

平成 29 年 8 月 27 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350166

研究課題名(和文) 脂肪細胞とマクロファージ共培養時における酪酸のエイコサノイドと脂質代謝への影響

研究課題名(英文) Butyrate affect lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through eicosanoid mediated pathways

研究代表者

大平 英夫 (Hideo, Ohira)

神戸学院大学・栄養学部・准教授

研究者番号：40351762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：分化3T3-L1脂肪細胞とRAW264.7マクロファージを用い、共培養下(直接・間接法)、酪酸Na(Bt)とPGE2のlipolysis関与を評価した。結果、BtはPGE2産生増加を認め、その機序として、両細胞のCOX2発現とマクロファージcPLA2活性増加を認めた。lipolysisは、Bt、PGE2添加で抑制し、PGE受容体3拮抗薬は、PGE2の抑制効果を打ち消し、Btは部分的に抑制を示した。よって共培養下でのBtによる脂肪細胞へのlipolysis抑制にはPGE2と非関与経路の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using contact or transwell co-culture methods with differentiated 3T3-L1 and RAW264.7, we examined sodium butyrate (Bt), PGE2 and involved lipolysis mechanisms. Bt significantly increased PGE2 production compared with co-culture. In this mechanisms, Bt elevated COX2 expression in macrophages and adipocytes, cPLA2 activity in macrophages compared with co-culture. As for lipolysis, co-culture increased lipolysis, whereas butyrate and PGE2 suppressed it. The PGE receptor 3 antagonist reversed the control level in PGE2 treated cells and partially reversed the control in butyrate treated cells. It is suggested butyrate may attenuate lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages via PGE2 mediated and non-PGE2 mediated pathways.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：Butyrate Adipocyte Macrophage Lipolysis Prostaglandin E2 Short chain fatty acid

## 1. 研究開始当初の背景

酢酸、プロピオン酸、酪酸に代表される短鎖脂肪酸(SCFAs)は、大腸内において難消化性糖質が腸内細菌の発酵分解を受けることにより産生される。SCFAs は腸管から吸収され、結腸上皮の栄養分ならびに大腸機能を正常に維持する働きを持つことが分かっている。

内臓脂肪型肥満では、脂肪組織中にエネルギーの貯蔵過多だけでなく免疫担当細胞が多く認められ、慢性炎症が誘導されている。特に、脂肪細胞と組織マクロファージ間の相互作用により炎症誘導物質や遊離脂肪酸等が持続的に放出されており、これらが糖・脂質代謝異常を引き起こす機序の1つとされる。この相互作用は“paracrine loop 仮説”と提唱され、現在、多くの研究によってその正当性が証明されている

この状況下で炎症・代謝異常の関連因子産生を抑制できる栄養成分(脂肪酸)の探索は、肥満関連疾患の予防、治療への貢献に繋がると期待される。

## 2. 研究の目的

短鎖脂肪酸に属する酪酸は、動物実験またはヒトにおいて代謝異常の改善作用を持つことが報告されている。一方、脂肪組織内に特異的に発現している Phospholipase A<sub>2</sub>(AdPLA2)を欠損させた動物実験では、通常群に比べ Prostaglandin E2(PGE2)の合成が低下し、耐糖能障害を誘導することが報告されている。しかし、酪酸の持つ代謝改善効果が脂肪細胞への PGE2 合成と関わっているかどうかについては未だ不明である。よって、マウス脂肪細胞を用い、マクロファージとの共培養条件下(直接・間接法)において、酪酸ナトリウム(Bt)が脂質代謝に関連すると推察される、エイコサノイド産生と脂質代謝への影響、ならびに肥満関連疾患予防、治療の可能性について検証を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 共培養

