

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504005

研究課題名(和文) 脂肪酸の組み合わせによる脂肪毒性誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of lipotoxicity induced by fatty acids

研究代表者

北浦 靖之 (KITAURA, Yasuyuki)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90442954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：遊離脂肪酸(FFA: free fatty acid)は脂肪毒性を有していると考えられているが、その効果は鎖長と二重結合の数により異なる。本研究では、FFAの組み合わせによる細胞毒性の変化、がん抑制効果、アミノ酸代謝への影響について解析を行った。その結果、FFAの組み合わせにより、細胞内へのFFAの取り込みが変化することで、脂肪毒性が変化すること、また、新たながん抑制効果を示すFFAの組み合わせの一つを見いだした。さらに新たなFFAの作用機構として、アミノ酸代謝への影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Free fatty acid (FFA) has been reported to induce cell death (lipotoxicity), but the effect depends on the carbon chain length and number of double bonds. In this study, we found that the lipotoxicity and influx rate of FFA were changed by their combinations. We also identified one of the anti-cancer FFA combination, and revealed the effect of FFA on amino acid catabolism.

研究分野：栄養生化学

キーワード：脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

脂肪毒性は酸化ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常などを引き起こすことにより細胞死や炎症反応などを誘発し、組織特異的なインスリン抵抗性を引き起こす原因とされている。そのため、内臓脂肪の過剰蓄積がメタボリックシンドロームの診断基準となっており、脂肪蓄積の結果生じる脂肪毒性の分子機構の解明は最も重要な課題である。

この脂肪毒性を有するのは主に遊離脂肪酸 (FFA: free fatty acid) と考えられている。過剰な脂肪を蓄積するために脂肪組織は肥大化するが、一定の限度を超えると他の組織でも脂肪の蓄積が起こり、それに伴い FFA が過剰に放出され、血中・組織での FFA 濃度の増加がみられる (Nat. Rev. MCB (2007) 9: 367-77)。そのため様々な細胞に対して脂肪毒性を発揮し、インスリン作用やインスリン分泌を阻害することで糖・脂質代謝異常をきたすと考えられている。

FFA の作用機構は様々であり、自身の両親媒性による界面活性作用による細胞溶解のほか、TLR (Toll-like receptor) を介した炎症反応の誘発 (Science (2007) 316:1632-4)、セラミドなど代謝産物の関与 (Cell (2011) 147:173-84) や細胞膜の脂肪酸組成の変化による細胞内シグナル (細胞死誘導、生存シグナル、小胞体ストレス) (Nature (2011) 473: 528-31) などが報告されている。その脂肪毒性のため余剰な FFA はグリセロール 3-リン酸とエステル結合し、毒性の低いトリグリセリド (TG: triglyceride) として脂肪滴に存在し、必要に応じて TG から FFA に変換されエネルギー源や脂質メディエーターの前駆体として機能する。

FFA は鎖長や不飽和度の違いにより多数の分子種が存在する。鎖長 (炭素数) が 4 以下は短鎖、6~12 は中鎖、14 以上は長鎖と分類され、さらに分子内に二重結合を持つ不飽和と持たない飽和脂肪酸に分類される。また、不飽和脂肪酸は二重結合がメチル基側から 3 番目の炭素の位置にあるものが「n-3 系」、6 番目にあるものが「n-6 系」に分類される。近年、FFA の濃度変化だけでなく、その組成の変化とメタボリックシンドロームとの間に密接な関係があると指摘されているが、その詳細なメカニズムに関する情報はほとんどないのが現状である。

一般に「長鎖の飽和脂肪酸 (パルミチン酸など)」や「n-6 系不飽和脂肪酸 (アラキドン酸など)」は脂肪毒性が高いのに対し、「n-3 系不飽和脂肪酸 (エイコサペンタエン酸 (EPA) など)」や「オレイン酸」はその脂肪毒性を抑制することが知られている。一方、「中鎖の飽和脂肪酸 (カプリン酸やラウリン酸など)」は長鎖飽和脂肪酸に比べ脂肪毒性はほとんどないと考えられていたが、本研究室における *in vitro* での培養細胞を用いた実験で、「中鎖飽和脂肪酸 (カプリン

