

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700747

研究課題名（和文） 食事必須脂肪酸バランスの最適化による健康増進と生活の質向上

研究課題名（英文） Optimization of dietary essential fatty aid balance for health promotion and improvement of life quality

研究代表者

池本 敦（IKEMOTO ATSUSHI）

秋田大学・教育文化学部・准教授

研究者番号：60295615

研究成果の概要（和文）： 食事脂質の量だけでなく質に着目し、n-3系脂肪酸の細胞分化に及ぼす影響を解析した。n-3系脂肪酸のDHAは脂肪細胞分化のマーカー遺伝子の発現を強く抑制した一方で、骨細胞や筋細胞のマーカー遺伝子や長寿遺伝子SIRT1の発現を顕著に促進した。以上より、n-3系脂肪酸は健康増進や生活の質向上に有益であることが示された。こうした知見を活用して、必須脂肪酸バランス（n-6/n-3）やダイエットに関する授業を中学生に実践し、良好な理解が得られた。

研究成果の概要（英文）： We investigated the effect of n-3 fatty acid on differentiation of mesenchymal stem cells. DHA suppressed adipocyte gene expression and promoted expression of marker genes of both myocyte and osteoblast as well as SIRT1. These results indicate the beneficial effect of n-3 fatty acid for health promotion and improvement of life quality. Using these results, we had the home economic classes about essential fatty acid balance and the diet for junior high students, and the favorable outcomes were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：n-3系脂肪酸、 α -リノレン酸、ドコサヘキサエン酸、間葉系幹細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、脂質栄養教育

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴って過去50年間で脂質摂取量が3倍以上に増大し、ガンや心臓病等の生活習慣病が増加した。高カロリー・高脂肪食が肥満・メタボリック症候群や糖尿病へとつながることは、生活者に広く認識され

るようになった。しかし、脂質は摂取量だけでなく質も重要であり、それは構成成分である脂肪酸の種類で決まる。飽和・一価不飽和脂肪酸は必須ではなく、過剰エネルギーの蓄積に関与する。一方、多価不飽和脂肪酸のリノール酸(18:2n-6)と α -リノレン酸(18:3n-3)は生合成されず、必須脂肪酸と定義される。リノール酸必須性は欠乏症（成長・皮膚の

異常)の存在から古くから認識されていた。これは、リノール酸由来のアラキドン酸(20:4n-6)がホルモン様物質に変換され、様々な生理機能を調節するためである。しかし、その作用が強まると炎症や血栓形成・細胞増殖を促進し、生活習慣病の一因となる。一方、 α -リノレン酸は欠乏により学習能が低下することが分かり、その必須性が確立した。また、同じn-3系列のEPA(20:5n-3)やDHA(22:6n-3)は、n-6系列の代謝を競合阻害することで、様々な生活習慣病に対して予防的に作用することが分かってきた。

このように、食生活の中で脂質の栄養学的特性を考える場合、摂取量及び必須脂肪酸バランス(n-6/n-3比)という質的概念の2つが構成要素となる。しかし、摂取量に対する認識が生活者の中で高いのに対して、必須脂肪酸バランスに関しては認識されていないのが現状である。その理由としては、①脳神経系以外でのn-3系脂肪酸の生理機能に関する情報の不足、②高カロリー・高脂肪食が肥満・メタボリック症候群へ進行する過程に及ぼす必須脂肪酸バランスの影響が不明、③生活者に対する食品表示や学習機会等での情報提供の不足、などが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、これらの課題を解決することで、健康増進と生活の質向上のための栄養学的基盤の形成に寄与し、得られた知見を生活者に還元して食生活に生かしていく教育方法論を確立することを目的とする。

まず、必須脂肪酸バランスが筋肉や骨芽細胞の分化にどう影響するのかを解析した。これまでの研究で、DHAが脂肪細胞の分化を抑制することが分かった。脂肪細胞と同様に、筋肉細胞と骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化する。本研究では、DHAをはじめとする多価不飽和脂肪酸がこれらの細胞の分化にどう影響するのかを解析した。さらにn-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸との相互効果や必須脂肪酸バランスの影響を評価した。その際、多価不飽和脂肪酸で活性が制御されることが判明している転写因子やその下流の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

