

令和元年6月26日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15494

研究課題名(和文) 飽和脂肪酸とトランス脂肪酸による脂肪毒性の発現の違いや共通性を生み出す分子の解明

研究課題名(英文) Exploration of mechanisms that make differences or similarities in lipotoxicity of saturated and trans fatty acids

研究代表者

石橋 賢一 (Ishibashi, Kenichi)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00707458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、飽和脂肪酸とトランス脂肪酸による脂肪毒性の発現の違いを生み出す分子を明らかにする。トランス脂肪酸に特徴的な脂肪毒性を発現させる機序を、トランス脂肪酸に持続的に曝されることでインスリンに応答した糖の取り込みが低下した脂肪細胞を解析することで調べたところ、この細胞では糖の取り込みの鍵分子であるAktの活性化が抑制されていた。また、Aktの足場となる細胞膜のリン脂質における変化も明らかにした。これらの変化は、飽和脂肪酸に持続的に曝された脂肪細胞では見られず、膜リン脂質の変化によるAktの活性化の抑制がトランス脂肪酸に特徴的な脂肪毒性機序の一因である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トランス脂肪酸に特徴的な脂肪毒性に関わる分子を明らかにした。この分子の量や活性を指標とすれば、トランス脂肪酸により脂肪毒性が起こりやすい人なのかを調べられる可能性がある。これによりトランス脂肪酸の摂取量と疾患発症との関係がより正しく評価できる可能性があり、WHOの「Trans fat free by 2023」に向けた我が国の政策にも貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Excessive intake of fatty acids induces toxicity in cells, and it is called lipotoxicity. It is reported that intake of saturated fatty acid (SFA) and trans fatty acid (TFA) is involved in an induction of lipotoxicity. However, the mechanism is not elucidated. Our studies indicate that there are distinctive mechanisms for lipotoxicity of SFA and TFA. Therefore, we examined TFA-distinctive mechanism for lipotoxicity using adipocytes persistently exposed to TFA. Our results revealed that impairment of insulin-dependent glucose uptake is caused by suppression of Akt activation in cells persistently exposed to TFA. Moreover, composition of phospholipids in the plasma membrane was altered in the cells. On the other hand, these alterations were not observed in cells persistently exposed to SFA, suggesting that TFA-distinctive lipotoxicity is induced by alteration of composition of phospholipids and suppression of Akt.

研究分野：脂質生化学

キーワード：トランス脂肪酸 飽和脂肪酸 インスリン応答性 Akt 膜リン脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 飽和脂肪酸による脂肪毒性

我々は、日々の食事から、飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸などの脂肪酸を摂取しているが、過剰に摂取すると、様々な疾患の発症リスクが高まる。その原因として、脂肪酸が様々な組織や細胞に機能障害を引き起こすことがあり、脂肪毒性と呼ばれている（引用文献①）。特に、飽和脂肪酸の摂取量が多いと、肝細胞や膵β細胞、神経細胞、免疫細胞で、細胞死やストレス応答（引用文献②）、炎症応答（引用文献③）、インスリン応答性低下（引用文献④）が起こることは報告されているが、その機序はほとんど明らかになっていない。

(2) トランス脂肪酸による脂肪毒性は飽和脂肪酸とは異なる？

我々が摂取する食事には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸だけではなく、人工のトランス脂肪酸も含まれている。炭素数 18 でトランス型の二重結合を一つ有するエライジン酸は、食品加工の際にオレイン酸が変化することで生成する。立体構造や常温で固体である点は、飽和脂肪酸であるステアリン酸と似ている。

当研究室では、脂肪細胞を用いた解析から、血中濃度を想定した 10 μM のエライジン酸を持続的に培地に添加して分化させた時に、インスリンに応答した糖の取り込みが低下することを明らかにした（引用文献⑤：Ishibashi *et al.*, *Int J Food Sci Nutr.* 67, 99-110, 2016）。一方、飽和脂肪酸であるステアリン酸を同じ濃度で添加した際には、インスリンに応答した糖の取り込みは低下せず、トランス脂肪酸は飽和脂肪酸とは異なる機序で、脂肪毒性を発現している可能性が示唆された。

