

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461524

研究課題名(和文) 母乳栄養による肥満発症抑制機序：脂肪細胞と腸管内分泌細胞への複合作用の解明

研究課題名(英文) The suppressive effect of breast feeding on the progression of obesity: the combined action in adipocytes and gut endocrine cells

研究代表者

藤澤 泰子 (FUJISAWA, YASUKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40402284

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)：本研究では、母乳中の主要な脂質である長鎖不飽和脂肪酸(PUFA)であるリノール酸(LA)・リノレン酸(ALA)・アラキドン酸(AA)・ドコサヘキサエン酸(DHA)に着目し、これらの単独または混合による3T3-L1脂肪細胞への添加実験を行い、以下の結果を得た。1 LA、ALA、AA、および DHAは、成熟脂肪細胞3T3-L1でのSCD1遺伝子発現を抑制する。2 異なったPUFAは、SCD1発現抑制に関して相乗効果を示す。3 この抑制効果は少なくとも一部はPPAR $\gamma$ 依存性である。今後はメカニズムの解明のため、網羅的遺伝子発現解析およびリポミクス解析を検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on the major polyunsaturated fatty acids(PUFAs) in human breast milk: linoleic acid(LA), alpha-linolenic acid (ALA), arachidonic acid (AA), and docosahexaenoic acid (DHA) in views of the effect of breast feeding on the lipid metabolism in baby. All experiments were performed using 3T3-L1 adipocyte cell line. Our results are as follows: 1. All PUFA (LA ALA AA and DHA) suppressed the gene expression of SCD1 gene. SCD1 is the lipogenic gene and the suppression of SCD1 could inhibit the progression to metabolic disorders including insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome. 2. the mixture of multiple PUFA (e.g. LA and AA, or ALA and AA) suppressed SCD1 gene expression synergistically 3 Some part of the suppressive effect by PUFAs is depend in PPAR $\gamma$  pathway. We plan to proceed comprehensive gene expression analysis and lipidomic studies analysis to figure out the mechanism of PUFA induced SCD1 suppression.

研究分野：小児科 小児内分泌

キーワード：脂肪細胞 母乳 PUFA SCD1 リポジェネティック遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

胎児期から生後早期の環境は、児の成長後の疾病発症に關与する「Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)」という概念は広く支持されている。ほとんどの哺乳動物において、多くの器官の発生は胎児期に完了せず出生後早期まで継続する。よってDOHaD学説においては、生後早期は胎児期と同様の“疾病感受期”であり、この時期の栄養の選択は、複数の器官に作用して成長後も継続する変化をおこす(=プログラミング)と考えられている。特に、母乳栄養が成長後の肥満やメタボリックシンドロームの発症を減らすことは疫学的研究の集積により強く支持されている(Armstrong *Lancet* 2002, Yamanaka *JAMA Pediatr* 2013)。しかしこれに関する基礎的研究はほとんどなくメカニズムは明らかではない

## 2. 研究の目的

研究開始当初の目的は「母乳栄養による児の成長後の肥満およびメタボリックシンドローム(糖尿病、高血圧、脂質異常)の発症抑制効果は、母乳中の生理活性物質が脂肪細胞と腸管内分泌細胞の両者に複合的に作用することにより発揮される」ことを検証し、そのメカニズムを解明することであった。準備実験を進めていくなかで、母乳から抽出した脂質には、人工乳から抽出した脂質には認められない、リポジェニック酵素 SCD1 の抑制効果があることが明らかとなった。ノックアウトマウスなどによる研究から、SCD1 の機能抑制は、メタボリック症候群を代表とする生活習慣病に対して抑制的に働くことが報告されている。そこで、本研究では、母乳中の主要な脂質である長鎖不飽和脂肪酸(PUFA)であるリノール酸(LA)とリノレン酸(ALA)、母乳に含まれており近年人工乳にも添加されるようになったアラキドン酸(AA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)に着目し、脂肪細胞におけるリポジェニック酵素への効果を、培養細胞系にて検証することを、主要な実験項目とした。