分化 3T3-L1 脂肪細胞と RAW264.7 マクロファージを使用。共培養は直接法と間接法の2つの方法を用いた。直接法では、未分化 3T3-L1 細胞( $5.0 \times 10^5$  cells/well)を 24-well plate に接着、脂肪細胞へ分化 20 日後に RAW264.7 細胞 ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) を直接播種した。間接法では、24-well transwell plate (0.4  $\mu$ m porous membrane) を用い、下層に未分化 3T3-L1 細胞 ( $5.0 \times 10^5$  cells/well) を接着、脂肪細胞へ分化 20 日後に RAW264.7 細胞 ( $5.0 \times 10^5$  cells/well) を上層に接着させた。直接法では採取した培養液(産生量)を実験サンプルとして、間接法では各細胞から採取したサンプルを実験(遺伝子、蛋白質発現量)に使用した。サンプルは全て、各測定のために応じた検体処理を実施し、 $-80^{\circ}\text{C}$  下で保存した。

### (2) PGE2 測定

PGE2 濃度は、培養液を用い測定を行った。測定に際しては、市販のキット試薬を用い、評価した。PGE2 産生レベルを評価するコントロール検体は、RAW264.7 もしくは 3T3-L1 の各単独培養液を用いた。

### (3) Lipolysis 測定

血清不含培地(2% 脂肪酸-free BSA)にて共培養(直接法)または、3T3-L1 細胞に TNF- $\alpha$  刺激を実施。Bt、PGE2、PGE 受容体 3 (EP3)拮抗薬、各種阻害薬(阻害: NF- $\kappa$ B、COX2、Gi シグナル)処理下での培地中、遊離脂肪酸(FFA)、グリセロール濃度を市販のキット試薬を用い、評価した。

### (4) 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応共培養(間接法)にて、transwell plate

下層から 3T3-L1 細胞、上層から RAW264.7 細胞を回収、市販の RNA 抽出試薬を用い、各細胞から total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA より cDNA を合成、COX2、pla2g16 (AdPLA)、 $\beta$  actin 遺伝子の mRNA 発現量を定量した。

#### (5) RNA 干渉

3T3-L1 細胞に対し、市販 siRNA キット試薬を用い、短鎖脂肪酸受容体：GPR41、109A siRNA トランスフェクションによる、GPR41、GPR109A ノックダウン処理を行った。GPR41、109A ノックダウン 3T3-L1 を用い、Bt の lipolysis 抑制効果を評価した。

#### (6) ウェスタンブロッティング解析

共培養（間接法）にて、transwell plate 下層から 3T3-L1 細胞、上層から RAW264.7 細胞を回収、市販の蛋白質抽出ならびに蛋白分解酵素、リン酸化阻害薬カクテル試薬を用い、各細胞から蛋白質を抽出した。SDS-PAGE/イムノブロット解析により、HRASLA3 (AdPLA)、COX2、PRKAR1A (PKA) 蛋白質の発現量について評価を行った。1 次抗体ならびに、ウェスタンブロッティングで用いた試薬は市販品を用い、目的蛋白質の発現量解析には、ImageJ software を用いた。

#### (7) 細胞内 cPLA2、sPLA2 活性測定

共培養（間接法）にて、各細胞から蛋白質を抽出した。蛋白質濃度を 1 mg/mL に調整し、Bt 添加による cPLA2 と sPLA2 活性を市販のキット試薬を用い、評価した。

#### (8) 3T3-L1 細胞内 cAMP 濃度測定

共培養（間接法）にて、3T3-L1 細胞から蛋白質を抽出した。蛋白質濃度を 1 mg/mL に調整し、Bt、PGE2、adenylyl cyclase 阻害薬添加による cAMP 濃度を市販のキット

試薬を用い、評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 共培養における Bt の PGE2 への効果

