

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11712

研究課題名(和文) 脂肪細胞とマクロファージ共培養下における脂質代謝と炎症に及ぼす脂肪酸の効果

研究課題名(英文) The effects of fatty acids on inflammation and lipid metabolism generated by the interaction of adipocytes and macrophages.

研究代表者

藤岡 由夫 (FUJIOKA, YOSHIO)

神戸学院大学・栄養学部・教授

研究者番号：70299098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームでは脂肪組織に多数のマクロファージが浸潤し炎症が惹起され、慢性炎症に抑制的に働く脂肪細胞内のヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)は強力な抗酸化物質として生体防御に働くことから各種脂肪酸がHO-1発現に及ぼす影響を検討した。マクロファージ共培養においてHO-1 蛋白発現量は、ドコサヘキサエン酸(DHA)100  $\mu\text{mol/L}$ で約250%有意に増加した。そのほかの飽和、一価不飽和、多価不飽和、トランス脂肪酸はHO-1 蛋白発現量を変化させないが、抑制傾向あるいは有意に抑制した。TNF- $\alpha$  分泌も共培養においてHO-1 蛋白発現とほぼ同様の傾向であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大規模臨床試験におけるDHAの動脈硬化性疾患発症予防は明らかでない、あるいはエイコサペンタエン酸(EPA)単独と比べて否定的である。しかし今回の研究で脂肪細胞・マクロファージ共培養においてDHAが炎症や酸化ストレスを抑制する効果があることが示唆されたことは、メタボリックシンドローム患者においてはDHA摂取による好ましい効果が期待でき、将来のテーラーメイド治療に貢献できると考えられた。

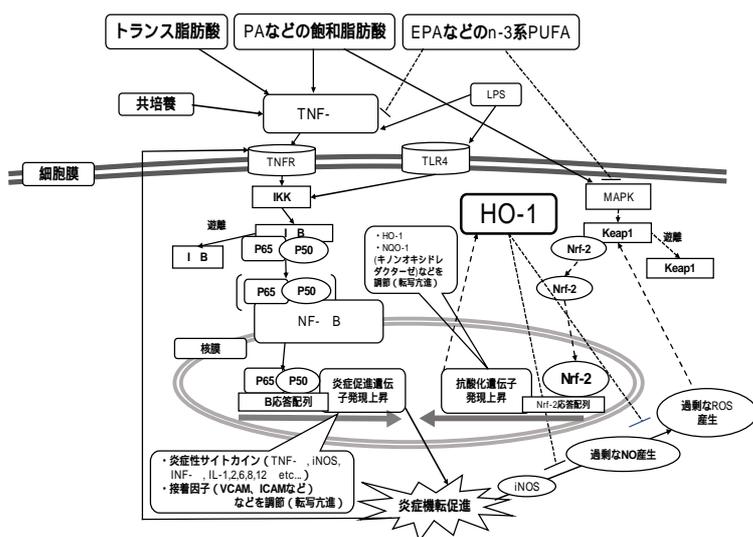
研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is associated with inflammation and oxidative stress. In metabolic syndrome, a large number of macrophages infiltrate adipose tissue and cause inflammation, but heme oxygenase 1 (HO-1) in adipocytes, which suppresses chronic inflammation, acts as a powerful antioxidant to protect the body. We investigated the effects of various fatty acids on HO-1 expression. In adipocyte-macrophage coculture, HO-1 protein expression was significantly increased by approximately 250% ( $p < 0.05$ ) at 100  $\mu\text{mol/L}$  of DHA. All other saturated, monounsaturated, polyunsaturated, and trans fatty acids were unchanged, inhibited, or significantly suppressed on HO-1 expression. TNF- $\alpha$  secretion also had a similar trend in HO-1 expression in cocultured adipocytes.

