではトランス脂肪酸の発生は認められなかった。しかしながら今回より高い温度での調理を行っている店舗などもあり、さらに詳しい実験を続ける必要があると思われる。

#### 研究成果のまとめ

今回の研究により、エライジン酸がインスリン受容体のリン酸化経路に影響を与えていること、インスリン抵抗性の発現に重要な役割を持つとされる TNF- $\alpha$  の発現に TLR4 を介して関与していることを示した。EPA がこれらの反応について抑制的に働くことも明らかにした。今後、エライジン酸が TNF- $\alpha$  産生を亢進する機構について詳細な検討が必要である。最近飽和脂肪酸も TLR4 を活性化すると報告されたことを考え合わせると、摂取するトランス脂肪酸を含めた脂肪酸とインスリン抵抗性との関連を精査することも急務であることが明らかとなった。また、生体内で脂肪酸のバランスに関わる酵素、E1vol6 などの解析も必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

横山 嘉子、斎藤 楓、岩崎有希、白石 弘美、トランス脂肪酸の摂取と疾病、New Diet Therapy、2018; 33: 84-89、査読あり

Tabei I, Tsuchida S, Akashi T, Ookubo K, Hosoda S, Furukawa Y, Tanabe Y, Tamura Y, Effects of a novel method for enteral nutrition infusion involving a viscosity- regulating pectin solution: A multicenter randomized controlled trial. Clin Nutr ESPEN, 2018; 23: 34-40, 査読あり, 10.1016/j.clnesp.2017.11.005

Kazama T, Tabei I, Sekine C, Funamizu N, Onda S, Okamoto T, Takeyama H, Morikawa T, Subareolar breast abscess in male patients: A report of two patients with a literature review. Surgical Case Reports, 2017; 3:128, 査読あり, DOI 10.1186/s40792-017-0402-3

岩崎 有希、白石 弘美、久保 宏隆、横山 嘉子、加納 和孝、エライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進、日本臨床栄養学会雑誌、2015; 37: 54-59、査読あり

岩崎 有希、白石 弘美、久保 宏隆、横山 嘉子、加納 和孝、エライジン酸によるアディポネクチン発現抑制作用、日本臨床栄養学会雑誌、2015; 37: 44-53、査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

岩崎 有希、白石 弘美、斎藤 楓、及川 千晴、白川 友紀、鈴木 恵理、横山 嘉子、加納 和孝、トランス脂肪酸によるアテローム性動脈硬化発症における TLR4 の役割の検討、第 39 回臨床栄養学会総会、2017 年、

横山 嘉子、斎藤 楓、岩崎 有希、白石 弘美、加納和孝、タモキシフェンにより誘導されるアポトーシスに対する脂肪酸の阻害効果の検討、日本脂質栄養学会第 26 回大会、2017 年

斎藤 楓、田口 祐未、岩崎 有希、白石 弘美、横山 嘉子、加納 和孝、トランス脂肪酸によるアテローム性動脈硬化発症における Toll 様受容体 4 の関与、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年

栗原 香織、田部井 功、上村 苑子、山田 恵、相木 浩子、吉田 和代、石川 幹子、泉 祐介、山田 高広、平本 淳、炎症反応が栄養状態に影響し管理に難渋した一例、第 32 回日本静脈経腸栄養学会、2017 年

岩崎 有希、田口 祐未、白石 弘美、斎藤 楓、横山 嘉子、加納 和孝、トランス脂肪酸による動脈硬化発症機序の解析、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年

岩崎 有希、白石 弘美、横山 嘉子、加納 和孝、トランス脂肪酸による動脈硬化発症における Toll 様受容体 4 の役割、日本脂質栄養学会第 25 回大会、2016 年

田口 祐未、斎藤 楓、川崎 奈那、津田 沙也加、平澤 美佳子、山崎 澄江、岩崎有希、白石 弘美、中莖 英里香、加納 和孝、横山 嘉子、エライジン酸の PMA 刺激ヒト単芽球白血病 U937 の分化誘導に及ぼす影響、第 63 回 日本栄養改善学会学術総会、2016 年

岩崎 有希、白石 弘美、久保 宏隆、横山 嘉子、加納 和孝、エライジン酸は TLR-4 を介して TNF- $\alpha$  を増加させアディポネクチン発現を抑制する、第 37 回 日本臨床栄養学会総会、2015 年

田口 祐未、岩崎 有希、白石 弘美、加納 和孝、横山 嘉子、エライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進、第 62 回 日本栄養改善学会学術総会、2015 年

岩崎 有希、白石 弘美、横山 嘉子、加納 和

孝、エライジン酸はTLR-4を介してTNF- $\alpha$ を増加させアディポネクチン発現を抑制する、  
日本脂質栄養学会 第24回大会、2015年

田部井 功、豊村 順子、関根 速子、風間高志、武山 浩、大山 晃弘、石川 博、森川 利昭、トリプルネガティブ乳癌患者の胸水より樹立されたEGF受容体系遺伝子陽性なヒト乳癌細胞株(NIBC)、第33回日本ヒト細胞学会学術集会、2015年

〔図書〕(計 2 件)

東口 高志編著、田部井 功、医薬ジャーナル社、第7歩 放射線療法と栄養管理．やさしい がん患者の代謝と栄養管理～病態の変化にそった実践法～、2017、164 ページ

志村 二三夫、石田 均編著、岩崎 有希、梅垣 敬三、加納 和孝、川野 仁、川村 堅、木戸 康博、合田 敏尚、布木 和夫、建帛社、カレント 人体の構造と機能及び疾病の成り立ち 1、2016、216 ページ

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

横山 嘉子 (Yokoyama, Yoshiko)  
聖徳大学・人間栄養学部・准教授  
研究者番号：40202395

### (2)研究分担者

加納 和孝 (Kano, Kazutaka)  
聖徳大学・人間栄養学部・教授  
研究者番号：70111507

神野 茂樹 (Jinno, Sigeki)  
聖徳大学・人間栄養学部・教授  
研究者番号：10251224

田部井 功 (Tabei, Isao)  
東京慈恵医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50266649

### (3)連携研究者

白石 弘美 (Shiraishi, Hiromi)  
人間総合科学大学・人間科学部・教授  
研究者番号：50572640

### (4)研究協力者

( )