直接法、間接法の両共培養条件において、培養液中の、PGE2 産生は増加し、Bt 添加により濃度依存性の有意な産生増加を示した (Fig. 1A, B)。

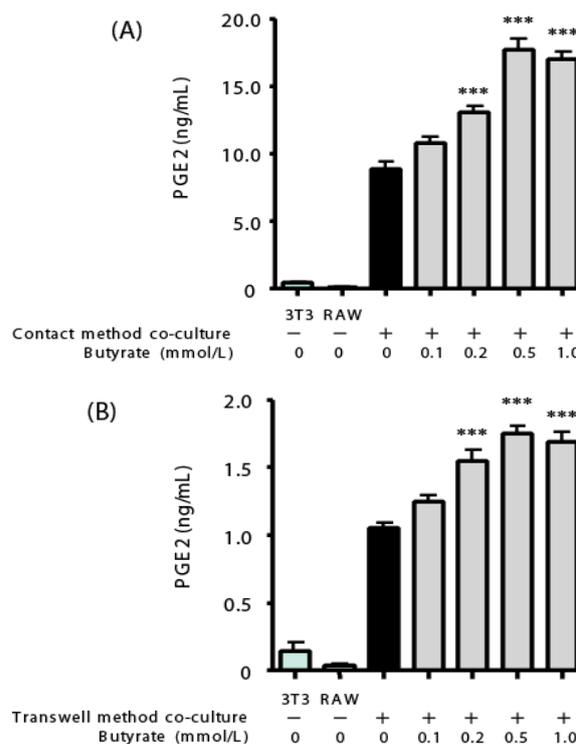


Fig. 1 共培養時での Bt の PGE2 への効果

Effect of butyrate on the production of PGE2 induced in cells co-cultured using the contact method for 24 h (A), in cells co-cultured using the transwell method for 24 h (B). Values from five independent experiments are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p$ <0.001 versus co-culture, as determined by ANOVA and the Tukey-Kramer test.

### (2) 共培養における Bt の PTX 存在の効果

短鎖脂肪酸レセプター；GPR41 は、PTX (Gi シグナル阻害薬) により、Bt のシグナル阻害効果が報告されている。結果、共培養時 Bt 濃度依存性の PGE2 増加は、PTX 処理によ

り、その効果は打ち消された。

(3) 共培養における Bt の COX2 発現効果  
両細胞における、Bt の COX2 蛋白質と mRNA 発現量の変化を評価した結果、両細胞にて Bt 濃度依存性による COX2 蛋白質、mRNA 発現の有意な増加が認められた。

(4) 共培養時における Bt の cPLA2、sPLA2 活性と AdPLA2 発現効果

cPLA2 活性変化は、RAW264.7 にのみ、Bt 濃度依存性の活性増加を認め、3T3-L1 での、AdPLA2 発現量は、Bt による効果を認めなかった。

(5) 共培養時 3T3-L1 における Bt と EP3 拮抗薬の lipolysis への効果

脂肪細胞では、特に PGE2 レセプターの 1 つ、EP3 発現が特異的に高いことから、EP3 拮抗薬 (L798106) と Bt の lipolysis への効果を検討した。結果、共培養にて増加を示した lipolysis は、PGE2 添加により、有意な抑制を示し、Bt ならびに Bt + PGE2 添加は、さらに抑制を示した。

一方、EP3 拮抗薬添加により、その効果は打ち消されたが、Bt は完全ではないが、その抑制効果を残していた。よって Bt は、EP3 経路とそれ以外の経路により lipolysis 抑制効果を持つ可能性が示された。

(6) 共培養時 3T3-L1 における Bt と PGE2 の細胞内 cAMP レベルへの効果

シグナル下流の評価より、脂肪細胞への cAMP 変化について調査した。結果、アデニルシクラーゼ阻害薬 (SQ22536) は、cAMP 産生を完全に阻害し、Bt と PGE2 は、それぞれ有意な産生阻害を示した。

