

令和元年6月13日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00866

研究課題名(和文)トランスバクセン酸による細胞障害性の解析

研究課題名(英文)Cytotoxic effect of vaccenic acid

研究代表者

神野 茂樹 (JINNO, Shigeki)

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：10251224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：工業的トランス脂肪酸であるエライジン酸はU937細胞に、核の断片化、カスパーゼ9とカスパーゼ3の活性化、アポトーシスを誘導した。TLR-4の阻害剤であるTAK-242はカスパーゼ3活性化を抑制した。エライジン酸はTLR-4を介してカスパーゼ9を活性化していた。また、インシュリン刺激による細胞内へのブドウ糖の取り込みは主にGLUT4による。エライジン酸はGLUT4の膜局在とインシュリン受容体の活性化を抑制した。エライジン酸はFITCでラベルしたインシュリンのインスリン受容体への結合を用量依存的に抑制した。酪農製品中の天然のトランス脂肪酸であるバクセン酸もエライジン酸と同じ結果だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランス脂肪酸は、動脈硬化などによる虚血性心疾患のリスクを高めることが問題視されている。同時に高齢者では糖尿病発症に関連していると言われている。今回工業的に生産されるトランス脂肪酸であるエライジン酸がカスパーゼ9を経由してアポトーシスを引き起こし、インスリンによる糖吸収を抑制することを示した。この結果はエライジン酸のみならず酪農製品に存在する自然のトランス脂肪酸であるバクセン酸でも同様の結果を得た。今後バクセン酸や他の脂肪酸についても解析が必要と考えらえる

研究成果の概要(英文)：On the addition of elaidic acid, a major component of the industrial trans fatty acids, to human monocytic leukemia U937 cells, nuclear fragmentation, caspase 9 and caspase 3 activation were observed. Addition of TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 (TLR-4), inhibited caspase 3 activation. These data shows that elaidic acid activate caspase9 through TLR-4. Insulin-stimulated glucose uptake is primarily mediated by the glucose transporter 4 (GLUT4), which is predominantly expressed in mature skeletal muscle and fat tissues. Elaidic acid inhibits membrane translocation of GLUT4 and activation of insulin receptor by insulin stimulation. Elaidic acid produced a dose-related inhibition of FITC-labeled insulin binding. Vaccenic acid, a naturally occurring trans-fatty acid found in dairy products such as milk, also shows same result.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス インスリン トランス脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加工油脂やこれらを原料として製造される食品などに含まれるトランス脂肪酸は、LDL コレステロールを増加させ、HDL コレステロールを減少させる働きがある。トランス脂肪酸を摂取し続けた場合、動脈硬化などによる虚血性心疾患のリスクを高めることがあるため、生活習慣病の原因になることが問題視されている。一方トランス脂肪酸の摂取が高齢者では糖尿病発症に関連していることが示された。しかしながら、これらトランス脂肪酸がどのように細胞に対し障害をもたらすか生化学的な解析はあまりなされていないのが現状である。

また、反芻動物ではその発酵胃内ではトランス脂肪酸が生産される。このため、肉や乳製品にはトランス脂肪酸が多く含まれる。これらは疫学的には心疾患には関与しないとは言われているが、加工油脂に含まれるトランス脂肪酸と構造的類似性があるため人体に対する影響が示唆される。

2. 研究の目的

工業的に硬化油を作る過程で生成される主たるトランス脂肪酸であるエライジン酸を用いてその細胞障害性を解析する。同時に、反芻動物由来(乳製品や牛肉)食品の摂取において無視できないバクセン酸による細胞障害性も解析する。エライジン酸とバクセン酸は、どちらも炭素数 18 の一価不飽和トランス脂肪酸で二重結合の位置が異なっている。

まずトランス脂肪酸の細胞障害性を細胞レベルで調べるためアポトーシス誘導脳に関して検討する。同時にインスリン抵抗性の原因として細胞内へのグルコース取り込みへの影響を調べる。これらの解析からエライジン酸がどのように細胞に影響するか細胞内シグナル伝達経路を検討する。対象としては安全と言われるシス型不飽和脂肪酸を用いる。その後、バクセン酸を用いて同じ経路により細胞障害性が見られるか調べる。

3. 研究の方法

1) エライジン酸を用いて細胞へのアポトーシスを解析する。アポトーシスは、受容体からのカスパーゼ 8 を経由するシグナル経路とミトコンドリアからのカスパーゼ 9 を経由する経路が知られており、両者はターゲットカスパーゼであるカスパーゼ 3 を活性化し、クロマチンの断片化に至る。そこでエライジン酸がいかなる経路を活性化するのかを解析する。

