

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34431

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14417

研究課題名(和文)食脂肪の嗜好性の形成および維持に関する生化学および動物行動学的研究

研究課題名(英文)Elucidation of the regulation of palatability of dietary fat by biochemical and animal behavioral studies

研究代表者

安達 真一 (Adachi, Shin-ichi)

関西福祉科学大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：10747041

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)：マウスを用いた動物行動学検討により、食脂肪の摂取によって脳海馬神経細胞の Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-mammalian target of Rapamycin(mTOR) 経路が活性化されることが明らかとなった。加えて、食脂肪摂取時に見られる海馬PI3K/Akt-mTOR経路の活性化はオピオイド系を介していること、および海馬の μ オピオイド受容体はその嗜好性に関与していることが示された。以上より、海馬神経細胞におけるPI3K/Akt-mTORシグナル伝達経路は、海馬の μ オピオイド受容体を介して食脂肪の嗜好性に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪を多く含む食品は、我々人間や動物をやみつきにさせる高い嗜好性を持っている。その一方で、食脂肪の過剰摂取は生活習慣病のリスクファクターである肥満を引き起こすことから問題視されている。本研究により、海馬神経細胞のPI3K/Akt-mTORシグナル伝達経路は、食脂肪の嗜好性の発現に関与していることが示唆され、高脂肪食品に対する高度な嗜好性の形成・維持のメカニズムの一端が明らかとなった。今後、高脂肪食品の嗜好性のメカニズムがより詳細に明らかとなれば、高嗜好性かつ低カロリーの油脂代替物の開発に応用が可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that ingestion of dietary fat increased activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-mammalian target of Rapamycin (mTOR) signaling pathway in the neurons in the hippocampus in mice by animal behavioral studies. Additionally, we examined the activation of the hippocampal PI3K-Akt-mTOR signaling pathway during ingestion of dietary fat is mediated via the mu-opioid system and that mu-opioid receptors in the hippocampus are involved in the palatability. These results indicated the PI3K/Akt-mTOR signaling pathway in the hippocampal neurons participates in the palatability of dietary fat via mu-opioid receptors in the hippocampus.

研究分野：栄養化学

キーワード：嗜好性 食脂肪 PI3K/Akt-mTORシグナル伝達経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪を豊富に含む食品は、我々人間や動物をやみつきにさせる高い嗜好性を持っている。また、マグロのトロや霜降り肉に代表される脂肪を多く含む食品を摂取すると、口の中でおいしさだけでなく、摂取後にも高い満足感が得られる。このように脂肪は高度な嗜好性と満足感を有する食品成分である一方で、脂肪の過剰摂取は生活習慣病のリスクファクターである肥満を引き起こすことから世界規模で深刻な社会問題となっている。従って、食脂肪に対する高度な嗜好性の形成および維持のメカニズムを解明することは、この問題の解決に資する。

2. 研究の目的

脂肪のように嗜好性の高い食品成分は、摂取した際に代表的なオピオイドであるモルヒネなどの依存性薬物と同様に繰り返し摂取したいという欲求が惹起される。これまでに、申請者および申請者が所属していた研究室は、食脂肪の執着を伴う強い嗜好性は、モルヒネと同様に脳報酬系ドーパミン作動性神経およびオピオイド系を介して形成されることを明らかとしている(Adachi et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013 および Matsumura et al., *FEBS Lett*, 2012)。

モルヒネは鎮痛作用を持ち、主に μ オピオイド受容体を介して執着を引き起こす。 μ オピオイド受容体は、腹側被蓋野、側坐核および海馬などの中枢神経系に存在しており、その受容体の活性化によりシグナル伝達経路のひとつである phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路が活性化されることが示されている(Polakiewicz et al., *J Bio Chem*, 1998)。PI3K/Akt 経路は、細胞の増殖や分化、糖代謝などの様々な生理作用の発現に関与することが明らかとなっており、特に海馬における PI3K/Akt 経路は記憶や学習に関与することが報告されている(Sui et al., *Learn Mem*, 2008)。また Akt の下流経路のひとつである mammalian target of Rapamycin (mTOR)/70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K) 経路が海馬において長期記憶の形成に関与していること、および海馬 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 経路の活性は、モルヒネに対する報酬効果の発現に必須であることが示されている(Cammaller et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003 および Cui et al., *Neuroscience*, 2010)。腹側被蓋野および側坐核を含む中脳辺縁系においても、Akt の活性化はモルヒネ中毒の発現に関与することが報告されている (Krishnan et al., *Biol Psychiatry*, 2008)。加えて、腹側被蓋野から海馬にドーパミン作動性神経が投射されており、長期増強や記憶の形成に関与していることが示されている(Lisman et al., *Neuron*, 2005)。以上のように、海馬、側坐核および腹側被蓋野などの中枢神経系の PI3K/Akt/mTOR 経路がモルヒネに対する報酬効果の発現に強く関与していることが示されているが、食脂肪の嗜好性に関与しているかについては全く明らかとなっていない。

