

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15775

研究課題名(和文)トランス脂肪酸が天然の脂肪酸とは異なる機序で起こす細胞機能障害に関わる因子の解明

研究課題名(英文)Exploration of the mechanism for cellular toxicity by trans fatty acid that is different from natural fatty acids

研究代表者

石橋 賢一 (Ishibashi, Kenichi)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00707458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：人工のトランス脂肪酸はどのようにして、構造が類似する天然の飽和脂肪酸とは異なるメカニズムで細胞機能を障害するのかを明らかにすることを目的とした。これまでに明らかにしてきた細胞膜のリン脂質組成とインスリンシグナルの鍵分子であるAktへのエライジン酸(人工のトランス脂肪酸)の影響に着目したところ、エライジン酸が結合したリン脂質の出現と、それに引き続く特定のリン脂質分子種の量の減少によって、細胞膜のAktの量が増えにくくなることが示唆された。また、上記のリン脂質分子種の量の変化に関わる可能性がある遺伝子の発現レベルの変化も見出され、トランス脂肪酸が引き起こす細胞機能障害の機序の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トランス脂肪酸が引き起こす細胞機能障害に関わる分子をいくつか明らかにした。これらの分子の量や活性を指標とすれば、トランス脂肪酸による細胞機能障害の把握や予測が可能になると考える。これによりトランス脂肪酸の摂取量と疾患発症との関係をより正しく評価できる可能性があり、疾患発症との新たな関係の解明や摂取量の提言に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Excessive intake of industrial produced trans fatty acids (TFAs) induces cellular toxicity. Our previous studies indicate that the mechanism for TFAs-induced cellular toxicity is different from that for saturated fatty acid-induced cellular toxicity. However, detail mechanism for TFAs-induced cellular toxicity is not elucidated. We revealed that persistent exposure to elaidate, a TFA, results in production of elaidate-conjugated phospholipids and alteration in composition of phospholipid species. Moreover, alteration in composition of phospholipid species is involved in an impairment of accumulation of Akt at the plasma membrane. We further found the candidate gene which is involved in elaidate-induced alteration in composition of phospholipid species. Thus, our study indicated a mechanism for TFAs-induced cellular toxicity.

研究分野：食品化学

キーワード：トランス脂肪酸 インスリン応答性 Akt 膜リン脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) 人工のトランス脂肪酸(エライジン酸)は構造が類似する飽和脂肪酸(ステアリン酸)と異なる分子の働きを抑制し、細胞機能を障害する

飽和脂肪酸を多く含む食事を摂取量すると、冠動脈性心疾患など様々な疾患の発症リスクが高まることが報告されていた(引用文献)。また、食品加工の過程で生成される人工のトランス脂肪酸も摂取量に応じて冠動脈性心疾患の発症リスクを高めるが(引用文献)このような人工のトランス脂肪酸による生体機能の乱れが、立体構造が飽和脂肪酸と似ていることと関連しているのかは明らかではなかった。

研究代表者は、食品に含まれる主な人工のトランス脂肪酸であるエライジン酸に着目し、エライジン酸に継続的に曝した培養脂肪細胞で、インスリンに応答した糖の取り込みが低下することを明らかにした(引用文献)。また、糖の取り込みの低下は、飽和脂肪酸であるステアリン酸に曝した場合でも見られたことから、「細胞機能の障害における飽和脂肪酸と人工のトランス脂肪酸の共通性と違い」をテーマに研究を進めてきた(2017年度若手研究B-17K15494)。その結果、エライジン酸はステアリン酸とは異なる分子の働きを抑制しており、天然に存在する飽和脂肪酸とは異なる機序で細胞機能を障害することを示唆した。

(2) エライジン酸は、膜リン脂質や膜に集まる分子の働きに影響を及ぼす

研究代表者は、2017年度若手研究B-17K15494を始めとしたこれまでの研究で、脂肪細胞でのインスリンに応答した糖の取り込みの低下は、リン酸化酵素であるAktがインスリン刺激時に細胞膜に集まりにくくなることで引き起こされることを示唆してきた(引用文献)。また、細胞膜のリン脂質に人工のトランス脂肪酸が取り込まれることや(引用文献)細胞膜の数あるリン脂質のうち、いくつかの分子種の量が変化していることを見出してきた。これらの結果から、膜リン脂質や膜へと集まる分子の働きに影響を及ぼすことが、トランス脂肪酸が引き起こす細胞機能障害に関わると予想された。

