

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500719

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Analysis of induction mechanism of hypoadiponectinemia by trans-fatty acids.

研究代表者

加納 和孝 (KNOU KAZUTAKA)

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：70111507

研究成果の概要(和文)：トランス脂肪酸は動脈硬化、虚血性心疾患の原因になるとされ、欧米では行政による摂取低減の取り組みが始まっている。しかし、これらの疾患発症機構の解析は行われていない。本研究では、エライジン酸の影響の解析を行い、エライジン酸→TLR4 受容体→NF-κB 活性化→TNF-α 発現→TNF-α の分泌→オートクライン/パラクライン作用→PPAR-γ 産生低下を経て、アディポネクチン量の低下を引き起こすことを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Trans-fatty acids may cause atherosclerosis and ischemic heart disease. The governments of Western countries have begun efforts to reduce intake. Analysis of the mechanisms causing these disorders has not been done, however. In this study, we analyze the effects of elaidic acid and found that a cascade involving elaidic acid→TLR4→activation of NF-κB→TNF-α→secretion→autocrine/paracrine→PPAR-α expression resulted a decrease of adiponectin production.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：脂肪酸、アディポネクチン、培養細胞、PCR

## 1. 研究開始当初の背景

トランス脂肪酸は自然界では反すう動物の体内で微生物により産生され、これらの動物の肉や乳にわずかながら含まれている。天然のトランス脂肪酸として、共役リノール酸や trans-バクセン酸などがある。しかし近年、味覚や見た目をよくする目的で、液状の不飽和脂肪酸を固形化するための水

素化や、不飽和脂肪酸を多く含む植物油の精製の過程で、トランス脂肪酸が副産物として生じる。そのため、不飽和脂肪酸を多く含む油脂を水素化して製造するショートニング、マーガリン、ファットスプレッドにトランス脂肪酸が多く含まれる。トランス脂肪酸は動脈硬化、虚血性心疾患などの原因になるとされ、欧米では行政による摂

取低減の取り組みが始まっている。日本人は米国人と比較してトランス脂肪酸の摂取量は少ないとされるが、近年のファーストフードの普及によって、フライドポテト等から摂取するトランス脂肪酸は簡単に一日の上限を超えるとされている。代謝研究から、トランス脂肪酸は、LDL コレステロールを上昇させるだけでなく、HDL コレステロールを減少させるため、飽和脂肪酸よりもアテロームを発生させやすくすることが示されており、いわゆるメタボリックシンドローム等との関連も考えられる。

数件の大規模コホート研究では、トランス脂肪酸摂取が虚血性心疾患のリスクを高めることが示されている。さらに血中アディポネクチン値の低下は冠動脈疾患、肥満と密接に関連することが知られており、知らないうちに摂取しているトランス脂肪酸がこれらの危険因子を増大していることも十分考えられる。研究代表者らは、様々な脂肪酸の細胞増殖、細胞死に対する影響の解析を行ってきた。その中でトランス脂肪酸のエライジン酸やバクセン酸が、培養ヒト脂肪細胞や培養ヒト白血病細胞でアディポネクチンの産生を低下させることを見いだした。アディポネクチンの低下はヒトでは動脈硬化、虚血性心疾患、インスリン抵抗性などの原因となることが知られており、トランス脂肪酸によるこれら疾患の発症がアディポネクチン合成と関連していることを示唆すると考えられる。さらに研究代表者らは、アディポネクチン産生に関わる因子、PPAR $\gamma$ （ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体）のリガンドであるトログリタゾンがアディポネクチンの産生を増加させること、トランス脂肪酸エライジン酸がこの作用に阻害的に働くことも明らかにした。トランス脂肪酸の細胞への影響については、0.1~5.0 mM の濃度で培養臍静脈由来上皮細胞にカスパーゼ 3 の活性化を伴うアポトーシスを誘導することが報告されている（文献：Zapolska-Downar D et.al. J.Physiol Pharmacol. 2005 56(4):611-25）。この報告における濃度は、研究代表者らが発見したアディポネクチン誘導を起こす必要濃度に比べてかなり高い。また、トランス脂肪酸とアディポネクチン産生の関連については、まだ報告されていない。

## 2. 研究の目的

トランス脂肪酸は動脈硬化、虚血性心疾患などの原因となる。しかしながら、トランス脂肪酸がこれらの疾患を引き起こす機構については殆ど解析が行われていない。研究代表者らは、これまでにエルイジン酸、バクセン酸などのトランス脂肪酸はアポト

ーシスを誘導する濃度よりもかなり低い濃度で、アディポネクチン産生を低下させることを見いだした。このアディポネクチン産生の低下は、PPAR $\gamma$ （ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$ ）の活性化因子であるチアゾリジン誘導体で阻害されるが、フィブラートでは阻害されないこと等から、PPAR $\gamma$ を経由した機構で制御されていることが示唆される。さらに PPAR $\gamma$ を動かしているもの、すなわち PPAR $\gamma$ のさらに上流にあるものはなんであるかについて解析を行う。