## 3. 研究の方法

長鎖不飽和脂肪酸(LA)・リノレン酸(ALA)・アラキドン酸(AA)・ドコサヘキサエン酸(DHA)を単独または混合し、3T3-L1 脂肪細胞に添加し、遺伝子発現変化およびたんぱく発現の変化を確認した添加実験を行った。**実験1**: 分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞に LA、ALA、AA、および DHA を 1、10、50、100 $\mu$ M の濃度で添加し 48 時間後に回収して RNA を抽出し qPCR にて SCD1・FAS・SREBP1 の遺伝子発現を解析した。**実験2**: 次に LA/LN と AA との複合効果を検討するために、LA または LN: 90  $\mu$ M と AA: 10  $\mu$ M との混合脂肪酸による添加実験を行った。**実験3**: ここまでに確認された PUFA による SCD1 遺伝子発現の抑制が、PPAR 依存性かどうかを、siPPAR $\gamma$  による knock-down により確認した。分化誘導後 7 日の成熟脂肪細胞 3T3-L1 adipocytes に siPPAR $\gamma$  をトランスフェクションし、48時間後に LA, AA, ALA, または DHA を 100  $\mu$ M の濃度で添加し 48 時間インキュベーションし、細胞より RNA を抽出し SCD1 mRNA 発現を qPCR にて解析した。

## 4. 研究成果

実験1: SCD1 遺伝子発現は、100 $\mu$ M LA 添加ではコントロール(Ctrl)の 70%まで

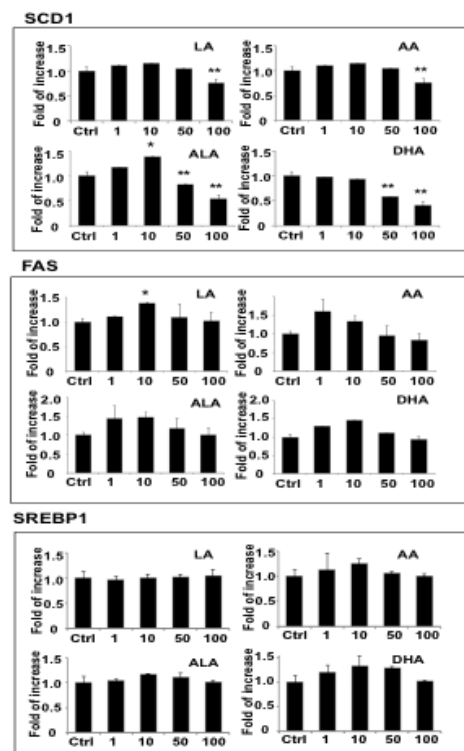
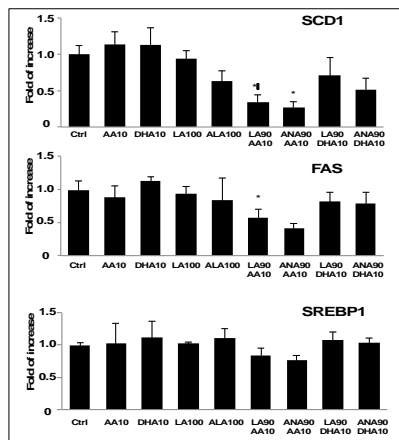


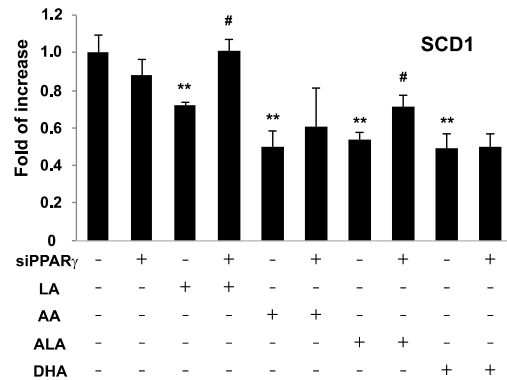
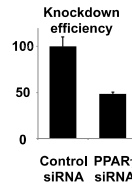
Figure 1