2. 研究の目的

本研究では、「細胞膜でのリン脂質の変化に着目し、人工のトランス脂肪酸が引き起こす細胞機能の障害に関わる因子を明らかにする」ことを目的とした。そこで具体的には、(1)Aktが活性化する場である細胞膜脂質ラフトのリン脂質の変化と変化を引き起こす因子に焦点を絞った解析とともに、(2)細胞全体での変化を捉える網羅的な解析を並行して行うことで、細胞全体の変化を把握しつつ局所での結果を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) エライジン酸に継続的に曝された脂肪細胞の作製

本研究では、血中で想定される濃度のエライジン酸による細胞機能障害の機構を調べるために、培養液中の濃度が10あるいは50  $\mu\text{M}$ となるようにエライジン酸を加えた。細胞はマウス前駆脂肪細胞株3T3-L1を用い、分化誘導前の10日間と脂肪細胞への分化誘導時の8日間にエライジン酸を継続的に加えた。また、エライジン酸を可溶化する際には、牛血清アルブミンに結合させた。これらは、引用文献からに基づいた方法で行った。

(2) 細胞膜のAktの量や分布の解析

細胞膜のAkt量は、引用文献と同様にPlasma Membrane Protein Extraction Kit (BioVision)を用いて細胞膜画分を調製した後、イムノプロット法で調べた。また、Aktの細胞膜における分布を調べる際には、シヨ糖密度勾配遠心法を用いた。細胞の可溶化液とシヨ糖を80%含む緩衝液とを等量ずつ混合し、その上に30%、5%のシヨ糖を含む緩衝液を重層した後に、280,000  $\times g$ で18時間遠心した。遠心後の溶液を上から順に分取することで、比重の異なる複数の画分を回収し、解析に用いた。

(3) 膜リン脂質分子種の網羅的な解析

上記で得られた膜を含む画分から、Bligh & Dyer法によりリン脂質を始めとした総脂質を抽出した。その後、LC-ESI-MS/MS装置QTRAP4500 (AB Sciex)を用いてMRM測定を行い、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)について、結合している2本の脂肪酸鎖の組み合わせが異なる分子種を網羅的に定量解析した(引用文献)。

#### (4) エライジン酸が結合したリン脂質の調製と細胞への導入

リン脂質の前駆体にエライジン酸を化学的に反応させることで、エライジン酸が結合したリン脂質を調製した。細胞へと取り込ませる際には、シクロデキストリンに包摂させた上で培地へと加えた。

#### (5) 遺伝子発現レベルへの影響の網羅的な解析

細胞から RNA を抽出し、カラム精製した後に Agilent 社マウスマイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子の発現レベルを調べた。また、エライジン酸継続添加細胞での発現レベルの変化を評価する際には、溶媒コントロールを添加した細胞と比較した。遺伝子オントロジー解析やエンリッチメント解析には、WebGestalt を用いた。また、一部の遺伝子については、リアルタイム PCR 法で発現レベルを調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) インスリン刺激時に Akt が集積する膜画分にエライジン酸結合リン脂質が多く含まれる

細胞膜の中でも Akt の活性化が起こる領域でリン脂質の量が変化しているのかを調べた。まず、インスリン刺激時に Akt の集積や活性化(リン酸化)が起こる膜領域の分離を、ショ糖密度勾配遠心法で試みた。その結果、インスリン刺激によって Akt が集積し、リン酸化が起こる膜領域を含む画分が得られた。

次に、エライジン酸を継続的に添加した細胞について解析を行ったところ、インスリンで刺激した際に上記の画分への Akt の集積量が少なかった。そこで、含まれるリン脂質を LC/MS で網羅的に解析したところ、この画分にはエライジン酸が結合したリン脂質が他の画分より多く含まれることや、様々なリン脂質分子種の含有量が変化していることが明らかになった。

#### (2) エライジン酸によるリン脂質分子種の含有量の変化が細胞膜での Akt 量の増加を妨げる

(1)の結果より、特に含有量の変化が著しかったエライジン酸が結合したリン脂質に着目した。そこで、エライジン酸結合リン脂質を合成し、細胞へと取り込ませたところ、インスリン刺激時に細胞膜の Akt 量が増えにくくなった。さらに種々の解析から、エライジン酸が結合したリン脂質が直接的に細胞膜の Akt 量を増えにくくしているのではなく、エライジン酸が結合したリン脂質が出現することで他の特定のリン脂質分子種の含有量が減少し、細胞膜の Akt 量が増えにくくなる可能性が示唆された(投稿準備中)。