従って本研究の目的は、食脂肪に対する嗜好性の形成・維持に海馬神経細胞の PI3K/Akt/mTOR 経路が関与しているか、およびそのメカニズムについて生化学手法および動物行動学的手法を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究は、宇都宮大学動物実験委員会および関西福祉科学大学動物実験管理委員会の承認を受けて実施した。すべての実験において、動物は雄性 ICR マウス、8 週齢を用いた。明暗周期 12 時間(明期: 6:00~18:00)、室温 22 の環境下で 6 日間順化させ、以下の各実験を行った。この間、固形試料(CRF-1)(日本チャールズ・リバー(株))を不断給餌し、水は自由摂取とした。

(1) 食脂肪摂取に対する海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の関与

マウスが食脂肪を摂取した際に、薬物と同様に海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路が活性化されるかについて検討を行った。マウスに 4 日間連続で 30 分間の絶水絶食を課した後に、大豆油をレシチンで乳化した脂肪溶液(以下、脂肪溶液)または脂肪溶液の溶媒である 1.2% レシチン溶液(以下、溶媒溶液)を 10 分間自由摂取させ、その摂取量を測定した。4 日目の自由摂取終了直後にマウスの脳から海馬を採取し、Akt および mTOR のリン酸化レベルをウエスタンブロット法で解析した。

(2) 食脂肪摂取が海馬神経細胞の PI3K/Akt 経路に与える影響

食脂肪を摂取した際の Akt の活性化が海馬のどの細胞で起こっているのかを免疫組織化学的手法を用いて調べた。マウスに 4 日間連続で 30 分間の絶水絶食を課した後に、脂肪溶液を 10 分間自由摂取させた。4 日目の自由摂取終了直後にマウスを固定し、脳を摘出した。海馬脳凍結切片を作成し、抗 p-Akt(S473)(D9E)XP 抗体、抗 NeuN 抗体、抗 GFAP 抗体および抗 Iba1 抗体を用いて染色を行った。

(3) 海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の阻害が食脂肪の摂取行動に与える影響

海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の阻害が食脂肪の摂取行動にどのような影響を与えるか調べた。マウスの両側海馬にガイドカニューレを挿入する手術を行い、5 日間の回復期間を設けた後に、4 日間の脂肪溶液摂取試験を行った。マウスに 4 日間連続でガイドカニューレを介して PI3K 阻害剤 LY294002 または mTOR 阻害剤 Rapamycin を両側海馬へ微量投与した。その後、30 分間

の絶水絶食を課し、脂肪溶液を 10 分間自由摂取させ、その摂取量を測定した。実験終了後、凍結脳切片を作成し、ガイドカニューレの挿入位置を確認した。なお、誤設置を確認した個体は解析から除外した。

(4) 食脂肪摂取における海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路に対するオピオイド系の関与

オピオイド受容体拮抗薬を投与し、脂肪溶液摂取時の海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の活性化に変化が見られるかについて検討を行った。マウスに 4 日間連続でオピオイド受容体拮抗薬のひとつである Naltrexone を腹腔内投与した。その後、30 分間の絶水絶食を課し、脂肪溶液を 10 分間自由摂取させ、その摂取量を測定した。4 日目の自由摂取終了直後に脳海馬を採取し、Akt および mTOR のリン酸化状態をウエスタンブロット法にて解析した。

(5) 海馬 μ オピオイド受容体の阻害が油脂の摂取行動に与える影響

海馬への選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬投与が食脂肪の摂取行動にどのような影響を与えるか調べた。マウスの両側海馬にガイドカニューレを挿置する手術を行い、5 日間の回復期間を設けた後に、4 日間の脂肪溶液摂取試験を行った。マウスに 4 日間連続でガイドカニューレを介して選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬である β -Funaltrexamine (β -FNA) を両側海馬へ微量投与した。その後、30 分間の絶水絶食を課し、脂肪溶液を 10 分間自由摂取させ、その摂取量を測定した。実験終了後、凍結脳切片を作成し、ガイドカニューレの挿入位置を確認した。なお、誤設置を確認した個体は解析から除外した。

4. 研究成果

(1) 食脂肪摂取に対する海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の関与

マウスが食脂肪を摂取した際に、薬物と同様に海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路が活性化されるかについて検討を行った。4 日間の脂肪溶液摂取群の溶液摂取量は、溶媒溶液摂取群に比べて各試験日で有意に高い値を示した。さらに、脂肪溶液摂取群の溶液摂取量は経日的な増加傾向を示した。4 日目の溶液摂取終了後におけるマウス脳海馬 Akt および mTOR のリン酸化レベルをウエスタンブロット法にて評価したところ、脂肪溶液摂取群の Akt のリン酸化レベルは溶媒溶液摂取群よりも有意に高い値を示し、脂肪溶液摂取群の mTOR のリン酸化レベルは溶媒溶液摂取群よりも高い傾向を示した。以上より、食脂肪の摂取により海馬の Akt および mTOR が活性化されることが明らかとなった。