2) エライジン酸を用いてインスリンによる細胞内へのグルコースの取り込みを解析する。インスリンからグルコース取り込みまではインスリン受容体活性化、IRS-1 リン酸化、グルコース輸送体 (GLUT4) の膜局在などの経路がわかっているのでエライジン酸がどの段階を抑制するのかを調べる。

3) 1) 2) の結果を踏まえエライジン酸とバクセン酸が同じ経路を活性化(あるいは抑制)するかを解析する。

4. 研究成果

1) 対数増殖中の U937 細胞にエライジン酸を添加し細胞増殖への影響を観察したところ、エライジン酸の濃度依存的に増殖が抑制された。経時的に細胞を回収し DAPI 染色により核の断片化を観察した。添加後 48 時間後から核の断片化がみられるようになり、72 時間を超えると 96 時間とあまり大きな変化は観察されなかった。このことから、エライジン酸により確かにアポトーシスが誘導することが示された。エライジン酸添加後、継時的にカスパーゼ 3 の活性を測定したところ 48 時間後から活性の上昇が認められた。カスパーゼ 3 の活性化の原因として上流のカスパーゼ 9 または 8 の活性化が考えられる。確認したところカスパーゼ 9 の活性は 48 時間後から上昇を認めたが、カスパーゼ 8 の活性上昇は認められなかった。HepG2 細胞ではカスパーゼ 8 経由でアポトーシスを誘導するとの報告が既にあるが、我々の U937 細胞の系ではカスパーゼ 8 の活性化は認められず、カスパーゼ 9 経由であることが示された。また HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) 細胞ではカスパーゼ 8 の活性化とともにカスパーゼ 9 の活性化も報告されているが、これはカスパーゼ 8 の活性化により BID を介したミトコンドリア障害が起こった副次経路のためと考えられる。今回の我々の結果から U937 細胞でカスパーゼ 8 は活性化されず、その阻害剤も影響がないことからカスパーゼ 9 単独の活性化によりアポトーシスが起きたことが初めて示された。

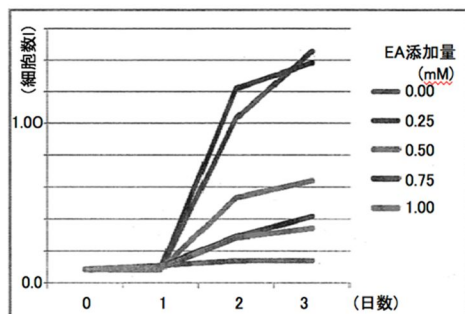


図1 エライジン酸による増殖への影響

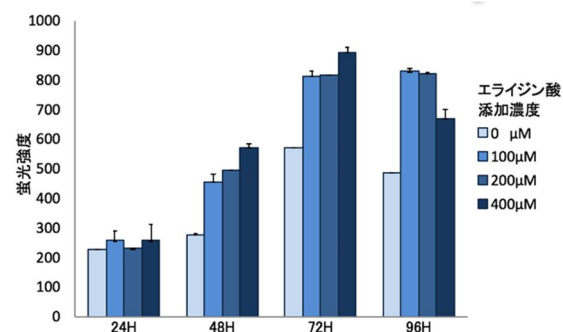


図2 エライジン添加後のカスパーゼ3活性

細菌感染時にリポタンパク質やリポ多糖類などを見分けるパターン認識受容体 (TOLL 様受容体 (TLR)) がマクロファージ、樹状細胞などに存在している。中でも TLR-4 受容体はグラム陰性菌のリポ多糖を認識するが、飽和脂肪酸の受容体になっているとの報告がある。そこで TLR-4 受容体の特異的阻害剤である TAK-242 により TLR-4 の経路を遮断したところエライジン酸によるアポトーシスを阻害した。TLR-4 受容体が刺激されると NF- κ B の支配下にある TNF- α の発現が誘導されることが報告されている。この場合 TNF- α デスレセプターを介してカスパーゼ 8 を活性化しアポトーシスを導くと報告されている。しかしながら今回 TNF- α の mRNA 発現は 1.5 倍しか誘導されず、低レベルの誘導ではカスパーゼ 8 を経由せず、直接カスパーゼ 9 を活性化することを示唆していた。

2) エライジン酸はヒト乳がん由来細胞株 YMB-E-1 においてインスリン依存的なグルコース取り込みを抑制していることがわかった。通常インスリン受容体にインスリンが結合すると、受容体の自己リン酸化が起こり、チロシンキナーゼ活性が上昇し、IRS-1 チロシンリン酸化を介して情報の伝達が行われ、GLUT4 を細胞膜表面に移動させ、グルコースの取り込みを行う。インスリン抵抗性の原因として、インスリン受容体または、インスリン受容体基質-1 (IRS-1) の欠損や発現量の異常、チロシンリン酸化の阻害、グルコーストランスポーター (GLUT-4) の局在の不良などが考えられる。

グルコーストランスポーター (GLUT-4) の動きを蛍光抗体法で染色して観察するとインスリンに応答した細胞内小胞から細胞膜への輸送が阻害されていることがわかった。GLUT4 はの移動に影響する上流は TOLL 様受容体 (TLR-4) に支配されてい流と考えられ、U937 細胞株のアポトーシス誘導と同様のシグナル伝達系によるものと考えられる。

インスリン応答がどの段階で抑えられているか調べるべくインスリン受容体の発現および活性化、インスリン関連タンパク質 (IRS-1) の発現および活性化を調べたところ、正常な伝達機構と比べ、エライジン酸の添加により IRS-1 タンパク質量の減少や IRS-1 チロシンリン酸化の低下が確認された。

脂肪酸がどのような機構で阻害しているのか考えられる伝達阻害として、脂肪酸がインスリン受容体とは別の受容体を介し、インスリン受容体や IRS-1 のチロシンリン酸化を阻害していること。脂肪酸が直接的に、インスリンがインスリン受容体に結合するのを阻害していることなどが考えられる。

以上のことから、インスリンを FITC にて蛍光ラベルし、エライジン添加後に蛍光インスリンを添加し細胞膜への結合を調べた。結果、インスリンはエライジン酸共存下では細胞膜への結合は認められなかった。インスリンの競合実験から蛍光インスリンがインスリン受容体に特異的に結合していることは確かめた。以上のことにより、エライジン酸がインスリンのインスリン受容体への結合を直接阻害していることが示された。この結果は残念ながらエライジン酸が細胞内シグナル伝達系の上流の TLR-4 により作用していることは否定する結果となってしまった。少なくとも炭素数 18 個の脂肪酸は飽和不飽和を問わずインスリンの結合を阻害する結果が得られ、その作用機序が興味深い。炭素数の異なる脂肪酸についても確認の必要がある。

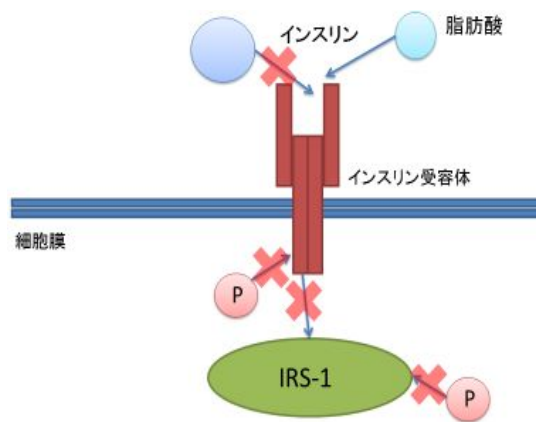


図3 インスリン結合の阻害

3) エライジン酸は炭素数 18 の脂肪酸でその 9 位が二重結合のトランス脂肪酸である。ところが反芻動物は発酵胃で炭素数 18 個 (ただし二重結合の位置は 11 位) のトランス脂肪酸であるバクセン酸を合成する。このことから、反芻動物由来のトランス脂肪酸であるトランスバクセン酸がエライジン酸と同じ経路を介し細胞障害を起こすことを調べる予定だった。しかし、予想に反し、インスリンの受容体への結合自体がエライジン酸により抑制されていた。インスリンの受容体への結合阻害はエライジン酸だけではなくバクセン酸、飽和脂肪酸であるステアリン酸やシス型脂肪酸であるオレイン酸でも見られた。これらの脂肪酸 (あるいは炭素数の異なる脂肪酸で) 相違点の有無を調べている。またこの結合阻害がインスリン独自のものではなくインスリン様増殖因子、上皮増殖因子など他の因子の受容体への結合に影響するのかどうかを解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Mechanism of Elaidic Acid-Induced Apoptosis in U937 Cells 高橋利江、神野茂樹、加納和孝 大阪医科大学雑誌 75 (2016) 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 工業的に生産される主なトランス脂肪酸であるエライジン酸によるインスリン抵抗性の効

- 果の解析 高橋利江、神野茂樹 第89回日本生化学会大会 (2016) 査読なし
2. エライジン酸によるインスリン受容体への結合阻害の解析 前原怜実、神野茂樹 栄養食糧
学会 (2018) 査読なし

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 利枝
ローマ字氏名：Toshie Takahashi
所属研究機関名：東京大学
部局名：大学院医学系研究科(医学部)
職名：助手
研究者番号(8桁)：80236299

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 橘川祥子
ローマ字氏名： Shoko Kikkawa
研究協力者氏名： 深谷 真由
ローマ字氏名： Mayu Fukaya
研究協力者氏名： 前原 怜実
ローマ字氏名： Satomi Maehara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。