さらに、基礎研究により得られた情報を活用して、必須脂肪酸バランスの重要性に対する認識を生活者の中で高める方法とその実践について検討する。必須脂肪酸バランスと健康との関係を分かりやすく表現した教材の作成とその効果の検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

マウス胎児由来細胞株 C3H/10T1/2、マウス

骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 及びヒト由来肝臓ガン細胞株 HepG2 の培養には、基礎培地として DMEM、マウス頭蓋由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 には α MEM を用いた。いずれも 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した培地で維持し、コンフルエントになった細胞を分化誘導処理した。

C3H/10T1/2 を脂肪細胞に分化誘導する場合、 $10 \mu\text{M}$ Troglitazone、 $1 \mu\text{M}$ Dexamethazone、 $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin を加えて 2 日間培養し、その後、Insulin のみを加えて 2 週間培養した。C3H/10T1/2 を骨芽細胞に分化誘導する場合、 $50 \mu\text{g/ml}$ L-ascorbic acid phosphate M と 10mM Glycerol 2-phosphate を加えて 2 週間培養した。この間も、培地は 3 日に 1 回交換した。C2C12 を筋細胞に分化誘導する場合、10% FBS を 2% ウマ血清に変更し 6 日間培養した。

(2) マウスの飼育及び食餌条件

4 週齢の雄性 ICR 系マウスに、実験用油脂を重量比 10% 添加した無脂肪精製飼料を与えて、12 週齢まで 8 週間飼育した。実験用油脂には、飽和・一価不飽和脂肪酸の豊富な牛脂、n-6 系脂肪酸のリノール酸や γ -リノレン酸の豊富な月見草油、n-3 系脂肪酸の α -リノレン酸の豊富なシソ油、DHA 及び EPA の豊富な魚油の 4 種類を用いた。

(3) 脂質分析

細胞やマウス臓器から Bligh & Dyer 法による脂質の抽出を行い、窒素乾固後、TLC により、リン脂質とトリアシルグリセロールの画分を分取した。TLC から脂質を抽出後、10% HCl-MeOH を加えて 100°C で 1 時間加熱し、脂肪酸メチルエステル誘導体化した。これを石油エーテルで抽出後、ガスクロマトグラフィーで定量分析した。

(4) 遺伝子発現の測定

細胞やマウス臓器から TRIzol (Gibco) を用いて総 RNA を抽出した。その後、Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) キット (タカラバイオ) を用いて mRNA を cDNA に変換した。Real Time-PCR 法による mRNA の定量は SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) キット (タカラバイオ) を使用して、Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) を用いて行った。

4. 研究成果

マウス胎児由来 C3H/10T1/2 細胞を用い、脂肪・骨芽細胞へ分化誘導したときの遺伝子発現に及ぼす影響を解析したところ、n-3 系脂肪酸の DHA は脂肪細胞への分化を抑制したが、分化のマスター転写因子である PPAR γ (図 1) と脂肪細胞特異的脂肪酸結合タンパク質 FABP4 (図 2) の発現は、2 日目の初期

には促進されたが 5~12 日には抑制された。脂肪酸合成酵素 FAS (図 3)、脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 (図 4) 及びアディポネクチン (図 5) の発現は、いずれも強く抑制された。

C3H/10T1/2 細胞を骨芽細胞へ分化誘導した場合、DHA 処理により骨分化のマーカー分子であるオステオカルシン OCN の発現が減少したが、分化のトリガーとなるオステオポンチン OPN の発現は増加した (図 6)。マウス頭蓋骨由来 MC3T3-E1 を用いて検証したところ、DHA は骨芽細胞への分化を濃度依存的に促進し、OCN の発現を低下させ OPN の発現を増加させることが確認された (図 7)。

