

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791164

研究課題名(和文) 母乳に含まれる抗肥満生理活性物質の探索

研究課題名(英文) Seek for the bioactive substance in human milk

研究代表者

藤澤 泰子 (Fujisawa, Yasuko)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40402284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、母乳脂質に、標準的な脂肪細胞分化誘導剤がなくても前駆脂肪細胞を分化誘導する作用があること、母乳脂質により分化誘導された脂肪細胞は最終的に成熟脂肪細胞にまで分化すること、が明らかとなった。本研究ではさらに質量顕微鏡による脂肪滴の主な構成成分である中性脂肪の解析に着手した。細胞培養サンプルの調整法を確立したが、脂質局在の解析にはより詳細な条件設定が必要である。脂肪細胞は主に前駆脂肪細胞の段階で数を増やし分化後の成熟脂肪細胞は活発な増殖をしない。本研究成果は、母乳が生後早期の児における前駆脂肪細胞を積極的に成熟脂肪細胞に誘導し脂肪細胞数の増加を抑制している可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The direct effect of human milk on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes was investigated. The induction of preadipocyte differentiation by human milk lipids was tested in comparison to the cells induced by infant formula lipids. It was clearly shown that lipids in human milk initiate preadipocyte differentiation. The expression of late adipocyte markers in day 7 adipocytes (initiated into differentiation by human milk lipid at day 0) was comparable with those in control cells initiated by standard method. Furthermore, I tried to see the molecular components in lipid droplets in cells induced by human milk lipid by imaging mass spectrometry. The methods for sample preparation has been established, however, to obtain some reliable results, more efforts for condition setting should be necessary.

The results suggest that matured adipocytes losing the ability of proliferation compared to preadipocytes, induced by human milk lipid during early life period,

研究分野：小児 小児内分泌

キーワード：栄養 脂肪細胞 母乳 小児肥満 DOHad

1. 研究開始当初の背景

小児肥満は、急速な勢いで増加しており、成人肥満およびメタボリックシンドロームへの移行率が高く重要な課題である。母乳育児は小児肥満の予防策として注目されており、小児肥満予防のための米国内分泌学会ガイドライン(2008)には、「少なくとも生後6ヶ月までの母乳育児の推奨」が明記される。母乳/人工乳栄養児間では、脂肪組織の発達の相違が報告されており、肥満における中心臓器である「脂肪組織/脂肪細胞」と「母乳栄養」との関連は注目に値する。母乳の児に与える抗肥満作用に関しては、母乳と児の摂食プログラミングに関する研究は散見されるが、末梢組織とくに脂肪組織/脂肪細胞への効果の基礎研究は極めて少ない。母乳中の生理活性物質は、児の消化管蛋白分解能力の未熟さ、母乳の抗蛋白分解作用などより、多くが活性を維持して児の血流に移行することが知られている。よって母乳中生理的活性物質は児の脂肪細胞に直接作用すると強く予想されている(参考文献1)。

2. 研究の目的

本研究は、母乳が児に及ぼす抗肥満効果について、脂肪細胞培養系を用いて検証することを目的とする。母乳栄養による小児肥満の予防効果は疫学的に確認されているが、メカニズムは明らかではない。そこで、母乳の脂肪細胞に及ぼす影響を検証することで、母乳が児に与える抗肥満効果の科学的根拠を示し、さらに新規抗肥満物質の探索へ展開するために本研究を計画した。

3. 研究の方法

細胞は、3T3-L1 繊維芽細胞を用いた。母乳は、合併症がない健康な授乳期にある女性より、インフォームドコンセントののち用手法により採取しすみやかに-70℃にて保存し実験に供した。母乳は複数の女性から採取したものをプールして使用した。以下に、研究期間において行った実験1、2、3につき具体的な方法を記す。

実験1 全乳、乳清(脂肪分を遠心分離にて除去した後カゼインを超遠心操作にて取り除いた画分)、人工乳(複数の製品を一定量で混ぜて使用)を前駆脂肪細胞に添加し、脂肪細胞分化への効果を検討した。

実験2 母乳脂質をBligh-Dyer法(メタノールとクロロホルムを用いた総脂質抽出法)にて抽出し、溶媒を窒素置換にて除いて、100%エタノールに再溶解し前駆脂肪細胞に添加して、その分化誘導作用を確認した。

実験3 抽出した母乳脂質を添加した脂肪細胞における網羅的遺伝子発現を、人工乳より抽出した脂質を添加した脂肪細胞と比較検討した。プラットフォームとしては、東レの高感度DNAチップ 3D-Gene®を用いた。

実験4 母乳脂質により分化誘導された脂肪細胞は、標準的分化誘導試薬により分化誘導された細胞に比べて、より初期の分化段階から、より大きなサイズの脂肪滴を有する。脂肪滴に貯蔵されている脂質は中性脂肪が主であるが、これを構成する脂肪酸の種類により中性脂肪の特性が決定され、結果として脂肪細胞機能にも関与することが知られている。

