

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350138

研究課題名(和文)トランス脂肪酸により誘導される炎症性反応の解析とその抑制法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the process of inflammatory response induced by trans fatty acids and development of the suppression method

研究代表者

加納 和孝 (KANOU, Kazutaka)

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：70111507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】トランス脂肪酸(TFA)の高摂取は心血管疾患、動脈硬化症のリスクを高める。今回の研究は、工業的TFAであるエライジン酸(EA)の動脈硬化誘導作用を解析した【方法】実験にはヒト乳癌由来YMB-1-E細胞及びヒト単球由来U937細胞を用いた【結果】EAは、抗動脈硬化たんぱく質アディポネクチン発現を強く抑制した。EAはPMA刺激U937細胞のdishへの接着、分化抗原CD68、CD147、TNF- α の発現、脂質蓄積、及び食作用を促進した。阻害剤による実験からEAはTLR4を介して、上記の様な動脈硬化性変化を進めることが示された。この事はTLR4制御による発症抑制の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：【Aim】High intake of trans fatty acid (TFA) increases the risk of cardiovascular disease and atherosclerosis. This study analyzed the mechanism of atherosclerosis induction by elaidic acid (EA), which is a component of industrially produced TFA. 【Methods】Human breast carcinoma-derived YMB-1-E cells and human monocytic leukemia-derived U937 cells were used for the experiments. 【Results】EA strongly suppressed the anti-arteriosclerosis protein adiponectin expression. EA promoted in PMA-stimulated U937 cells, expression of differentiation marker antigens CD68 and CD147, expression of TNF- α , lipid accumulation and activation of phagocytosis. Experiments with TLR4 inhibitors indicated that elaidic acid exacerbates atherosclerotic changes via TLR4 signal transduction pathway. These facts suggest the possibility to suppress the development of pathogenesis of atherosclerosis by control the function of TLR4.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：トランス脂肪酸 アテローム性動脈硬化症 TNF- α Toll様受容体4 アディポネクチン 食作用 エライジン酸

1. 研究開始当初の背景

平成 22 年 10 月 30 日の朝日新聞にトランス脂肪酸について以下のような記事が掲載されていた。世界保健機関はトランス脂肪酸を一日の総カロリーの 1%未満に抑えることを勧めているが、日本の国内の調査では 30 代の女性の 33%、40 代の女性の 38%がこの基準を超えていた。マーガリン、ショートニングを使ったお菓子の影響が疑われるという。日本の食品安全委員会によると日本人の摂取量は一日平均 0.7~1.3g として一日の総カロリーの 0.3~0.6%ほどと推定している。諸外国に比べて低レベルで影響は少ないとしているが、若い人の摂取量が増えていると見て、さらに調査を続けるとの記事である。

なぜマーガリン、ショートニングを原材料とする菓子類が健康に悪影響を与えるのであろうか。それはこれら製品が、植物性油脂（不飽和脂肪酸）に人工的に水素を添加して液状の油脂を固化させた硬化油脂、脱臭あるいは透明度の向上などの目的のために高温で精製された植物性油脂（市販大豆油、コーン油、米油、なたね油、綿実油など）を原料としており、加熱、化学反応過程で発生したトランス脂肪酸が多く含まれていることが分かってきたからである。

最近になって、トランス脂肪酸は心疾患のリスクが高いと言われる飽和脂肪酸よりも、悪影響が大きいことが報告された。さらにトランス脂肪酸はコレステロール代謝に影響を与えることも報告された。トランス脂肪酸は LDL を上げ、HDL を下げ、心筋梗塞などの発症リスクを高くするとされ、アメリカでの疫学調査によれば、トランス脂肪酸の摂取量が多いグループは、心臓疾患の発症率が高くなり、糖尿病のリスクも増加することもわかっている。トランス脂肪酸の摂取量が多く、心筋梗塞の問題が深刻な米国などでは、より強い対策が必要ということで、規制も行われるようになってきている。

しかしながら現在までの研究のほとんどは疫学研究により導かれたものであり、生化学的解析は見られなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は平成 20 年度~平成 22 年度で「トランス脂肪酸が誘発する低アディポネクチン症の機構の解明」という課題で科学研究費（基盤研究 C 課題番号：20500719）を受領し、トランス脂肪酸の中で、人工的な操作で生成し量的にも多いと言われるエライジン酸の細胞に与える影響について研究を行ってきた。日本で確立されたヒト乳がん由来 YMB-E-1 細胞を用いた実験により以下のようなことを明らかにした。エライジン酸はアディポネクチンの mRNA およびたんぱく質の産生を抑制する。これは動脈硬化発症を抑制している体の機構が損傷を受けるということに他ならず重要な生化学的知見である。