加えて、cAMP シグナルに重要な役割をもつ PKA 発現は、Bt 濃度依存性に低下を認めた。

(7) TNF- $\alpha$  刺激 3T3-L1 における NF- $\kappa$ B、COX2 阻害薬の lipolysis への効果

TNF- $\alpha$  刺激、脂肪細胞への NF- $\kappa$ B 阻害薬 (Bay117082) は、完全に lipolysis を抑制し、PGE2 + COX-2 阻害薬 (SC58635)、Bt + COX-2 阻害薬では、COX-2 阻害薬単独に比べ、顕著な lipolysis 抑制を示した。

(8) GPR41、109A ノックダウン 3T3-L1 における TNF- $\alpha$  刺激時 lipolysis、cAMP への影響  
短鎖脂肪酸レセプターである GPR41、109A を 3T3-L1 細胞に siRNA 処理を行い、lipolysis、cAMP への影響を評価した。結果、GPR109A ノックダウンにより、Bt の効果はほぼ打ち消された一方、GPR41 ノックダウンでも、Bt の効果は完全に打ち消されなかった。また、GPR41、109A ノックダウン細胞では、共に Bt + PGE2 添加において、Bt 単独に比べより抑制効果を示した。

以上結果と、我々の以前の報告(機序③)より、Bt は共培養時 (マクロファージ存在下) における脂肪細胞の lipolysis を抑制し、その経路として PGE2 が関与する EP3 経路とそれ以外の経路があることが示唆された。

共培養時における、Bt の EP3 経路による lipolysis 抑制の機序として、①マクロファージの cPLA2 活性増加、マクロファージと脂肪細胞の COX2 発現増加による PGE2 産生増加、②その後、脂肪細胞 EP3 受容体活性による細胞内 cAMP 低下、PKA 発現量低下、③PKA のリン酸化活性低下による HSL リン酸化、ATGL リン酸化の低下、④ lipolysis 抑制 (FFA、free glycerol 放出低下) であることが示唆された。

Bt の作用は、脂肪細胞の短鎖脂肪酸受容体が関わっており、GPR109 経路が、より優位を占める一方、GPR41 経路も lipolysis 調整に関与していることを示唆する結果と

なった。

今後、さらに短鎖脂肪酸が、糖・脂質代謝性疾患予防、そして治療への可能性について、新規標的物質の検索、細胞レベルで解明を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 2 件)

(1) 査読有: Ohira H, Tsutsui W, Mamoto R, Yamaguchi S, Nishida M, Ito M, Fujioka Y., Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through non-prostaglandin E2-mediated and prostaglandin E2-mediated pathways, *Lipids in Health and Disease* 2016, **15**:213 DOI:10.1186/s12944-016-0387-0

(2) 査読有: Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y., Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis?, *J Atheroscler Thromb* 2017 May 27. doi: 10.5551/jat.RV17006. [Epub ahead of print]

### [学会発表] (計 4 件)

(1) Hideo Ohira, Rie Mamoto, Wao Tsutsui, Sayaka Yamaguchi, Masako Nishida, Miki Ito, Yoshio Fujioka., Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages by the mechanisms associated with prostaglandin E2, 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 仙台国際センター, 2015-07-09-2015-07-10.

(2) 西田全子、大平英夫、伊藤実希、眞本利絵、筒井輪央、山口さや香、藤岡由夫., 脂肪酸の3T3-L1細胞内脂質制御作用, 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 仙

台国際センター,  
2015-07-09-2015-07-10.

(3) Hideo Ohira, Wao Tsutsui, Rie Mamoto, Sayaka Yamaguchi, Yasuki Maruta, Yoshio Fujioka., Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through up-regulation of prostaglandin E2, The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. Tokyo, Japan, 2016-07-14-15.

(4) Hideo Ohira, Wao Tsutsui, Rie Mamoto, Yasuki Maruta, Yoshio Fujioka., Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through prostaglandin E2 (PGE2)-mediated and non-PGE2-mediated pathways, 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会, グランドプリンスホテル 広島, 2017-07-06-07.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 大平 英夫 (Hideo Ohira)  
神戸学院大学, 栄養学部, 准教授  
研究者番号: (403517062)

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし