

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590120

研究課題名（和文） 血漿遊離脂肪酸分子種構成の栄養生理学的操作によるメタボリックシンドロームの改善

研究課題名（英文） Improvement of metabolic syndrome by altering molecular species composition of serum free fatty acid

研究代表者

川嶋 洋一 (KAWASHIMA YOICHI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：80126515

研究成果の概要（和文）：血漿中の遊離脂肪酸分子種のうち、パルミチン酸（PA）はオレイン酸（OA）、パルミトオレイン酸、シスバクセン酸に比べて、培養肝細胞およびラット肝において小胞体ストレス（ER ストレス）惹起能が高いことが明らかとなった。また、血清脂質低下薬クロフィブリン酸は PA の infusion による血中遊離脂肪酸上昇を抑制させるとともに、ER ストレスマーカーの発現を抑制した。以上より、血中遊離脂肪酸分子種レベルをコントロールすることで、肝臓の ER ストレスを低減できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Serum free fatty acid, especially palmitic acid (PA) is shown to induce endoplasmic reticulum stress marker expression, both in MacA RH7777 cells, and rats in vivo, while the effects of oleic acid, palmitoleic acid and cis-vaccenic acid were faint compared to PA. The induction of ER stress in liver induced by PA in vivo was protected by pretreatment of cofibrin acid. The results suggested that hepatic ER stress is protected by reducing the levels of free fatty acid, especially palmitic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：栄養科学、脂肪酸分子種

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国を中心として肥満、2型糖尿病、脂肪肝および高トリグリセリド（高VLDL）血症などの生活習慣病が増加しているが、これらの代謝性疾患の原因は血漿中の遊離脂肪酸が増加し、その結果インスリン抵抗性が生じることにあると考えられている。インスリン抵抗性が生じると、肝臓は血漿か

ら遊離脂肪酸を取り込んでトリグリセリドを蓄積したり（脂肪肝）、VLDLの血漿への分泌を異常に増やしたり（高VLDL血症）する。かなりの部分の遊離脂肪酸の起源は内臓脂肪組織と考えられているが、明確な証拠はない。遊離脂肪酸のうち、オレイン酸に関しては、高濃度で存在するときには endoplasmic reticulum stress (ER stress) ;

小胞体ストレス)を惹起し、それが肝臓におけるトリグリセリドの蓄積の原因となるが、中等度の濃度で存在するときには、ER stressを引き起こすことなく VLDL 分泌を適度に促進することが、近年、証明された。

血漿中の遊離脂肪酸はいずれの種類の脂肪酸も(ここでは、個々の脂肪酸を「脂肪酸分子種」と呼ぶことにするが)オレイン酸と類似した生理作用を示すのであろうと、明確な証拠がないまま、想像されてきた。ところが、最近、米国のグループによって、遊離脂肪酸のうちパルミトオレイン酸(炭素数が16、二重結合が1つのn-7系列の脂肪酸)にインスリン抵抗性を改善する強い効果が発見され、リポカインと命名された(Cao, H., et al., Cell 134: 933, 2008)。この発見は、これまで「遊離脂肪酸」とひとまとめに説明されてきた血漿中の非エステル型脂肪酸の病態生理学的な役割を遊離脂肪酸の総量だけで説明するのではなく、質、すなわち遊離脂肪酸を構成する個々の脂肪酸分子種について再検討する必要性のあることを示すものである。さらに、この発見は、遊離脂肪酸の脂肪酸分子種を人為的にコントロールすることによって、上述した代謝性病態の改善または増悪回避の可能性を示唆するものでもある。

本研究は、遊離脂肪酸の分子種構成を人為的にコントロールし、上述した代謝性疾患を改善または増悪回避する方法を開発するための基盤となる知見を得ることを目的とするものである。具体的には、(1)個々の脂肪酸分子種の直接的利用(血管内投与)、(2)食事性脂肪酸による脂肪酸分子種合成調節、(3)食事性脂肪酸と薬物の組合せによる脂肪酸分子種合成調節、によって、遊離脂肪酸の分子種構成を人為的にコントロールすることを試みる。