しかしながらエライジン酸の効果については、未確認の作用がある可能性がある。事実現までの研究で TFA が、動脈硬化、インスリン抵抗性、血中脂質濃度などに悪影響を与えていることが報告された。動脈硬化に関連する TFA の作用については、LPS あるいは TNF- α により亢進した vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) 及び intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) 合成をエライジン酸が維持すること、また TFA が活性酸素種 (ROS) 依存的に NF- κ B を活性化することなどが報告されているが、詳しい解析は行われていない。今回、細胞モデルとして Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理により、マクロファージへの分化能を有するヒト単球由来株 U937 細胞を用いて、エライジン酸がマクロファージへの分化と食作用を促進する可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト単球由来U937細胞は、理研バイオリソースセンターより購入した。U937細胞（ 2.5×10^5 個/2 ml）を35mm dishに播種し、 37°C 、5%CO₂ 環境下で5% ウシ胎児血清（FBS）及び抗生物質を含むRPMI 1640培地で培養した。

接着細胞数の測定

U937細胞にPMAを添加した後、さらにエライジン酸、あるいはオレイン酸を添加し、72時間後に接着細胞数と浮遊細胞数をCountess FL自動セルカウンター（Life Technology）を用いて測定した。

免疫蛍光染色法によるCD68及びCD147

発現の解析

U937細胞にPMAを添加し、さらにエライジン酸、あるいはオレイン酸を加え培養した。72時間後に接着細胞を同様に剥離した後、PBSで洗い、抗CD68抗体（FITC付加）、あるいは抗CD147抗体を加えて暗所室温で3時間反応させた。抗CD147抗体を用いた場合、二次抗体として抗マウスIgG（Fab specific）F（ab'）₂フラグメント-FITCを添加した。蛍光の確認はそれぞれCountess FL自動セルカウンターを用いて行った。

ラテックスビーズを用いた食作用の解析

FITC 標識したウサギ IgG でコートされたラテックスビーズは Cayman より購入した。エライジン酸、オレイン酸をそれぞれ添加し、2 時間後に製品プロトコールに従いラテックスビーズを培養液に加えた。さらに、70 時間後蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。

4. 研究成果

エライジン酸によるPMA処理U937細胞の接着性の亢進

浮遊細胞であるU937細胞にPMAを処理すると数時間後にdishへの接着性を示し始める。72時間後でも未処理の細胞の接着性は認められないが、PMA処理群では器底に一層の細胞が接着した。一方、PMA + エライジン酸処理群、

PMA + オレイン酸処理群では、細胞は塊状の形態を示し、細胞の重層が認められた。PMAとエライジン酸を処理した場合、オレイン酸の処理に比べて、塊の大きさがやや大きくなる傾向が認められた。72時間後のPMA処理群、あるいはPMA + オレイン酸処理群の接着細胞数は、未処理群の約50%であった。それに比し、PMA + エライジン酸処理群では接着細胞数が約80%に増加した。

エライジン酸によるPMA処理U937細胞のマクロファージへの分化の促進

PMA処理したU937細胞にエライジン酸添加を行い、マクロファージ分化マーカーCD68発現を検討した。PMA処理群を100%として比較すると、PMA+エライジン酸処理によりCD68陽性細胞数は約4倍に増加した。一方、PMA+オレイン酸処理では約1.3倍の増加が認められた。

また、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）誘導因子として知られる CD147 陽性細胞数は、PMA+エライジン酸処理ではPMA 処理群の約 2 倍に増加した（ $p < 0.01$ ）。一方、PMA+オレイン酸処理では有意な減少が認められた（ $p < 0.05$ ）。

エライジン酸によるPMA処理U937細胞における食作用の亢進

次に、エライジン酸が食作用を促進する可能性を検討した。PMA処理U937細胞では、ラテックスビーズを取り込んだ細胞数がエライジン酸処理により約2倍に増加した。一方、オレイン酸処理では食作用の亢進は認められなかった。

近年、多くの疫学研究から、TFAの過剰摂取は、アテローム性動脈硬化を含む心血管障害の様々な病態と関連していると考えられてきた。その原因として、エライジン酸が酸化を阻害すること、エライジン酸を含むHDLがヒト皮膚由来細胞の老化を促進し強い炎症誘導作用を持つこと、TFAがATP-binding cassette type A-1（ABCA-1）発現を抑制することによりマクロファージのコレステロールを上昇さ

せることなどの報告がある。さらに、最近TFAがTNF- α 、IL-6、CRP等の炎症性たんぱく質及びTNF受容体を誘導することも明らかにされた。しかしながら、TFAの動脈硬化を惹き起こす作用機序についての解析は進んでいない。