また、小胞体ストレス応答への影響を調べた際に、ステアリン酸は小胞体ストレス応答経路の 1 つを活性化させたが、エライジン酸の場合には影響がなく、飽和脂肪酸に特徴的に発現する脂肪毒性も存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、飽和脂肪酸とトランス脂肪酸による脂肪毒性の発現の違いを生み出す分子を明らかにする。これにより、脂肪毒性の発現に違いを生み出す分子の発現量や活性を測定することで、飽和脂肪酸あるいはトランス脂肪酸により脂肪毒性が起こりやすい人なのかを調べ、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸により代謝性疾患が引き起こされるリスクを予測し、その人に合った脂肪酸摂取基準の提案を目指す。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸懸濁液の調製と脂肪酸に持続的に曝された脂肪細胞の作製

本研究では、他の研究のように高い濃度の脂肪酸に一時的に曝されたときに起こる脂肪毒性ではなく、血中で想定される濃度の脂肪酸に持続的に曝された時に起こる脂肪毒性に着目している。まず、10 mM のエライジン酸、ステアリン酸懸濁液を、それぞれの脂肪酸を牛血清アルブミン（BSA）に結合させることで調製した。これらの脂肪酸を、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の培養液中に、終濃度が 10 あるいは 50 μM となるように添加し、10 日間培養した。その後、インスリンと 3-Isobutyl-1-methylxanthine、デキサメタゾンを用いて常法に従って、上記の脂肪酸の存在下で 8 日間かけて脂肪細胞へと分化誘導した。

(2) インスリンシグナルの解析

これまでに、10 μM のエライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞では、インスリンに応答した糖の取り込みが低下することを明らかにしてきた（引用文献⑤）。そこで、エライジン酸により脂肪毒性が起こる機序を明らかにするために、インスリンシグナルを解析した。具体的には、イムノブロット法により、インスリン受容体のリン酸化、糖の取り込みの鍵分子である Akt のリン酸化、Akt の基質である AS160 のリン酸化を調べた。次に、Akt のリン酸化酵素である PDK-1 のリン酸化、mTOR-Rictor 複合体の形成の度合いを免疫沈降法とイムノブロット法とを組み合わせることで調べた。また、PI3K の活性化については、*in vitro* kinase assay により調べた。さらに、Akt の細胞膜への集積を調べるために、引用文献⑤と同様の方法で細胞膜画分を調製した後、イムノブロット法で膜への集積量を測定した。

(3) 膜リン脂質の網羅的な解析

Akt が細胞膜へ集積し、活性化する際の足場となる膜リン脂質を網羅的に解析した。上記と同様の方法で調製した細胞膜を含む画分から、Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出した。GC/MS を用いた解析では、TLC プレート（展開溶媒：石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸 = 82 : 18 : 1）を用いて、リン脂質を分離した後、含まれる脂肪酸をメチルエステル化し、定量解析した。また、抽出した総脂質をメタノールに懸濁し、LC-ESI-MS/MS 装置 QTRAP4500（AB Sciex）を用いて MRM 測定を行い、ホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルイノシトール（PI）について、結合している 2 本の脂肪酸鎖の組み合わせが異なる分子種を網羅的に定量解析した。

4. 研究成果

(1) トランス脂肪酸はインスリンシグナルに飽和脂肪酸とは異なる影響を与える

申請者は、これまでに 10 μM のエライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞では、インスリンに応答した糖の取り込みが低下することを明らかにしてきた (引用文献⑤)。一方、10 μM のステアリン酸を添加した場合には、このような変化は見られなかった。そこで、この機序を明らかにすれば、飽和脂肪酸ではなく、トランス脂肪酸に特徴的な脂肪毒性の機序を明らかに出来ると考え、糖の取り込みに関わるインスリンシグナルを調べた。

インスリン受容体にインスリンが結合すると受容体の活性化が起こり、それに引き続き下流の PI3K が活性化することで、細胞膜で PIP₂ から PIP₃ が産生され、そこへ Akt が集積する。集積した Akt は、PDK-1 や mTOR-Rictor 複合体によってリン酸化されることで活性化し、基質である AS160 をリン酸化することでグルコース輸送体 GLUT4 を細胞膜へと移行させ、糖の取り込みを促進する。まず、インスリン受容体の活性化をリン酸化の度合いで評価したところ、インスリン刺激による受容体のリン酸化は、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞でも、コントロール細胞と同程度に起こった。次に、インスリンに応答した糖の取り込みにおいて中心的な役割を担う Akt のリン酸化を調べたところ、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞では、インスリンに応答した Akt のリン酸化が抑制されていた。さらに、AS160 のリン酸化も抑制されており、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞では、Akt の活性化が抑制されていることが明らかになった。一方、ステアリン酸を 50 μM の濃度で添加した場合にもインスリンに応答した糖の取り込みが抑制されたが、Akt のリン酸化の抑制は見られず、エライジン酸による Akt の抑制機序を明らかにすれば、トランス脂肪酸に特徴的な脂肪毒性の機序を明らかに出来ると思われた。