抑制され、ALA 添加では 100 $\mu$ M にて 42%まで抑制する効果を認めた。AA の添加実験では 10 $\mu$ M にて SCD1 遺伝子発現に変化を来さなかったが、50 $\mu$ M では 8% (比 Ctrl) 100 $\mu$ M では 6%まで低下する強い抑制効果を確認した。しかし、その他のリポジェニック酵素である FAS・SREBP1 には上記の脂肪酸は明確な抑制効果を示さなかった (Figure 1)。

**実験 2 :** LA ( 90 $\mu$ M)+ AA (10 $\mu$ M)での刺激では SCD1 遺伝子発現は 33%に抑制された。同様に LN ( 90 $\mu$ M) + AA (10 $\mu$ M)での刺激は 27%に抑制した。これは、それぞれ単独の処理による抑制効果の和よりも強い効果であり、相乗効果が確認された。ウエスタンブロットングによる SCD1 たんぱく発現解析でも同様の結果であった (Figure 2)。



**実験 3 :** PPAR $\gamma$  knock-down のみで、SCD1 の発現は 88%にまで低下した。LA 処理は、SCD1 mRNA 発現を 72%まで低下させたが、siPPAR $\gamma$  処理は、この抑制作用をほぼ相殺した。同様に、ALA 添加による SCD1 mRNA はコントロールの 54%にまで抑制されたが、siPPAR $\gamma$  導入後に ALA 添加を行うと、74%までの抑制に止まった。一方、AA と DHA による SCD1 発現抑制効果は、si siPPAR $\gamma$  処理に影響を受けなかった。以上より、PUFA による SCD1 発現抑制効果のうち、一部は PPAR 依存的メカニズムによるものが明らかになった (Figure 3) 。



これらの結果は、母乳栄養によるメタボリックシンドローム発症への抑制効果解明の一助となる。また、より強い脂肪産生抑制効果を示す PUFA 配合比の探求は、人工乳やその他の食品開発へとつながる。今後は、PUFA の相乗効果に関するさらなるメカニズムの解明が必要であり、網羅的遺伝子発現解析およびリピドミクスの組み合わせによる解析を検討している。

## 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Hiroyuki Ono, Yasuko Fujisawa et al., Partial androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic mutation creating an alternative splice acceptor site of the AR gene. Scientific reports. 8: 2287 2018
2. Yuichi Nakagawa, Yasuko Fujisawa et al., Postnatal BMI changes in children with different birthweights: A trial study for detecting early predictive factors for pediatric obesity Clin Pediatr Endocrinol. 27(1): 19–29. 2018
3. Longitudinal serum and urine steroid metabolite profiling in a 46,XY infant with prenatally identified POR deficiency.

Hiroyuki Ono, Yasuko Fujisawa et al., J Steroid Biochem Mol Biol. Apr;178:177-184 2018

4. Kaori Yamoto, Yasuko Fujisawa et al, FGFR1 disruption identified by whole genome sequencing in a male with a complex chromosomal rearrangement and hypogonadotropic hypogonadism. Am J Med Genet A. Jan;176(1):139-143 2018

5. Kaori Yamoto, Yasuko Fujisawa et al, De novo IGF2 mutation on the paternal allele in a patient with Silver-Russell syndrome and ectrodactyly. Human mutation Aug;38(8):953-95 2017

6. Maki Fukami, Yasuko Fujisawa et al., Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty J Cell Mol Med. Oct; 21(10): 2623–2626 2017

〔学会発表〕(計1件)

第88回日本内分泌学会学術総会  
(2015.4 東京) 長鎖不飽和脂肪酸  
は相乗的に脂肪細胞 Stearoyl-CoA  
desaturase-1(SCD1)の発現を抑制す  
る(ポスター発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤澤 泰子 (FUJISAWA, Yasuko)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40402284