そこで、本研究では脂肪滴の中性脂肪を構成する脂肪酸種を質量顕微鏡を用いて解析することを試みた(参考文献2)。

4. 研究成果

結果1：全乳は、単独で3T3-L1前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導する効果を有する

母乳の全乳および乳清(乳脂肪分を遠心分離にて取り除いた後、カゼインを超遠心操作にて取り除いた画分)と、対照としての人工乳を用い、3T3-L1前駆脂肪細胞への添加実験を施行したところ、母乳の全乳によって処理された群では、前駆脂肪細胞のみで発現するPref1とTIMP3の遺伝子発現が有意に減少した(Figure 1)。

これは、全乳にのみ前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞に分化誘導する作用があることを示す結果である

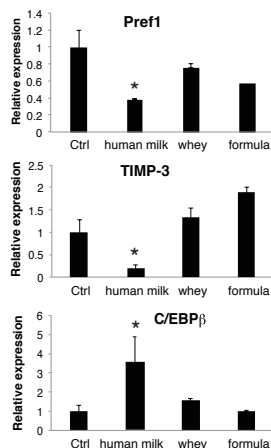


Figure 1

結果2：母乳は、脂肪細胞分化促進剤の効果を増強する

さらに、母乳(全乳)による前駆脂肪細胞分化誘導作用を、標準的な分化誘導剤(インスリン、デキサメサゾン、IBMX)とともに添加しその効果を確認した(Figure 2)。母乳を添加した群は、標準的な分化誘導剤の非存在下においても、コントロール(標準的プロト

コール;インスリン+デキサメサゾン+IBMXによって分化誘導された脂肪細胞)と同程度の、成熟脂肪細胞マーカーであるaP2およびCEBPαの遺伝子発現を誘導した。さらに、インスリン・デキサメサゾン・IBMXそれぞれの単剤での添加によるaP2とCEBPα遺伝子発現は、母乳より抽出した脂質を添加すると相乗的に上昇した。このことは、母乳による分化誘導効果は、標準的プロトコールの分化誘導に関するシグナル伝達経路(インスリンレセプターおよびグルココルチコイドレセプター)とはことなるシグナル伝達経路を介しているこ

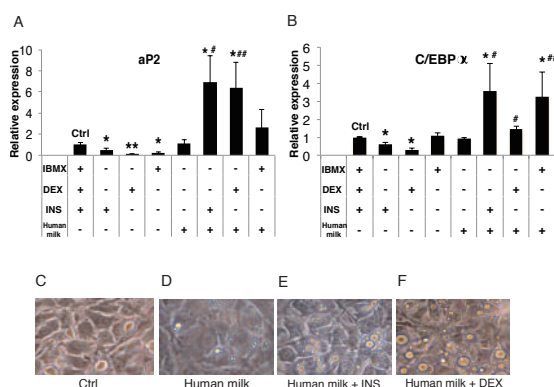


Figure 2

とを示唆する。

結果3：母乳の前駆脂肪細胞分化誘導作用は脂質成分が担う

母乳より抽出した脂質を添加した前駆脂肪細胞における前駆脂肪細胞に特異的な遺伝子の発現は(Pref1とTIMP3;前駆脂肪細胞から分化誘導刺激を受けて成熟脂肪細胞への分化が開始すると、速やかに発現減少→消失する)は、コントロール(標準的プロトコールによる分化誘導)と同程度に減少しており、成熟した脂肪細胞のマーカーであるCEBPβはコン

トロールと同程度の発現誘導が認められ、aP2 は強い発現の上昇を認めた。これらの効果は、人工乳には認められなかった。

以上の結果より、母乳中の脂質成分に強い脂肪細胞分化作用があることが確認された(Figure 3)。

結果 4 : 母乳脂質は、成熟した脂肪細胞への分化誘導刺激として十分である

さらに、母乳脂質単独で分化誘導された前駆脂肪細胞が、成熟した脂肪細胞まで分化するかを確認した。前駆脂肪細胞の段階で標準的プロトコールにより分化誘導された脂肪細胞と、母乳脂質のみで処理された脂肪細胞を、Day10 まで培養したのち RNA を回収し、成熟脂肪細胞のマーカーである遺伝子(PPAR γ 、aP2、レプチン)の発現を調べた。その結果、母乳脂質により分化誘導された脂肪細胞には、成熟脂肪細胞に発現する遺伝子の有意な上昇が確認されたことより、母乳脂質中には、前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞

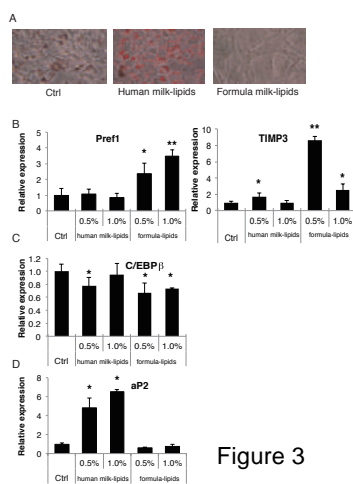


Figure 3

細胞にまで分化させるのに必要十分な作用を有する生理活性脂質が含有されている可能性が強く示唆された(Figure 4)。

結果 5 : 母乳脂質は、成熟脂肪細胞における SCD1 と aP2 の発現を低下させる

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にて、母乳から抽出した脂質を添加した脂肪細胞で有意にその発現が低下している遺伝子として aP2 と SCD1 があきらかとなった。とくに SCD1 は、その発現抑制はアンチメタボリックシンドロームに繋がることが知られているリポジェニック遺伝子であり、母乳脂質による肥満抑制効果に関与する可能性が示唆された。