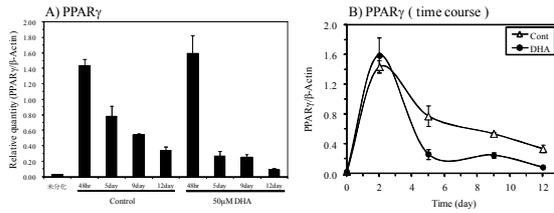


図 1. PPAR γ mRNA 発現に及ぼす DHA の影響

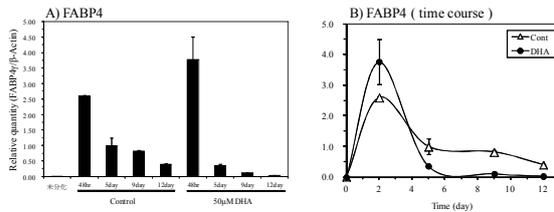


図 2. FABP4 mRNA 発現に及ぼす DHA の影響

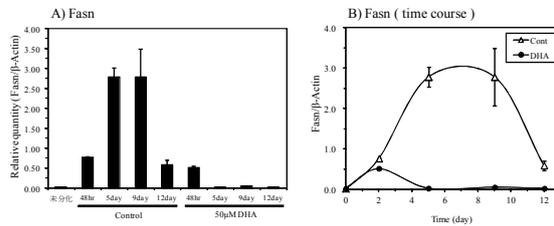


図 3. FAS mRNA 発現に及ぼす DHA の影響

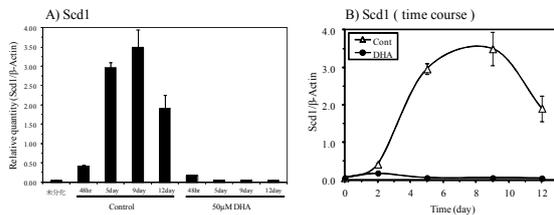


図 4. SCD1 mRNA 発現に及ぼす DHA の影響

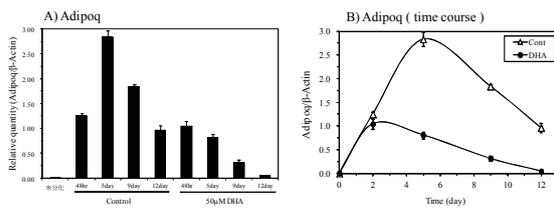


図 5. Adipoq mRNA 発現に及ぼす DHA の影響

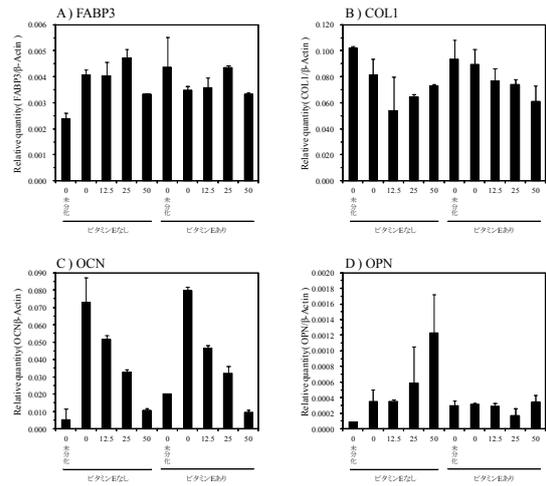


図 6. C3H/10T1/2 骨芽細胞の遺伝子発現に及ぼす DHA の影響

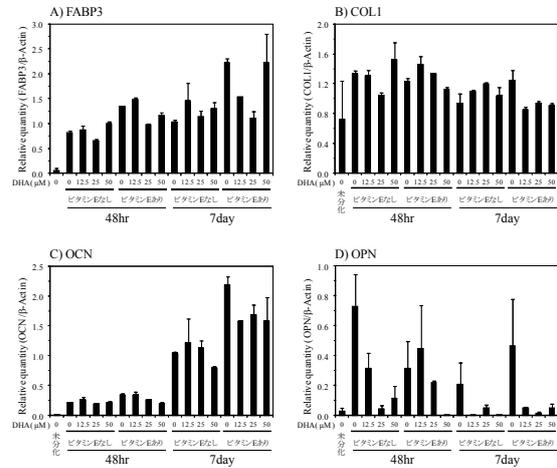


図 7. MC3T3-E1 骨芽細胞の遺伝子発現に及ぼす DHA の影響

マウス骨格筋由来 C2C12 細胞の筋細胞への分化を DHA が促進した。遺伝子発現を解析したところ、DHA 添加により熱産生系遺伝子の UCP2 (図 8)、脂質関連転写因子である PGC-1 α ・ β (図 9) 及び Myod (図 10) の発現が上昇した。