研究分野：脂質代謝、動脈硬化、循環器疾患

キーワード：脂肪酸 炎症 マクロファージ 脂肪細胞 ヘムオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織には多数のマクロファージが浸潤し、炎症性サイトカインを産生するほか、intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)などの接着分子、誘導型 nitric oxide (NO) 合成酵素(iNOS)などの発現上昇が認められる[1]。通常、脂肪組織ではこれらの炎症性反応に対して IL-10 の産生や heme-oxygenase-1(HO-1)の発現上昇など抑制的に働くが、慢性炎症では脂肪細胞とマクロファージの相互作用などのさまざまな反応が重なり、炎症促進の方向に傾いて動脈硬化性病変の発症、進展や脂肪肝、インスリン抵抗性などが起こるものと考えられる[1,2]。脂肪酸の中では、飽和脂肪酸(SFA)は炎症、糖尿病と心血管疾患リスクを有し、トランス脂肪酸の摂取は動脈硬化症等の循環器疾患や肥満、糖尿病等の生活習慣病のリスクファクターとされている。逆に EPA や DHA は脂質蓄積を抑制する効果が認められており、抗炎症作用、インスリン抵抗性の改善作用が報告されている。これらの背景は脂肪酸が炎症機能に重要な役割をもっていることを示唆している[3,4,5]。このように、これらの脂肪酸の炎症、心疾患、脳血管疾患、動脈硬化性疾患への作用が明らかになってきたが、疫学調査からの報告に比べて、分子・細胞レベルでの知見は少ない。HO-1 は、炎症抑制、微小循環の恒常性維持と血流調節など免疫応答と生体防御機構を担っていること以外に、マクロファージや脂肪細胞内脂質代謝を改善する作用を有していることが知られているが、各脂肪酸による発現など詳細な機序の解明には至っていない。



HO-1 に対する脂肪酸の分子メカニズムにおける模式

図 1

2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞単独及びマクロファージとの共培養条件下における 3T3-L1 脂肪細胞において、各種脂肪酸（飽和、一価不飽和、多価不飽和、およびトランス脂肪酸）が以下に列挙する影響を明らかにすることを目的とした。（1）炎症関連蛋白である HO-1 発現（2）炎症性サイトカインおよび転写因子を含むシグナル伝達機構

### 3. 研究の方法

(1) 細胞はマウス 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導し、マクロファージはマウス RAW264.7 細胞を用いた。脂肪酸はトランス脂肪酸(トランスパルミトオレイン酸(tPOA)、エライジン酸(EA)、バクセン酸(VA))、多価不飽和脂肪酸(n-3PUFA(EPA、DHA))、n-6 PUFA(アラドン酸(AA))、一価不飽和脂肪酸(MUFA)としてパルミトオレイン酸(POA)とオレイン酸(OA)、飽和脂肪酸(SFA)としてパルミチン酸(PA)とステアリン酸(SA))を用いた。脂肪酸負荷による細胞障害性は Cell Proliferation Reagent WST-1 法を用いた。

(2) 3T3-L1 脂肪細胞において単独および共培養(トランスウェル法)脂肪酸負荷で、リアルタイム PCR 法を用いて HO-1 の mRNA 量を測定した。同様の培養条件で(3) HO-1 蛋白発現量は細胞融解液でウエスタンブロッティング法、(4) THF- 分泌量は上清を ELISA 法、(5) NF-k B 活性化(p65 発現)は細胞を核抽出液で回収して精製し ELISA 法、(6) Nrf2、p42/p44MAPK、p38MAPK、SAPK/JNK のリン酸化でみた活性化はウエスタンブロッティング法で行った。なお、統計処理には統計処理ソフト SPSS を使用し、一元配置分散分析(ANOVA)を行った。