本研究では、ヒト由来乳がん細胞株 YMB 細胞を用いて、エライジン酸などのトランス脂肪酸がアディポネクチン合成に与える影響を細胞内情報伝達系、遺伝子活性化過程解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究代表者らは、これまでにエルイジン酸やバクセン酸などのトランス脂肪酸を含む様々な脂肪酸、脂質、脂質関連物質による細胞死誘導機構の解析を行ってきた（文献：J Cell Biochem. 2007 100(2):349-61、Biol Pharm Bull. 2004 27(3):295-302、Toxicol Lett. 2003 144(3):371-81）。他のいくつかの脂肪酸と同様、エルイジン酸やバクセン酸などのトランス脂肪酸は培養脂肪細胞、培養ヒト白血病細胞で核の断片化、DNA の断片化、カスパーゼ 3 の活性化を伴うアポトーシスを誘導する。この実験の過程で、驚くべきことにはアポトーシスを誘導する濃度よりもかなり低い濃度のエルイジン酸、バクセン酸などのトランス脂肪酸が、アディポネクチンタンパク質の産生を低下させることを見いだした。トランス脂肪酸によるアポトーシス誘導は 500 $\mu$ M 以上の濃度で起こるが、アディポネクチン合成抑制は 50 $\mu$ M~400 $\mu$ M の濃度で生ずる。この抑制効果をアディポネクチンタンパク質量、mRNA 量を指標として検討した結果、タンパク質量、mRNA 量とも PPAR $\gamma$ の活性化因子であるチアゾリジン誘導体で抑制効果の緩和が認められるが、PPAR $\alpha$ の活性化因子であるフィブラートでは量の変化は認められないこと等から、PPAR $\gamma$ を経由した機構で制御されていることが示唆された。

本研究では、アディポネクチンタンパク質量あるいは mRNA 量を指標として各年度で以下のような実験を行い、働いている転写因子、プロモーターの識別等を行い、トランス脂肪酸によるアディポネクチン合成の制御機構を明らかにした。

(1)平成 20 年度には、PPAR $\gamma$ と NF- $\kappa$ B、AP-1 等の転写因子複合体、その他のタンパク質とのトランス脂肪酸の結合能、アディポネ

クタンタンパク質合成を指標としてトランス脂肪酸と合成リガンドであるチアゾリン誘導体、フィブラート等、天然のリガンドである遊離脂肪酸との拮抗作用を詳しく解析する予定であった。しかしながら、TNF- $\alpha$ 、アディポネクチンその他のタンパク質の産生量がエライジン酸により変動するのではないかと考え、ヒト乳がん由来 YMB 細胞を用いて行った実験で、研究代表者らはエライジン酸の添加(100、200、400 $\mu$ M)によるアディポネクチンの産生量の変化をリアルタイム PCR で測定した。リアルタイム PCR で用いるプライマーは、全て研究代表者が作成したものである。平成 20 年度の研究の目的は、トランス脂肪酸によるアディポネクチン産生抑制に関わるタンパク質を同定することであり、その目的はほぼ達成されたものであると考えられる。

(2)平成 21 年度以降には、前年度中に解析されたトランス脂肪酸結合性受容体の解析を行った。これまでの他の研究者の研究で、遊離脂肪酸が TLR4 受容体のリガンドとなり得ることが報告されている。TLR4 受容体の細胞内情報伝達経路は、NF- $\kappa$ B 活性化と考えられている。NF- $\kappa$ B 活性化はその後の TNF- $\alpha$  の活性化を誘導する可能性が報告されており、この受容体がトランス脂肪酸の受容体となり得るかどうかは非常に重要な問題であった。それ故、いくつかの阻害剤、抗体を用いた実験を行った。さらにアディポネクチン mRNA の合成を指標として上記の実験を行い、タンパク合成、mRNA の合成の両面からトランス脂肪酸のアディポネクチン合成の制御機構について詳しい解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)研究代表者らは、これまでにエルイジン酸、バクセン酸などのトランス脂肪酸を含む様々な脂肪酸、脂質、脂質関連物質による細胞死誘導機構の解析を行ってきたが、他のいくつかの脂肪酸と同様、エルイジン酸、バクセン酸などのトランス脂肪酸が培養脂肪細胞、培養ヒト白血病細胞で核の断片化、DNA の断片化、カスパーゼ 3 の活性化を伴うアポトーシスを誘導することを明らかにした。この実験の過程で、エルイジン酸はアポトーシスを誘導する濃度よりもかなり低い濃度で、アディポネクチン産生を低下させることを見いだした。このアディポネクチン産生の低下は、PPAR $\gamma$  (ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$ ) の活性化因子であるチアゾリジン誘導体で阻害されるが、フィブラートでは阻害されないこと等から、PPAR $\gamma$  を経由した機構で制御さ