また、同じ n-3 系の α -リノレン酸添加により Myog (図 10) 及び筋融合に必要な遺伝子である Capn1 (図 11) の発現が顕著に上昇した。

個体レベルで確認するためにマウスにおける食餌脂肪酸の影響を見たところ、高 DHA 含量の魚油の摂取で筋組織の重量が有意に増加し、UCP2 (図 12)、PGC-1 α 、PGC-1 β (図 13) 及び Myod (図 14) の発現が上昇した。また、 α -リノレン酸含量の高いシソ油の摂取で Myog (図 14) の発現が顕著に上昇することが示された。

以上のように、n-3 系脂肪酸は遺伝子発現を制御し骨芽細胞への分化を促進すること

が示され、骨粗鬆症などの予防に有益である可能性が示された。同時に筋細胞の分化を促進することから、筋力維持やメタボリック症候群などの生活習慣病の予防に有益であると考えられる。

骨密度や筋力の維持は高齢者にとって、生活の質を高めるために重要な要素であり、これらに n-3 系脂肪酸の摂取が貢献できる可能性が示されたといえる。

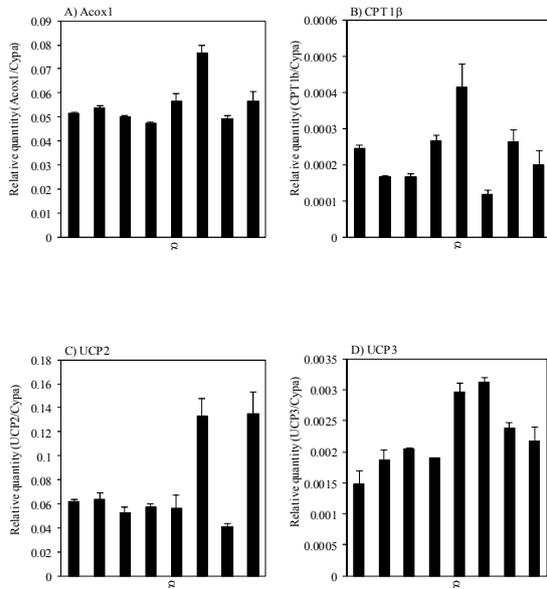


図 8. C2C12 細胞における脂肪燃焼・熱産生系遺伝子の発現に及ぼす各種脂肪酸の影響

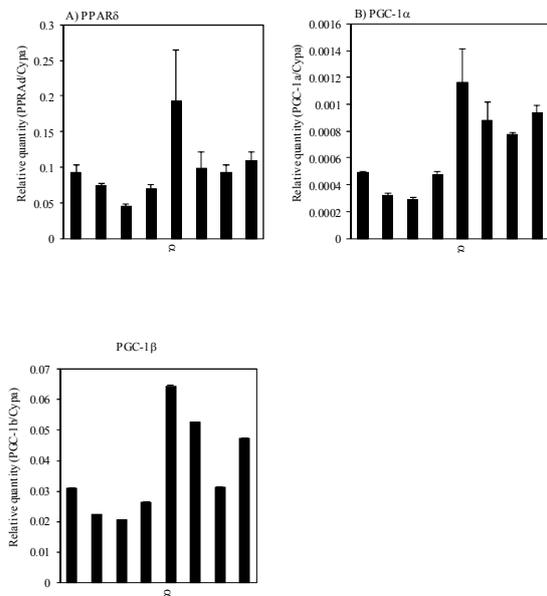