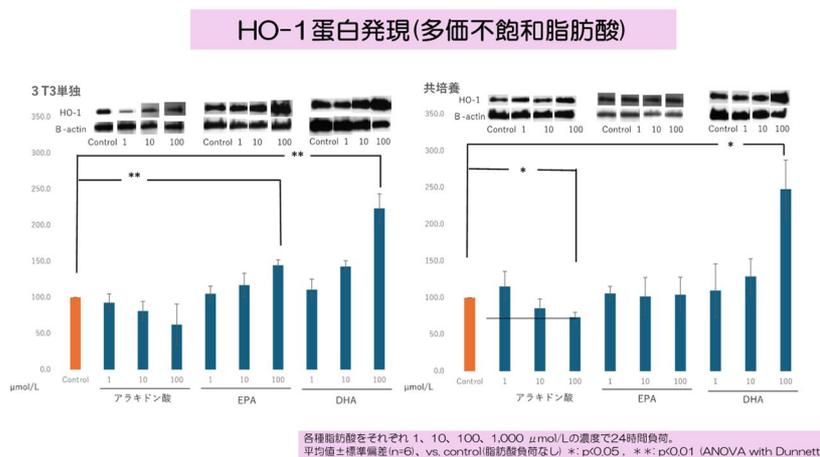
### 4. 研究成果

(1) 3T3-L1 脂肪細胞では、DHA 1,000  $\mu\text{mol/L}$  負荷で細胞生存率が有意( $p < 0.01$ )に低下した。また、RAW264.7 細胞においては、DHA と PA の 1,000  $\mu\text{mol/L}$  負荷で細胞生存率が有意( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )に低下した。そのため、以後の脂肪酸負荷実験には、1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  の濃度を用いた。

(2) HO-1 mRNA 量は、脂肪細胞単独培養 + 脂肪酸負荷なし(以下コントロールとする)を 100% として比較すると、脂肪細胞単独培養 + DHA 100  $\mu\text{mol/L}$  で約 200% ( $p < 0.01$ ) 優位に増加したが、他の脂肪酸では有意差はないが抑制傾向であった。共培養 + DHA 100  $\mu\text{mol/L}$  で約 150% ( $p < 0.01$ ) 有意に増加したが、他の脂肪酸では有意差はないが抑制傾向あるいは明らかな変化なく、また VA は 100  $\mu\text{mol/L}$  で増加傾向であったがばらつきが大きく有意でなかった。

(3) HO-1 蛋白発現量は、飽和脂肪酸(PA、SA)で単独培養および共培養で抑制および抑制傾向であった。一価不飽和脂肪酸(POA、OA)は単独培養および共培養で明らかな変化はなかった。多価不飽和脂肪酸(AA、EPA、DHA)では、AA で単独培養および共培養で濃度依存性に抑制傾向かつ共培養で約 70% ( $p < 0.05$ ) 有意に低下、単独培養 + EPA 100  $\mu\text{mol/L}$  で約 150% ( $p < 0.01$ ) 有意に増加、共培養では明らかな変化なく、単独培養 + DHA 100  $\mu\text{mol/L}$  で約 200% ( $p < 0.01$ ) 有意に増加、共培養 + DHA 100  $\mu\text{mol/L}$  で約 250% ( $p < 0.05$ ) 有意に増加した(図 1)。トランス脂肪酸(tPOA、EA、VA)はいずれも濃度依存性に抑制および抑制傾向であった。

図 2



(1) と (2) から単独培養でも共培養でも DHA のみが有意な増加を示した。

(4) TNF- $\alpha$  分泌量は、飽和脂肪酸(PA、SA)および一価不飽和脂肪酸(POA、OA)で単独培養はほぼ測定できず、共培養で増加および増加傾向であった。多価不飽和脂肪酸(AA、EPA、DHA)では、単独培養はほぼ測定できず、共培養において AA 100  $\mu\text{mol/L}$  で有意に増加、EPA、DHA でも増加傾向にあったが、DHA は濃度依存性に低下する傾向であった。トランス脂肪酸(tPOA、EA、VA)はいずれも単独培養では明らかな変化なく、共培養で有意に増加した。(図3)

(5) NF- $\kappa$ B 活性化は、飽和脂肪酸(PA、SA)および一価不飽和脂肪酸(POA、OA)で単独培養では明らかな変化なく、共培養で増加および増加傾向であった。多価不飽和脂肪酸(AA、EPA、DHA)では、単独培養では明らかな変化なく、共培養において AA と EPA では有意に増加、DHA でも増加傾向にあったが、DHA は濃度依存性に低下する傾向であった。トランス脂肪酸(tPOA、EA、VA)はいずれも単独培養では明らかな変化なく、共培養で有意に増加した。(図4)