今回の研究では、エライジン酸あるいはオレイン酸がPMAで刺激を与えたU937細胞の分化に及ぼす影響を解析した。エライジン酸はPMA処理U937細胞の接着性を亢進したが、オレイン酸にはその作用は認められなかった。エライジン酸とオレイン酸では、誘導するアディポカイン、マイオカインあるいは接着分子たんぱく質が異なることが報告されている。CD68はマクロファージ系細胞に幅広く発現するクラスDスカベンジャー受容体で、酸化LDLの貪食に関与する。CD147は、各種のストローマ細胞に高発現し、動脈硬化プラークの不安定化と強い関連性が疑われているMMPの誘導因子である。また、シクロフィリン受容体として知られ、白血球のCD147刺激は動脈硬化、肺疾患、リウマチ、心臓病などに関連する様々な炎症反応を亢進する。PMA処理U937細胞を用いてエライジン酸、あるいはオレイン酸によりこれらのたんぱく質発現を蛍光抗体法で調べた結果、CD68及びCD147陽性細胞がエライジン酸処理後72時間で有意に増加した。このことは、PMA処理U937細胞の分化がエライジン酸により促進されMMPが誘導される可能性を示している。また、CD147はU937細胞の細胞間接着やフィブロネクチンに対する接着を仲介する分子の1種である。PMA処理U937細胞の細胞間やdishへの接着性がエライジン酸により高まる。オレイン酸によるCD68発現誘導はエライジン酸と比べ有意に低く、またCD147発現の抑制が認められることから、その作用はエライジン酸と異なると考えられる。さらに、CD68発現が貪食活性に関連することに加え、J774マクロファージにCD147をトランスフェクトすると、貪食活性が上昇することが報告されている。

そこで、蛍光抗体を結合させたラテックスビーズを用いてエライジン酸処理細胞の貪食活性を調べたところ、ラテックスビーズを取り込んだ細胞数はエライジン酸処理で有意に増加した。以上の結果は、エライジン酸がPMA処理U937細胞に対してマクロファージへの分化を促進し、食作用を亢進する可能性を示すと考えられる。また本実験に用いているエライジン酸の濃度については、トランス脂肪酸を摂取したアメリカ人男性の血中濃度が38 μ Mであったとの報告があり、とりわけ高濃度のエライジン酸を用いているわけではない。

今回の実験の結果は、エライジン酸がマクロファージへの分化を誘導し、さらに貪食能を活性化する可能性を示していると考えられる。本研究はヒト単球由来U937細胞を用いてエライジン酸が動脈硬化の発症過程に重要なマクロファージの活性化に関与することを初めて示唆したものである。また阻害剤を用いた実験からエライジン酸はTLR4を介してアテローム性動脈硬化症のリスクを高めることが示唆された。これまで細菌感染による動脈硬化発症には最近の細胞膜の成分であるLPSが重要な役割を果たして、LPSの細胞側受容体がTLR4であることが確認されている。驚くことに、エライジン酸はLPSと同じ情報伝達系を介して動脈硬化を引き起こすことが本研究で示された。通常身体の中で100 μ Mの濃度のエライジン酸が存在する可能性は殆どないと思われるが、低濃度での長期に渡るトランス脂肪酸の曝露による健康障害についての詳細な研究は行われていない。トランス脂肪酸の濃度、曝露期間についてさらなる研究が必要である。本研究でエライジン酸はTLR4を介して動脈硬化を引き起こすことが明らかとなった。このことはTLR4を制御することによりエライジン酸による動脈硬化発症を抑制できる可能性を示したものである。

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 2件)

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(1): 44-53、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(1): 54-59 査読あり

[学会発表](計 7件)

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 情報伝達系を介してアディポネクチン発現を抑制する、第 24 回日本油脂栄養学会、2015 年、佐賀県佐賀市

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、福岡県福岡市

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- α を増加させアディポネクチン発現を抑制する、日本臨床栄養学会 第 13 回大連合大会、2015 年、東京都千代田区

岩崎有希、横山嘉子、加納和孝、エライジン酸は TLR-4 を介して TNF- α を増加させアディポネクチン発現を抑制する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年、京都府京都市

島倉みずき、岩崎有希、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に対するレスベラトロールの影響、第 60 回日本栄養改善学会学術総会、2013 年、兵庫県神戸市

中莖英里香、横山嘉子、加納和孝、インスリン受容体 mRNA の発現と受容体タンパク質に及ぼすトランス脂肪酸の影響、第66回日本栄養食糧学会大会、2012年、宮城県仙台市

岩崎有希、小玉聖恵、中莖英里香、横山嘉子、加納和孝、アディポネクチンの発現に対するエライジン酸の影響、第66回日本栄養食糧学会大会、2012年、宮城県仙台市

[図書](計 1件)

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・布木和夫共著、建帛社、人体の構造と機能及び疾病の成り立ち 1 管理栄養士生化学教科書、2016年、216^頁-^頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

岩崎有希 (IWASAKI, Yuki)
人間総合科学大学・人間科学部・助手
研究者番号：60762078