2. 研究の目的

肥満、2型糖尿病、脂肪肝および高トリグリセリド(高VLDL)血症など代謝性疾患の原因であるインスリン抵抗性と小胞体ストレスには、血漿の遊離脂肪酸が深く関わっているが、脂肪酸の一つ一つの種類で、病態生理的作用に全く異なる可能性が考えられ始めている。本研究は、食事性脂肪酸と脂肪酸代謝を変動させる薬物とを組合せて利用することによって、血漿の遊離脂肪酸分子種構成を病態の改善または増悪回避を可能とするものに人為的に変える方法の開発の基盤となる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養肝細胞を用いた脂肪酸分子種によるERストレス作用の評価: ラット肝臓由来細胞 MacA RH7777 細胞(3×10^5 cell)をwellに播種し、ウシ胎血清及び馬血清を各10%含むDMEM培地で48時間培養後、無結成で1.5%

BSA および脂肪酸を含むDMEM培地に交換し、さらに16時間培養した。細胞からtotal RNAを抽出し、特異的primerを用いた定量的RT-PCR法により、mRNA発現量を調べた。また、細胞をprotease inhibitor存在下で抽出し、Western blotting法により、タンパク質の発現量を調べた。

(2) 病態モデル動物を用いたERストレスの評価: 遺伝的に高血圧と肥満を呈する生活習慣病モデルラットSHR/ND-mcr cp/cp (SHR/NDcp)ラットと、その非肥満同胞であるSHR/ND-mcr-cp/m+ (SHR/ND+)ラット、および発生系統であるWistar Kyoto (WKY)ラットについて、肝臓および血清中の脂肪酸組成を詳細に解析した。また、肝臓、膵臓および筋肉組織からタンパク質を抽出し、Western blotting法により、ERストレスマーカータンパク質の発現量を調べた。

(3) 脂肪酸分子種によるERストレス作用の評価: Wistar ラットの頸静脈にカニューレを挿入し、palmitic acid(PA)、palmitoleic acid(POA)、oleic acid(OA)またはcis-vaccenic acid(CVA)をBSAに結合させ(6 mM FA、7.4% BSA in saline)、1.5 mL/hrで6時間infusionを行った。終了後、血液および組織を採取し、凍結保存した。組織からRNAを抽出し、前述の方法でERストレスマーカー遺伝子の発現量を解析した。

(4) 食餌性脂肪酸種によるERストレス惹起の評価: SHR/NDcpラットを、低割合(5%、w/w)または高割合(18.8%、w/w)のサフラワー油または魚油を含むAIN93M飼料で4週間飼育し、肝臓を採取し、CHOPおよびGRP78のmRNA発現量を調べた。

(5) 薬物による血中遊離脂肪酸分子種のコントロール: ラットにクロフィブリン酸0.3%を含む飼料を1週間摂食させ、その後(2)と同様にPAを静脈よりinfusionした。その後m血液及び肝臓を採取し、血清中の遊離脂肪酸分子種濃度および肝臓のERストレスを評価した。

(6) 脂肪酸の化学合成: 市販されていない遊離脂肪酸分子種を ^{14}C 標識するため、Hahnらの方法を改良し、臭化アルキルと脂肪族アルデヒドからWittig反応を鍵反応として合成した。

4. 研究成果

(1) 培養肝細胞を用いた脂肪酸分子種によるERストレス作用の評価: 遊離脂肪酸の濃度上昇がERストレスを惹起し、インスリン抵抗性を誘発することが知られているので、脂肪酸分子種によるERストレス惹起能の違いを評価した。MacA RH7777細胞を用いて、PA、POA、OAまたはCVAを添加し、16時間培養した際の、78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)とC/EBP homologous protein

(CHOP) の mRNA およびタンパク質発現量を検討した (図 1)。0.8 mM PA によって GRP78、CHOP とともに mRNA レベルの上昇に伴ってタンパク質発現量が増加した。一方、同濃度の POA、OA、CVA には影響は認められなかった。

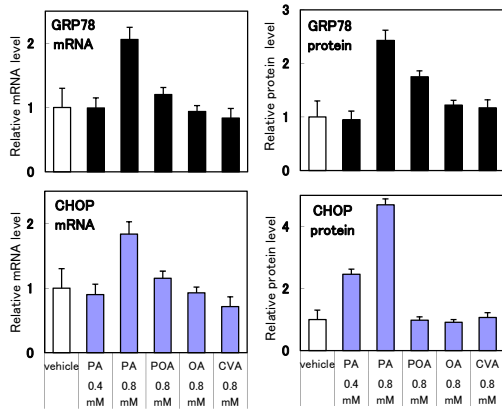


図 1 MacA RH7777 細胞における脂肪酸分子種による ER ストレス惹起作用

(2) 病態モデル動物を用いた ER ストレスの評価: SHR/NDcp ラットはインスリン抵抗性を示すことが知られているので、肝臓における GRP78、CHOP および XBP-1 遺伝子発現レベルを評価した。図 2 に示すように、非肥満同胞である cp/m+ および正常ラットである WKY との有意な差は認められなかった。そこで、血清中の遊離脂肪酸濃度を測定したところ、総遊離脂肪酸、PA、POA、OA、CVA とともに、群間に差は認められなかった (図 3)。これらの結果から、SHR/NDcp ラットにおいては、血中遊離脂肪酸レベルの上昇とこれに伴う ER ストレスは発生していないものと考えられる。

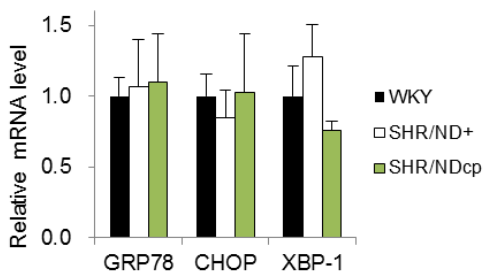


図 2 SHR/NDcp ラット肝臓における ER ストレス関連遺伝子発現

(3) 脂肪酸分子種による ER ストレス作用の評価: 次に、脂肪酸を静脈内に注入することにより、血中遊離脂肪酸濃度を上昇させ、ER ストレスを惹起することを試みた。肝臓において PA により XBP-1 および GRP78 の mRNA レベルが上昇した。また、XBP-1 レベルの上昇は OA と CVA でも認められた (図 4)。タンパク質の発現量の変化は mRNA ほど大きくなかった。

ク質の発現量の変化は mRNA ほど大きくなかった。

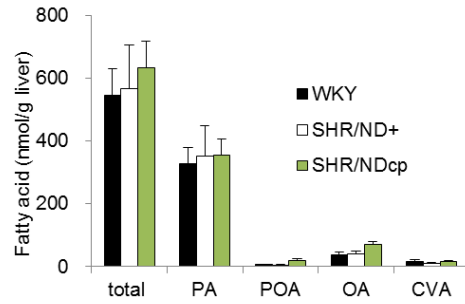


図 3 SHR/NDcp ラット血清中の遊離脂肪酸量

脾臓および筋肉についても評価を行ったが、これらの組織においては GRP78 や XBP-1、CHOP の発現量に変化は認められなかった。脂肪酸を 6 時間注入した直後の血清中遊離脂肪酸濃度を定量したところ、血清中の遊離脂肪酸濃度に若干の上昇が認められたものの、注入した脂肪酸のレベルの顕著な上昇は観察されなかった (図 5)。この結果から、血中の遊離脂肪酸は速やかに組織に取り込まれるものと考えられる。