(2) 食脂肪摂取が海馬神経細胞の PI3K/Akt 経路に与える影響

免疫蛍光染色法によりマウス海馬における NeuN (神経細胞マーカー)、GFAP (星状細胞マーカー)、Iba1 (小膠細胞マーカー) およびリン酸化 Akt (S473) の局在を観察したところ、リン酸化 Akt は GFAP、Iba1 ではなく、NeuN と特に共局在していることが確認された。これは、食脂肪摂取時の海馬 Akt の活性化は、星状細胞や小膠細胞などのグリア細胞ではなく、神経細胞特異的に起こることを示している。

(3) 海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の阻害が食脂肪の摂取行動に与える影響

マウス両側海馬に PI3K 阻害剤 LY294002 および mTOR 阻害剤 Rapamycin を微量投与し、海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の阻害が食脂肪の摂取行動に与える影響を調べた。PI3K 阻害剤投与による検討では、Vehicle 群(0 mM/0.5 μ L/side LY294002)の油脂摂取量は、4 日間経日的に増加したのに対して、LY294002 投与群 (5 mM/0.5 μ L/side および 15 mM/0.5 μ L/side) の油脂摂取量はその増加が見られなかった。また同様に mTOR 阻害剤投与による検討においても、Vehicle 群(0 mM/0.5 μ L/side Rapamycin)の油脂摂取量は経日的に増加したのに対して、Rapamycin 投与群 (15 ng/0.5 μ L/side および 45 ng/0.5 μ L/side) の油脂摂取量はその増加が見られなかった。以上の結果を踏まえると、食脂肪に対する嗜好性には海馬 PI3K/Akt-mTOR シグナル伝達経路が関与しているということが示唆された。

(4) 食脂肪摂取における海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路に対するオピオイド系の関与

マウスにオピオイド受容体拮抗薬の Naltrexone を腹腔内投与し、脂肪溶液摂取時の海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の活性化に変化が見られるかについて検討を行った。Vehicle 群(0 mg/kg body weight Naltrexone)の油脂摂取量は、4 日間経日的に増加が見られたのに対して、Naltrexone 投与群 (0.5 mg/kg body weight および 2.0 mg/kg body weight) の油脂摂取量はその増加が見られなかった。4 日目の溶液摂取終了後におけるマウス脳海馬 Akt および mTOR のリン酸化レベルをウエスタンブロット法にて評価したところ、Akt のリン酸化レベルは 3 群間で統計的に有意な差はなかった。一方、mTOR のリン酸化レベルについては、Naltrexone (2.0 mg/kg body weight) 投与群は、Vehicle 群よりも有意に低い値を示した。

(5) 海馬 μ オピオイド受容体の阻害が油脂の摂取行動に与える影響

マウス両側海馬に選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬の β -Funaltrexamine (β -FNA) を微量投与し、海馬 μ オピオイド受容体阻害が食脂肪の摂取行動に与える影響を調べた。Vehicle 群(0 μ g/ μ L β -FNA)の油脂摂取量は、4 日間経日的に増加が見られたのに対して、 β -FNA 投与群 (10 μ g/ μ L β -

FNA および 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ β -FNA) の油脂摂取量はその増加が見られなかった。以上より、食脂肪に対する嗜好性には海馬 μ オピオイド受容体が関与しているということが示唆された。

本研究結果をまとめると、食脂肪の摂取によって脳海馬神経細胞の PI3K/Akt-mTOR シグナル伝達経路が活性化されること、食脂肪摂取時に見られる海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路の活性化はオピオイド系を介していること、および海馬の μ オピオイド受容体が食脂肪の嗜好性に関与していることが示唆された。また、食脂肪に対する嗜好性はモルヒネ中毒と同様のメカニズムで形成される可能性が考えられた。

本研究により、海馬神経細胞の PI3K/Akt-mTOR シグナル伝達経路は、食脂肪の嗜好性の発現に関与していることが示唆され、高脂肪食品に対する高度な嗜好性の形成・維持のメカニズムの一端が明らかとなった。今後、高脂肪食品の嗜好性のメカニズムがより詳細に明らかとなれば、高嗜好性かつ低カロリーの油脂代替物の開発に応用が可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安達 真一
2. 発表標題 油脂のおいしさのメカニズム
3. 学会等名 日本油化学会 油化学関連シンポジウム in 大阪 油のおいしさとその周辺（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 真一, 小林 賢斗, 近藤 真司, 佐藤 祐介, 吉澤 史昭
2. 発表標題 油脂の嗜好性に対する海馬PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路の関与
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kento Kobayashi, Shin-ichi Adachi, Shinji Kondo, Yusuke Sato, Fumiaki Yoshizawa
2. 発表標題 Possible involvement of PI3K/Akt-mTOR signaling pathway in the hippocampus in the regulation of preference for fat
3. 学会等名 Nutrition 2018 (Boston) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林賢斗, 安達真一, 近藤真司, 佐藤祐介, 吉澤史昭
2. 発表標題 食脂肪の嗜好性における海馬PI3K/Akt-mTORシグナル伝達経路の関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 (東京)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------