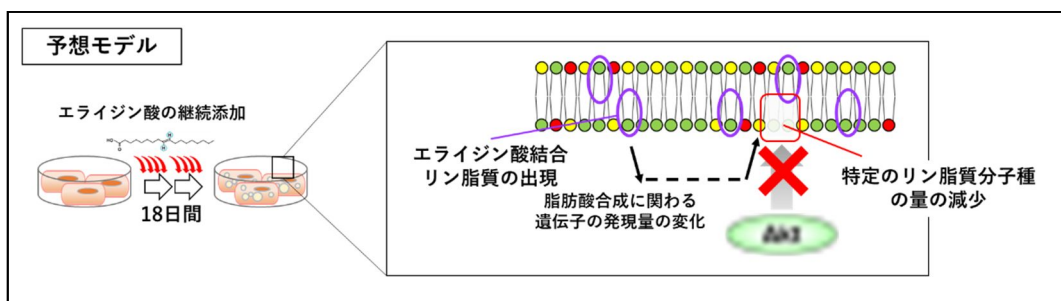
#### (3) エライジン酸継続添加細胞で見られるリン脂質分子種の量の減少に関わる変化の探索

引用文献の結果から、エライジン酸を継続的に添加した細胞では、脂肪酸の量の維持に関わる経路に何らかの変化が生じることで、特定のリン脂質分子種の量が減少している可能性が予想された。そこで、細胞全体での変化を捉えるために平行して行っていたマイクロアレイ解析の結果から、上記に関わる変化を探索した。

エライジン酸添加細胞では、コントロール細胞と比べて発現レベルが 2 倍以上あるいは半分以下に変化した遺伝子が数百個検出され、遺伝子オントロジー解析やエンリッチメント解析を行ったが、脂肪酸量の維持に直接関わる変化は検出されなかった。そこで、遺伝子の発現レベルの変化は僅かではあったが、脂肪酸の合成や分解に関わる経路に存在する分子に着目した。その結果、脂肪酸合成に関わる特定の遺伝子の発現レベルの変化が、エライジン酸継続添加細胞でのリン脂質分子種量の減少に関わる可能性が示唆された。

### エライジン酸が細胞機能障害を引き起こす分子機序の予想モデル

上記の結果から、エライジン酸結合リン脂質の出現による膜のリン脂質分子種の含有量の変化が、インスリン刺激時に細胞膜の Akt 量が増えにくくなることの一因であると示唆された。また、リン脂質分子種の含有量の変化には、脂肪酸合成に関わる遺伝子の発現量の変化が関与していると考えられた。今後、遺伝子の過剰発現や発現欠損の実験系を構築し、上記の遺伝子の発現量の変化とエライジン酸が引き起こす細胞機能障害との関係を明らかにする予定である。



<引用文献>

Ertunc ME., Hotamisligil GS. D Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res.*, 57, 2016, 2099-2114

de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, Uleryk E, Budylowski P, Schönemann H, Beyene J, Anand SS. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 351, 2015, h3978

Ishibashi K., Nehashi K., Oshima T., Ohkura N., Atsumi GI. Differentiation with elaidate tends to impair insulin-dependent glucose uptake and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Food Sci Nutr.*, 67, 2016, 99-110

Ishibashi K, Takeda Y, Nakata L, Hakuno F, Takahashi SI, Atsumi GI. Elaidate, a trans fatty acid, suppresses insulin signaling for glucose uptake in a manner distinct from that of stearate. *Biochimie*, 177, 2020, 98-107

Ishibashi K, Takeda Y, Atsumi GI. E Effect of Trans Fatty Acid on Insulin Responsiveness and Fatty Acid Composition of Lipid Species of 3T3-L1 Adipocytes. *InTechOpen*, 2018, DOI: 10.5772/intechopen.76646

Hama K, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K. Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice. *Lipids*, 53, 2018, 85-102