また、本研究では解析を行うことが出来なかったが、ステアリン酸は Akt を介さない経路、あるいは Akt よりも下流の部分の抑制することで、インスリンに応答した糖の取り込みを抑制している可能性が示唆され、この部分の解析を進めれば、飽和脂肪酸に特徴的な脂肪毒性の機序も明らかに出来ると思える。

(2) トランス脂肪酸による Akt の細胞膜への集積の抑制

エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞で、Akt の活性化が抑制される機序を明らかにするために、Akt の活性化に関わる因子について解析した。まず、Akt をリン酸化する酵素について調べたところ、PDK-1 の活性化の指標であるリン酸化や、mTOR-Rictor 複合体の形成の度合いに、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞とコントロール細胞とで差はなかった。そこで、Akt の細胞膜への集積自体が抑制されているのではないかと予想して調べたところ、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞では、インスリン刺激により細胞膜へと集積した Akt の量が、コントロール細胞よりも少なかった。(1) と (2) の結果を合わせて、投稿準備中である。

(3) トランス脂肪酸による膜リン脂質の変化

細胞膜への Akt の集積が低下していたことから、PIP₃ の産生量が減少している可能性を考え、in vitro kinase assay により、PIP₂ から産生される PIP₃ の量を指標にして、PI3K の活性を調べたが、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞とコントロール細胞とで差はなかった。そこで、PC に結合する脂肪酸の種類によって、Akt と PC との結合が影響されることが in vitro binding assay により示されていたことから (引用文献⑥)、細胞膜に含まれるリン脂質に注目し、解析した。

まず、GC/MS を用いて細胞膜に含まれるエライジン酸やその他の脂肪酸の量を測定したところ、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞の細胞膜では、エライジン酸が含まれているだけではなく、エライジン酸と同じく炭素数が 18 の不飽和脂肪酸であるオレイン酸の含有量が減少していた (研究業績 [図書]: Ishibashi *et al.*, *InTechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.76646, 2018 にて発表)。これにより、膜の流動性を高める不飽和脂肪酸の含有量が減る一方、流動性を低下させる飽和脂肪酸と立体構造の似たエライジン酸が増えることで、Akt が集積する膜の領域で流動性が低下している可能性が考えられた。

さらに、親水性部分や結合している脂肪酸の組み合わせによって数百種類以上存在するリン脂質分子種のうち、どのリン脂質分子種の含有量が変化しているのかを調べるために、LC/MS で網羅的に解析した。その結果、PC や PE、PS ではエライジン酸を含むと推定されるリン脂質分子種が検出されたが、このような分子種は PI では検出されなかった。この結果は、TLC プレートで 2 次元展開を行うことで、PC、PE、PS、PI を分離し、それぞれに含まれる脂肪酸の量を測定した際に、PC や PE、PS にはエライジン酸が含まれていたが、PI では検出出来なかったことと一致していた。また、PC と PE、PI のそれぞれで、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞で、コントロール細胞と比べて含有量が変化しているリン脂質分子種が複数存在した。さらに、一部のリン脂質分子種は、ステアリン酸に持続的に曝された細胞では変化せず、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞でのみ変化していた。

これらの結果から、右図のように膜リン脂質での変化が、Aktの細胞膜への集積を抑制している可能性が示唆されたが、これらの因果関係を示すことは出来なかった。Aktの集積する膜領域に焦点を絞った解析を進めた上で、特徴的な変化が見られたリン脂質分子種を細胞へと取り込ませることで、因果関係を示すことが今後の課題である。