れていることが示唆される。またリアルタイム PCR を用いた実験で、このアディポネクチンの産生抑制が mRNA レベルで起きていることも明らかにした。低アディポネクチン症では血液中の LDL コレステロール濃度が増加し、一方、HDL コレステロール濃度は減少すること、動脈硬化、虚血性心疾患が顕著に増加することが知られており、今回の発見はこれらの所見を生化学的に裏付けたものである。実際に肥満が進んだヒトでは、多くの場合アディポネクチンの減少が認められる。今回の研究では、エライジン酸の細胞への添加でまず最初に起こる生化学的变化は TNF- $\alpha$  の産生の亢進であることを明らかにした。次にこの TNF- $\alpha$  の誘導はどのように起こるかについて実験を行い、エライジン酸が TLR4(Toll like receptor 4) を経由した経路で NF- $\kappa$ B 活性化を起こしていることを見いだした。そのことは I- $\kappa$ B の離脱を防ぐような阻害剤の使用により、TNF- $\alpha$  の産生が阻害されることで明らかである。さらに産生された TNF- $\alpha$  が細胞に再び作用してアディポネクチン産生に影響を与えていることは、TNF- $\alpha$  の可溶性受容体様タンパク質であるエタナルセプトを処理すると、アディポネクチンの産生の減少が認められなくなることからも明らかである。では、TNF- $\alpha$  がどのようにアディポネクチンの産生を阻害しているかについては現在解析中であるが、PPAR $\gamma$  が関与する可能性が、研究代表者らが行ったいくつかの実験から示唆されている。

(2)2002 年に開催された「食事、栄養および慢性疾患予防に関する WHO/FAO 合同専門委員会」の報告書(2003)では、肥満、2 型糖尿病、心血管疾患(CVD)、がん、歯科疾患、骨粗しょう症に対する食事及び栄養による影響に関する証拠を検証し、それらの疾患を予防するための勧告を行っている。その中で、トランス脂肪酸については、飽和脂肪酸(ミリスチン酸及びパルミチン酸)、塩分のとりすぎ、過体重、アルコールのとりすぎとともに、心血管疾患(CVD)、特に冠動脈性心疾患(CHD)のリスクを高める確実な証拠があるとされている。WHO は「食事、運動及び健康に関する世界的な戦略」の実践の一つとして、トランス脂肪酸に関する科学的知見の更新を行った。この中では、トランス脂肪酸を代替することの実行可能性のほか、疫学的及び実験的な見地からのトランス脂肪酸の健康影響についても検討が行われた。2007 年に開催された専門家会合で主要論文について評価が行われ、6 つの総説を公表した。

この中で、トランス脂肪酸による健康影響について、「反すう動物由来のトランス脂

脂肪酸は食品から完全に除くことはできないが、それらの摂取はほとんどの集団において少なく、これまで通常の摂取量において虚血性心疾患リスクとの関連を支持する決定的な証拠はない。」と結論づけている。

本研究では、これについて詳しい検討を行い、エライジン酸がアディポネクチンの産生を低下させる経路についてほぼ解析を終えた。エライジン酸→TLR4 受容体→NF- $\kappa$ B 活性化→TNF- $\alpha$  発現→TNF- $\alpha$  の分泌→オートクライン/パラクライン作用→PPAR- $\gamma$  産生低下という経路を経て、最終的にアディポネクチン量の低下を引き起こすことを明らかにした。このことから、人工トランス脂肪酸の典型であり、もっとも生産量が多いとされるエライジン酸について、虚血性心疾患リスクとの関連を支持する決定的な証拠はないとの見解に関して、新しい証拠を提出したことになり、その意義は大きい。

さらにインスリン抵抗性の発現には、TNF- $\alpha$  が重要な役割を果たしていることが最近報告されている。エライジン酸の添加により TNF- $\alpha$  の産生量の増加が見られることから、合成された TNF- $\alpha$  がインスリン抵抗性の低下を起こしていることは想像に難くない。また、アディポネクチン量の低下もインスリン抵抗性の原因の一つと言われている。

## 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0件)

[学会発表] (計2件)

①伊坂亜由美 (加納和孝)、エライジン酸による cyp P 4 5 0 遺伝子の発現機構の解析、日本生化学会、2010年10月23日、神戸

②岩崎有希 (加納和孝)、エライジン酸がヒト乳がん由来 YMB 細胞でのアディポネクチン発現に及ぼす影響、日本生化学会、2009年10月22日、神戸

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加納 和孝 (KNOU 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

久保 宏隆 (KUBO HIROTAKA)

研究者番号：

(H20：退職)