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakatani Eriko, Naito Yasuo, Ishibashi Kenichi, Ohkura Naoki, Atsumi Gen-ichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Derived from 3T3-L1 Adipocytes Enhance Procoagulant Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 178 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00661	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi Kenichi, Atsumi Gen-ichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Extracellular Elaidate, a Trans Fatty Acid, Tends to be Incorporated into Triglycerides and Incorporated Elaidate is Released by Lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 120 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.4_120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Yoshihiro, Ishibashi Kenichi, Kuroda Yumi, Atsumi Gen-ichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Exposure to Stearate Activates the IRE1 /XBP-1 Pathway in 3T3-L1 Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1752 ~ 1758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi Kenichi, Takeda Yoshihiro, Nakata Lisa, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Atsumi Gen-ichi	4. 巻 177
2. 論文標題 Elaidate, a trans fatty acid, suppresses insulin signaling for glucose uptake in a manner distinct from that of stearate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 98 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2020.07.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takata Yuko, Nomura Kyoko, Ishibashi Kenichi, Kido Koichiro, Sasamori Yukifumi, Hiraike Haruko, Ayabe Takuya, Atsumi Gen-ichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Elevated Expression of Vascular Adhesion Molecule-1, Plasminogen Activator Inhibitor-1, Cyclooxygenase-2, and Thrombomodulin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells from Hospitalized Gestational Diabetes Mellitus Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 807 ~ 813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石橋賢一
2. 発表標題 細胞を用いたトランス脂肪酸のインスリン応答性への影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田 優美、石橋 賢一、福田 寿之、厚味 巖一
2. 発表標題 プチヴェールの外葉に含まれる成分のC2C12 細胞における糖の取り込み促進効果
3. 学会等名 第21回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋賢一、松田英里香、矢野彩緒里、川村拓己、濱弘太郎、横山和明、厚味巖一
2. 発表標題 Aktを介したシグナルのトランス脂肪酸による抑制機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋賢一、植田美月、厚味巖一
2. 発表標題 ステアリン酸の存在下で培養した細胞における遺伝子発現レベルの網羅的解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋賢一、松田英里香、川村拓己、濱弘太郎、横山和明、厚味巖一
2. 発表標題 エライジン酸の存在下で分化誘導した脂肪細胞におけるエライジン酸を含むリン脂質の解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋賢一、松田英里香、阿部玲奈、川村拓己、濱弘太郎、横山和明、厚味巖一
2. 発表標題 エライジン酸を含むリン脂質分子種の存在の確認
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田優美、石橋賢一、中谷絵理子、武田剛寛、牧野成美、厚味巖一
2. 発表標題 TNF- 刺激した脂肪細胞から放出される マイクロパーティクルの解析
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Ishibashi, Yoshihiro Takeda, Gen-ichi Atsumi
2. 発表標題 Unique effects of elaidate, a trans fatty acid, on insulin signaling and composition of phospholipid
3. 学会等名 ICBL2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、武田剛寛、濱弘太郎、横山和明、厚味蔵一
2. 発表標題 エライジン酸の存在下で分化させた脂肪細胞におけるAktの細胞内分布とリン脂質分子種の解析
3. 学会等名 第61回脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、武田剛寛、宮下眞野、望月悠莉、厚味蔵一
2. 発表標題 ステアリン酸に曝された脂肪細胞での小胞体ストレス応答 (UPR) の解析
3. 学会等名 第24回 アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、根本優愛、厚味蔵一
2. 発表標題 ゆず精油がヒト肝癌由来細胞株HepG2の脂肪滴に与える影響
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 厚味厳一、石橋賢一、武田剛寛、宮下眞野、望月悠莉、石井育夫、矢野彩緒里
2. 発表標題 ステアリン酸によりIRE1 /XBP-1シグナルが活性化した脂肪細胞におけるリン脂質の変化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、武田剛寛、中田理沙、伯野史彦、高橋伸一郎、厚味厳一
2. 発表標題 直鎖型脂肪酸が脂肪細胞のインスリンシグナルへ与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 厚味厳一、石橋賢一、根本優愛、鈴木瑞季
2. 発表標題 ゆず精油が脂肪細胞や肝細胞の脂肪滴に与える影響
3. 学会等名 第22回日本アロマセラピー学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、笠嶋奎亮、厚味厳一
2. 発表標題 日本語で書かれた論文のデータベースを利用して精油を用いた臨床研究論文を検索する方法の検討
3. 学会等名 第22回日本アロマセラピー学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------