酸、ラウリン酸) に不飽和脂肪酸 (オレイン酸) を加えると、その細胞死誘導効果が著しく高められる」という現象を見いだした。この現象は脂肪毒性の低い脂肪酸でも組み合わせにより脂肪毒性が高まることを示しており、肥満に伴う FFA の「質の変化」によるこのような脂肪毒性の変化が炎症反応・インスリン抵抗性を引き起こす可能性が考えられる。しかし、肥満により血中および組織中の FFA の上昇はよく知られているが、脂肪酸組成、特に中鎖脂肪酸に関する情報は少なく不明な点が多い。

2. 研究の目的

上記の研究開始当初の背景から、培養細胞を用いた *in vitro* における様々な FFA の組み合わせによる脂肪毒性の変化を検証し、その作用メカニズムを解明すること、肥満に伴う血中・組織内 FFA 組成の変化との関連性について総合的に解析することで、新たなメタボリックシンドロームの危険因子としての「FFA プロファイル」を同定することを目的とした。また、FFA の組み合わせによる脂肪毒性の変化を利用して、FFA の組み合わせによるがん抑制効果について検証することを目的とした。さらに、近年、メタボリックシンドロームにおける血中アミノ酸濃度の変化、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA: branched-chain amino acid) 濃度の上昇が、FFA の増加とともにメタボリックシンドロームの危険因子として報告されている (Nat. Rev. Endocrinol. (2014) 99: 4730-9)。そこで、FFA の新たな作用機構として、BCAA 代謝に注目し、FFA 投与による BCAA 代謝への影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた *in vitro* における様々な FFA の組み合わせによる脂肪毒性の変化を検証するため、使用する細胞として肝細胞 (HepG2) を用いた。HepG2 細胞を一定の細胞数となるように調整し、FFA (17 種) を単独または 2 種類を組み合わせたものを細胞に作用させ、一定期間培養を行った後、生細胞検出試薬 (MTT) を加え、生細胞数を測定し、それぞれ被験物質に対する生存率を調べた。さらに細胞死誘導メカニズムについて、放射性同位体 ^{14}C でラベルした FFA を用いて、ラベル化していない FFA と組み合わせたものを細胞に作用させ、一定期間培養を行った後、細胞を回収し、 ^{14}C の放射線量をシンチレーションカウンターで測定することで、FFA の細胞内への取り込み量を解析した。

FFA の組み合わせによるがん抑制効果について検証するため、がん細胞 (HT1080)、正常細胞 (MRC5) を用いて、*in vitro* での細胞死誘導効果について上記と同様に検証した。また、腹水がん細胞 (Ehrlich) を腹腔内に移植したマウスを用いて、がん細胞に対して細胞死誘導効果の強い FFA の組み合わせをが

ん細胞移植マウスに5日間投与し、がん細胞増殖抑制効果について解析した。

さらに、FFAのBCAA代謝に対する影響について調べるため、ラットにFFAを投与し、血中BCAA濃度変化および肝臓でのBCAA代謝の律速酵素である分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素(BCKDH: branched-chain α -keto acid dehydrogenase)の活性などを測定した。また、ラットにコーン油を投与した後、ヘパリンを投与することで血中のFFA濃度を増加させ、血中BCAA、インスリン濃度変化、および肝臓でのBCKDHの活性などを測定した。