図 9. C2C12 細胞における脂質関連転写因子の発現に及ぼす各種脂肪酸の影響

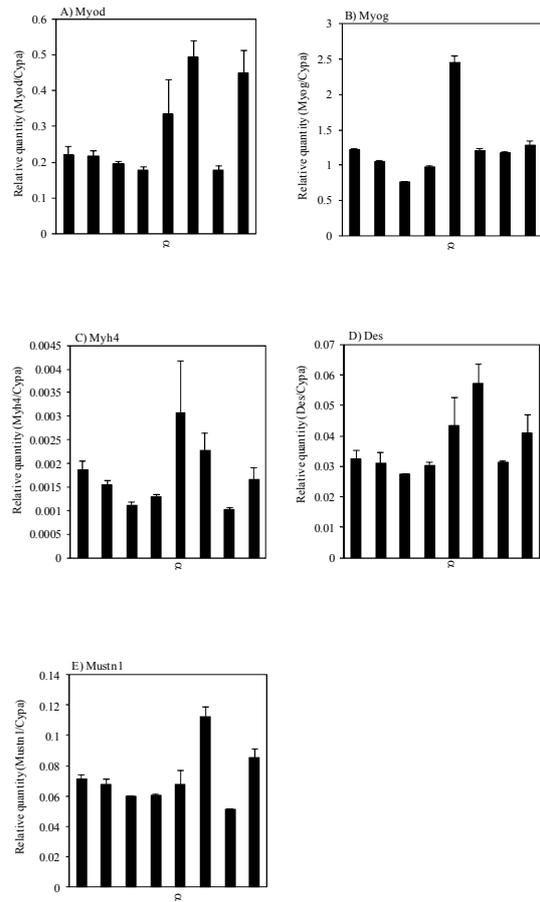


図 10. C2C12

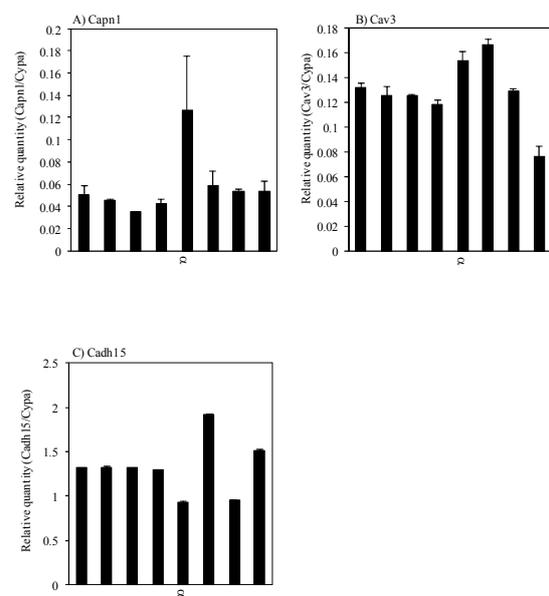


図 11. C2C12 細胞における筋融合に必要な遺伝子の発現に及ぼす各種脂肪酸の影響

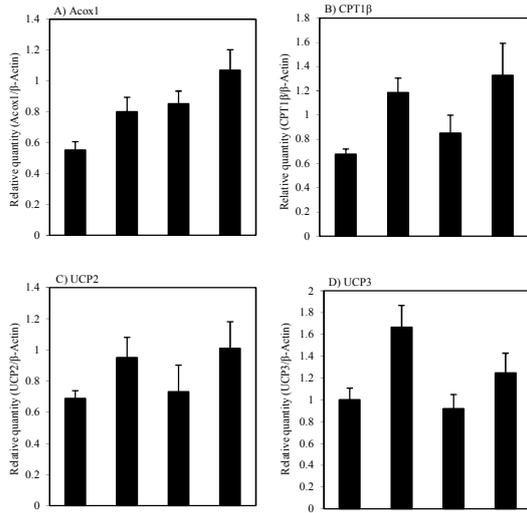


図 12. マウス長指伸筋における脂肪燃焼・熱産生系遺伝子の発現に及ぼす各種油脂の影響

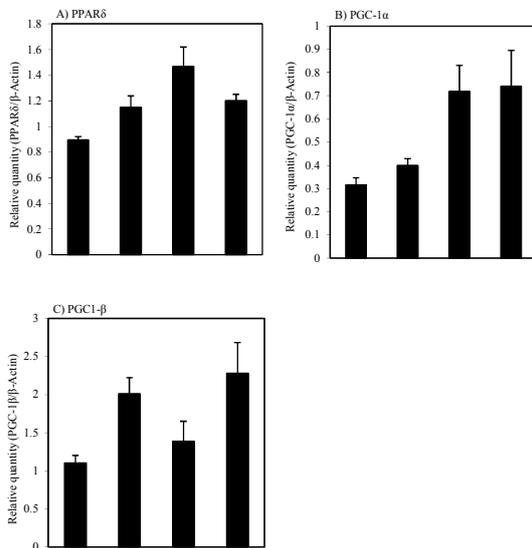


図 13. マウス長指伸筋における脂質関連転写因子の発現に及ぼす各種油脂の影響

SIRT1 は NAD⁺依存的脱アセチル酵素であり、その活性化は、カロリー制限による寿命延長と同等の効果がある。ヒト肝臓由来 HepG2 細胞の SIRT1 mRNA 発現を調べたところ、DHA 処理により上昇することが示された。個体レベルの効果を検証したところ、n-3 系の α-リノレン酸を多く含むシソ油と DHA を多く含む魚油の摂取によりマウスの肝臓の SIRT1 mRNA 発現が促進された。以上より n-3 系脂肪酸は、抗老化・寿命延長作用を有する可能性があると考えられる。