結果 6 : 質量顕微鏡による脂肪滴中の中性脂肪の特性の解析

質量顕微鏡(Imaging Mass Spectrometry: IMS) は生体組織などの試料を直接、質量分析にかけることで、様々な生体分子の二次元の局在情報を取得可能な手法である(Figure 5)。特にマトリクス支援レーザー脱離イオン化(Matrix associated Laser desorption/ionization: MALDI)を用いた MALDI-IMS はソフトイオン化によって様々な脂質の分子種の局在を解析することができるため、脂質の機能研究において有効な手法である。

まずは、以下の方法でサンプルを調整した。

1. 培養 Dish の中に、IMS 用のスライドガラスを整地して、通常通り 3T3-L1 細胞を培養する。分化誘導後の脂肪細胞ははがれやすくなるが、分化誘導後 7 日までの脂肪細胞は、スライドガラスへのコーティングなしでも問題

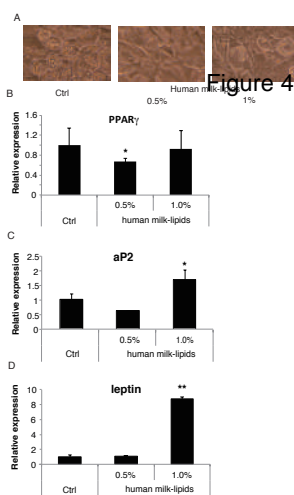


Figure 4

なく培養可能であった。2. 培養が終わったスライドガラスは 50-100 mM Ammonium Bicarbonate の溶液に浸して、細胞表面を軽く洗う。3. 液体窒素で冷やしておいたアルミブロックの上にスライドガラスを乗せて、急速に凍結する。4. 凍結しているまま、SpeedVac 内で 3 時間程度乾燥させる。その後 IMS へ供する。この方法にて、スライドガラス上の成熟脂肪細胞の解析が可能となった。準備実験により、複数の脂肪酸によって脂肪滴中のトリグリセライドが構成されているシグナルを得た。しかしながら、本研究期間では、以下の問題を解決することができなかったため、有意な結果を得ることができなかった。問題点 1. 我々の施設における MALDI 装置は、空間分解能が 10 μ m である。分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪滴は、最大でも直径が 20 μ m 程度であり、数点しか空間分解像を得ることが出来なかった。そのため、研究における目的の一つである脂肪酸種の局在の解析が不可能であった。2. 装置に供する場合、サンプルの凍結乾燥が必須である（装置内が真空であるため）。そのため、細胞の形態変化が避けられず、とくに研究対象である脂肪滴の形態変化が著明であった。このことも、脂肪酸種の局在解析を困難にした理由の一つとなった。これらの問題を解決する方法として、以下の検討を行い、研究を継続する予定である。検討項目 1. 条件設定の変更 同装置を用いて条件を細かく検討し、1 つの脂肪滴あたりの少ない空間分解像を総合することにより、コントロール（一般的な分化誘導プロトコールにより分化誘導された脂肪細胞）

と母乳により分化誘導された脂肪細胞における脂肪滴を構成する脂肪酸種を解析できる可能性がある。さらに、コントロールと母乳処理群の分化脂肪細胞より抽出した総脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで測定する実験を開始した。このことでターゲットとする脂肪種を絞り込むことが可能となり、IMS の条件設定の一助となると予想される。

<参考文献>

1. Savino *et.al.*, Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? *Clin Endocrinology* 2009; 71:757-765
 2. Berman ES *et.al.*, Preparation of single cells for imaging mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2010; 656:253-65.
5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計 3 本)
1. Fujisawa Y *et al.*, Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical in printing*
 2. Fujisawa Y *et.al.*, Identification of AP2S1. Mutation and Effects of Low Calcium Formula in an Infant with Hypercalcemia and Hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* Dec;98(12):E2022-7, 2013.
 3. Fujisawa Y *et al.*, Y The lipid fraction of human milk initiates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Early Hum Dev.* 2013 89(9): 713-9, 2013.

[学会発表] (計 2 件)

1. シンポジウム「胎児期からのメタボリック
クシンドロームの発症基盤」メタボリック
クシンドローム発症予防における母乳栄
養の有用性に関する基礎的研究

第 85 回 日本内分泌学会学術総会 2012 4 月

19 日～21 日 名古屋国際会議場

2. 母乳が脂肪細胞に与える影響の解析

第 85 回 日本内分泌学会学術総会 2012 4 月

19 日～21 日 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜松医科大学医学部 小児科 助教

藤澤 泰子 U(Yasuko Fujisawa)

研究者番号 40402284

(2) 研究協力者

浜松医科大学医学部 検査部 岩原邦宏

浜松医科大学医学部 小児科 中川祐一

University of California, Davis Fumio

Matsumura