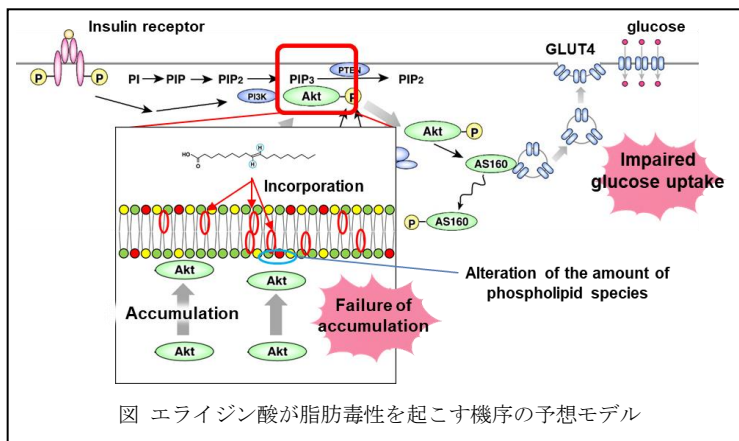


図 エライジン酸が脂肪毒性を起こす機序の予想モデル

<引用文献>

- ① Ertunc ME., Hotamisligil GS. D Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res.*, 57, 2016, 2099-2114
- ② Anderson EK., Hill AA., Hasty AH. Stearic acid accumulation in macrophages induces toll-like receptor 4/2-independent inflammation leading to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 32, 2012, 1687-1695
- ③ Kennedy A., Martinez K., Chuang CC., LaPoint K., McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr.*, 139, 2009, 1-4
- ④ Chavez JA., Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys.*, 419, 2003, 101-109
- ⑤ Ishibashi K., Nehashi K., Oshima T., Ohkura N., Atsumi GI. Differentiation with elaidate tends to impair insulin-dependent glucose uptake and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Food Sci Nutr.*, 67, 2016, 99-110
- ⑥ Koeberle A., Shindou H., Koeberle SC, Laufer SA, Shimizu T, Werz O. Arachidonoyl-phosphatidylcholine oscillates during the cell cycle and counteracts proliferation by suppressing Akt membrane binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 2013, 2546-2551

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

二瓶和樹、石橋賢一、厚味巖一、精油を用いた臨床研究論文を効率的に検索する方法の検討、日本アロマセラピー学会学会誌、査読有、17(1)、2018、47-56

[学会発表] (計24件)

- ① 石橋賢一、武田剛寛、厚味巖一、脂肪細胞でのエライジン酸によるインスリンシグナルの抑制、日本薬学会第139年会、2019年
- ② 石橋賢一、厚味巖一、植物油由来精油が脂肪細胞におよぼす影響の解析、第7回あしなが予防医学研究会、2018年
- ③ 石橋賢一、二瓶和樹、山口れな、厚味巖一、精油を用いた臨床研究論文を効率的に検索する方法の検討(第二報)、第21回日本アロマセラピー学会 学術総会、2018年
- ④ 石橋賢一、武田剛寛、吉村龍馬、厚味巖一、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞ではインスリンシグナルが部分的に抑制される、第23回 アディポサイエンス・シンポジウム、2018年
- ⑤ 石橋賢一、武田剛寛、濱弘太郎、横山和明、厚味巖一、エライジン酸に持続的に曝された脂肪細胞におけるリン脂質分子種の解析、第59回日本脂質生化学会、2018年
- ⑥ 石橋賢一、望月悠莉、石井育夫、宮下眞野、武田剛寛、川崎靖、名取泰博、厚味巖一、ステアリン酸による脂肪細胞での IRE1 α /XBP-1 経路の活性化、日本薬学会第138年会、2018年
- ⑦ 石橋賢一、大藏直樹、厚味巖一、エライジン酸がインスリンシグナルとリン脂質の脂肪酸組成に与える影響の解析、Conbio2017、2017年
- ⑧ 石橋賢一、大藏直樹、厚味巖一、エライジン酸の存在下で分化させた脂肪細胞のインスリン応答性とリン脂質に含まれる脂肪酸の解析、第22回 アディポサイエンス・シンポジウム、2017年
- ⑨ 石橋賢一、内田典士、大藏直樹、厚味巖一、エライジン酸がオレイン酸の細胞内動態に与える影響の解析、第58回脂質生化学会、2017年

[図書] (計1件)

Ishibashi K、Takeda Y、Atsumi GI、InTechOpen、Effect of trans fatty acid on insulin responsiveness and fatty acid composition of lipid species of 3T3-L1 adipocytes、2018、DOI: 10.5772/intechopen.76646

6. 研究組織

研究代表者

石橋 賢一 (KENICHI Ishibashi)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00707458