こうした知見を活用して、必須脂肪酸バランス (n-6/n-3) やダイエットに関する授業を中学 3 年生を対象に実践した。適正体重や必要な栄養素と食品の把握、肥満の問題と痩せ

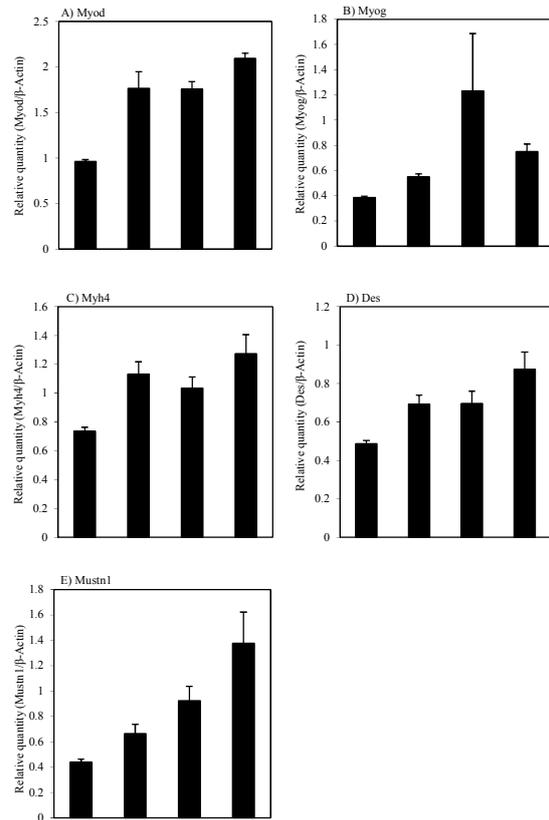


図 14. マウス長指伸筋における筋特異的転写因子の発現に及ぼす各種油脂の影響

すぎによる骨粗鬆症の問題、脂肪酸の質などのポイントを今回の基礎研究の成果の活用して説明し、良好な理解が得られた。

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 4 件)

- ① 池本 敦、脳機能における n-3 系脂肪酸の必須性、脂質栄養学、査読有、21 巻、2012、17-25
- ② 池本 敦、地方産バイオイノベーションの進展と機能性食素材開発、秋田県産フードイノベーション-秋田の食資源を活用した健康食品素材の開発、Food style 21、査読、16 巻、2012、19-22
- ③ 池本 敦、抗アレルギー作用を有する食品成分-地域食資源の探索と必須脂肪酸バランス改善食品の効果、秋田大学教育文化学部研究紀要 (自然科学)、査読無、68 巻、2013、7-16
- ④ 池本 敦、小泉幸央、杉山俊博、佐藤 博、産学官連携による摘果スイカを活用した高血圧予防食品の開発、食品と開発、査読