4. 研究成果

FFA(17種)を単独または2種類を組み合せ、細胞に作用させ、細胞死誘導効果について調べた結果、細胞毒性の強い長鎖の飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸などの他、n-6系の不飽和脂肪酸であるリノール酸の細胞死誘導効果が、不飽和脂肪酸の1種であるオレイン酸により抑制された。また、放射性同位体 ^{14}C でラベルしたFFAを用いて、FFAの細胞内への取り込み量を測定した結果、中鎖の飽和脂肪酸であるラウリン酸と組み合わせることにより、それぞれFFAの細胞内への取り込みが増加した。一方、長鎖の不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、細胞毒性が強い長鎖の飽和脂肪酸であるパルミチン酸よりも細胞内への取り込まれる量が多いことを見いだした。以上のことから、細胞毒性の低いFFAがラウリン酸によりその毒性効果が増強され、細胞毒性のある脂肪酸がオレイン酸により抑制されるが、それぞれ脂肪酸の流入を亢進、拮抗することによりその効果が引き起こされることが示唆され、ラウリン酸の割合が高く、オレイン酸の割合が低いFFAプロファイルが危険因子の一つとして同定された。

FFAの組み合わせによるがん抑制効果について検証した結果、ラウリン酸と長鎖のn-3系不飽和脂肪酸である α -リノレン酸との組み合わせは、正常細胞では生存率に変化は見られなかったが、がん細胞に対して強力に細胞死を誘導した。さらに、このFFAの組み合わせをがん細胞移植マウスに投与した結果、顕著ながん抑制効果が見られた。以上のことから、このFFAの組み合わせは新たながん治療法の一つとして期待できる。

FFAのアミノ酸代謝に対する影響について調べた結果、ラットに中鎖脂肪酸であるオクタン酸を投与すると、血中のBCAAの濃度が低下し、肝臓でのBCKDHの活性が上昇した。また、ラットにコーン油を投与した後、ヘパリンを投与した結果、血中のFFA濃度が上昇するとともに、血中のBCAA濃度、インスリン濃度も上昇し、それに伴い、肝臓でのBCKDHの活性が低下した。コーン油は長鎖の不飽和脂肪酸であるリノール酸、オレイン酸が主成分であり、これらのFFAの上昇がBCAA代謝を抑制し、血中BCAA濃度を上昇

させたことが考えられる。以上のことから、メタボリックシンドロームにおける血中BCAA濃度の変化はFFA、特にリノール酸、オレイン酸の上昇による肝臓BCKDH活性の低下により引き起こされる可能性が示唆された。また、オクタン酸は血中BCAA濃度を低下させることで、メタボリックシンドロームの予防に有効である可能性が示唆された。

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2件)

Enhanced oleate uptake and lipotoxicity associated with laurate.

Kitaura Y, Inoue K, Kato N, Matsushita N, Shimomura Y.

FEBS Open Bio. 2015 May 29;5:485-91

Octanoic acid promotes branched-chain amino acid catabolisms via the inhibition of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase in rats.

Kadota Y, Toyoda T, Hayashi-Kato M, Kitaura Y, Shimomura Y.

Metabolism. 2015 Sep;64(9):1157-64.

〔学会発表〕(計2件)

北浦 靖之, 井上 花菜, 河東 直規, 松下 なほみ, 下村 吉治

ラウリン酸とオレイン酸の組合せによる細胞死誘導促進効果の解析

第68回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学 2014年5月

門田 吉弘, 豊田 隆成, 加藤 真由美, 北浦 靖之, 下村 吉治

中鎖脂肪酸による分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝の制御:オクタン酸によるBCAA代謝亢進作用

日本アミノ酸学会 第8回学術大会 東京農業大学 2014年11月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nutr/shimomura/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北浦靖之(KITAURA, Yasuyuki)

名古屋大学大学院生命農学研究所・助教

研究者番号：90442954

(2)研究協力者

下村吉治 (SHIMOMURA, Yoshiharu)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：30162738

門田吉弘 (KADOTA, Yoshihiro)
名古屋大学大学院生命農学研究科・研究
員
研究者番号：10724776