図3

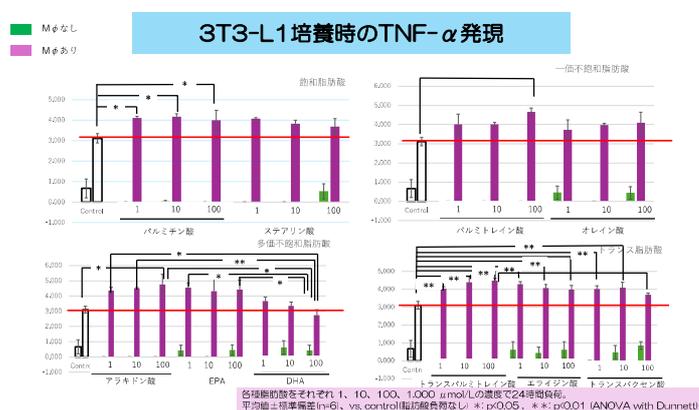
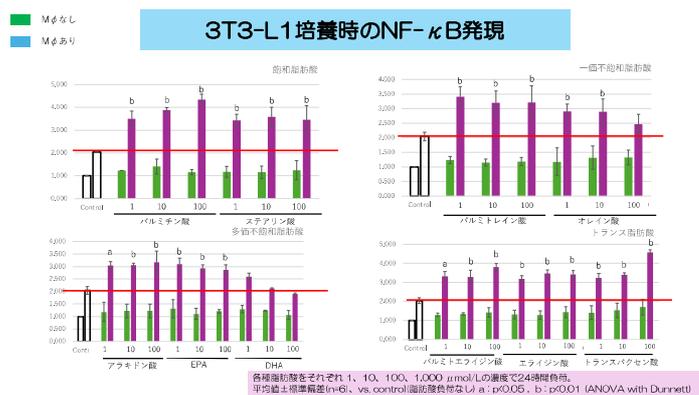


図4



(4) と (5) から各種脂肪酸は炎症の指標を増加させたが、DHA 濃度依存性に低下する傾向であった。

(6) Nrf2、p42/p44MAPK、p38MAPK、SAPK/JNK のリン酸化でみた活性化は、PA、OA、DHA、EA、VA で検討した。いずれの脂肪酸も単独培養、共培養いずれも有意な差は認められなかったが低下傾向であった。ただし、VA では明らかな変化がなかった。今回の条件では DHA の上記の効果を支持する明らかな結果は得られなかったが、既報[5]と比べて培養条件の違いがあると考えられる。

- [1] Oliver E, et al. Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23: 1192-1200.
- [2] Yang Y C, Lii C K, Wei Y L, Li C C, Lu C Y, Liu K L, Chen H W: Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- $\kappa$ B pathways. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24: 204-212.
- [3] Kusunoki C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 430: 225-230.
- [4] Lumeng C N, et al. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011; 121: 2111-2117.
- [5] Cui Z-G, et al. Insight into the molecular mechanism of heme oxygenase-1 induction by docosahexaenoic acid in U937 cells. *Chem Biol Interact*. 2015; 238: 180-188.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1.松尾ゆい マクロファージ・脂肪細胞共培養系における炎症機転に及ぼすトランス脂肪酸の影響(B-11) 神戸学院大学栄養学部 卒業研究 発表 2023.10.21.
2.山形亜美、橋本裕紀 マクロファージ共培養におけるヘムオキシゲナーゼ-1とNF-κBに及ぼす各種脂肪酸の効果(B-08) 神戸学院大学栄養学部 卒業研究 発表2022.10.22.
3.久保未来 脂肪細胞・マクロファージ共培養系におけるヘムオキシゲナーゼ-1発現に及ぼす各種脂肪酸の効果 神戸学院大学栄養学部 卒業研究 発表 2021.11.21.

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
研究 分 担 者	眞本 利絵  (Mamoto Rie)  (60189892)	神戸学院大学・栄養学部・実験助手    (34509)	

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
---------	---------