有、48巻、2013、80-82

〔学会発表〕(計7件)

- ① 池本 敦、佐藤 昂、福田 希、多価不飽和脂肪酸による骨芽細胞の分化制御機構の解析、日本脂質栄養学会第19回大会、2010.9.3、名鉄犬山ホテル(愛知県犬山市)
- ② 池本 敦、シンポジウムⅡ「油脂の微量因子は無視できるか」. アケビ油の特性とその品質に影響を与える微量成分について、日本脂質栄養学会代第79回大会、2010年9月4日、名鉄犬山ホテル(愛知県犬山市)
- ③ 池本 敦、n-3系脂肪酸必須性の基盤及び新たな生理機能に関する研究と新規健康油の開発、日本脂質栄養学会第20回大会、2011.9.2、女子栄養大学(埼玉県坂戸市)
- ④ 池本 敦、皆川友美、草薨麻貴、ドコサヘキサエン酸(DHA)による間葉系幹細胞の分化制御、日本脂質栄養学会第20回大会、2011.9.2、女子栄養大学(埼玉県坂戸市)
- ⑤ 池本 敦、アケビ油及び新規アセチル基含有脂質の開発、秋田応用生命科学研究会第19回講演会、2011.11.25、秋田県総合食品研究センター(秋田県秋田市)
- ⑥ 池本 敦、鎌田友紀、関 愛平、篠村沙弥香、食餌多価不飽和脂肪酸による長寿関連分子 SIRT1 の制御、日本脂質栄養学会第21回大会、2012.9.7、麻布大学(神奈川県相模原市)
- ⑦ 池本 敦、大島かおり、畠山愛美、佐藤亜美、上松 仁、色素細胞特異的転写因子 MITF 抑制作用を有するメラニン色素抑制剤の開発、秋田応用生命科学研究会第21回講演会、2012.12.7、秋田県総合食品研究センター(秋田県秋田市)

〔図書〕(計2件)

- ① 池本 敦、開隆堂、秋田発未来型学力を育む家庭科(望月一枝、佐々木信子、長沼誠子編著)、第2章 つながる力は子どもを変える 食事バランスの改善を目指した脂質栄養教育(pp.90-93)、2011、209
- ② 池本 敦、教育実務センター、生活の発見生きる力をつける学習 未来をひらく家庭科(望月一枝編著)、食べる 授業実践2 脂肪の質を考える(pp.18-19)、2013、207

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

- ① 名称:生理活性組成物、高血圧予防食品及び薬剤、並びにそれらの製造方法
発明者:池本 敦、杉山俊博、濱田文男
権利者: 秋田大学、横手市
種類:特許

番号:特願 2010-257900

出願年月日:2010年11月18日

国内外の別:国内

- ② 名称:ホップ葉抽出物およびその製造方法
発明者:池本 敦、鈴木廣道
権利者:秋田大学、(株)大雄振興公社
種類:特許

番号:特願 2011-14810

出願年月日:2011年1月27日

国内外の別:国内

- ③ 名称:メラニン抑制及び MITF 抑制作用を有する美白用組成物及び抗ガン剤

発明者:池本 敦

権利者:秋田大学

種類:特許

番号:特願 2012-025967

出願年月日:2012年2月9日

国内外の別:国内

- ④ 名称:血糖値低下作用材又はメタボリック症候群改善作用材

発明者:池本 敦、鈴木廣道

権利者:秋田大学、(株)大雄振興公社

種類:特許

番号:特願 2012-168554

出願年月日:2012年7月30日

国内外の別:国内

- ⑤ 名称:小眼球症関連転写因子抑制剤、メラニン産生抑制剤、化粧品組成物及び抗ガン剤

発明者:池本 敦、上松 仁

権利者:秋田大学、国立高等専門学校機構

種類:特許

番号:特願 2013-074373

出願年月日:2013年3月29日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

池本 敦 (IKEMOTO ATSUSHI)

秋田大学・教育文化学部・准教授

研究者番号:60295615