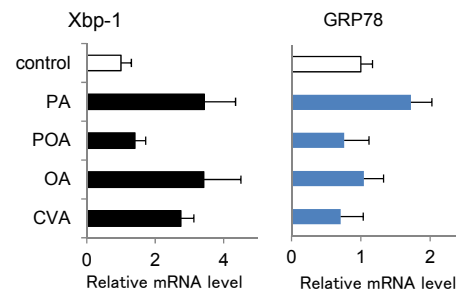


図 4 脂肪酸分子種の注入によるラット肝臓 ER ストレスの惹起

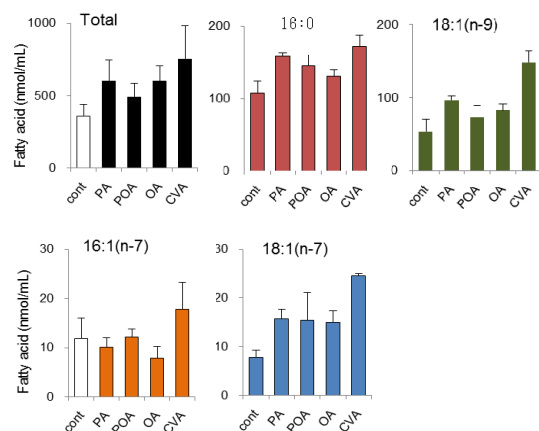


図 5 脂肪酸注入時の血清遊離脂肪酸濃度

(4) 食餌性脂肪酸種による ER ストレス惹起の評価：SHR/NDcp ラットを、低割合 (5%、w/w) または高割合 (18.8%、w/w) のサフラワー油または魚油を含む AIN93M 飼料で飼育し、肝臓中の ER ストレスを評価した。SHR/NDcp ラットにおいて、肝臓中の CHOP および GRP78 の mRNA 発現量は、試料の違いによる影響をほとんど受けなかった。この結果から、SHR/NDcp ラット肝臓の ER ストレスは、サフラワー油や魚油を高濃度で含む資料を与えても増悪しないものと考えられる。

(5) 薬物による血中遊離脂肪酸分子種のコントロール：クロフィブリン酸を前もって摂取させたラットにおいて、肝臓の ER ストレスを評価したところ、PA による XBP1 および GRP78 発現量の上昇が抑制される傾向が認められた (図 6)。また、この時の血清中の遊離脂肪酸濃度を評価したところ、クロフィブリン酸により PA や OA 濃度が低下し、control レベルに近づいた (図 7)。

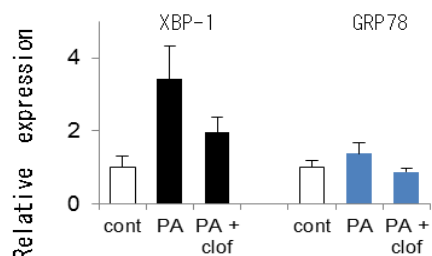


図 6 パルミチン酸注入による肝 ER ストレスに対するクロフィブリン酸の影響

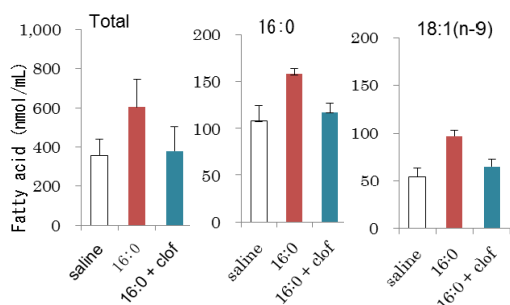


図 7 パルミチン酸注入時の血中遊離脂肪酸分子種濃度に対するクロフィブリン酸投与の影響

(6) 脂肪酸の化学合成：本法の改良点はアルコール **1** の水酸基の保護にシリル基を用い、ホスホニウム塩 **3** からシスオレフィン **4** の Wittig 反応の収率を大幅に改善したことにある。また、 $K^{14}CN$ を用いる ^{14}C 標識化脂肪酸類の合成への応用を可能にするため、メシル体 **5** から目的の遊離脂肪酸 **8** への反応操作を簡便にし、高収率も実現した。本法により、アルコール **1** より 7 工程、全収率 20% でパ

ルミトオレイン酸 **8** を得ることが可能となった (図 8)。今後は、本放射標識脂肪酸を用いて、脂肪酸分子種の代謝的運命を明らかにする予定である。

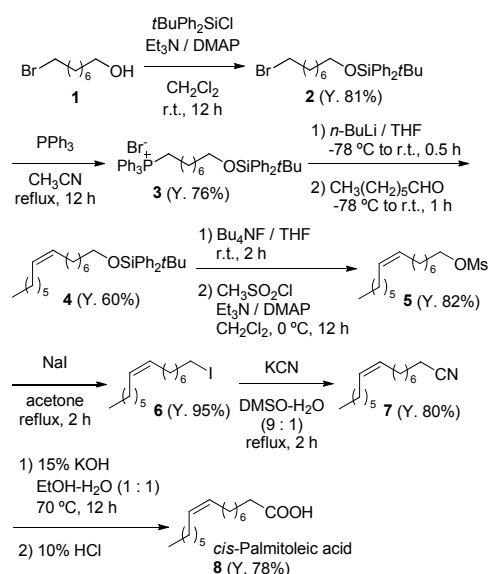


図 8 ^{14}C 標識脂肪酸分子種の合成

以上、上記 (1) ~ (6) の結果をまとめると、血中遊離脂肪酸は分子種によって ER ストレス惹起能が大きく異なっており、飽和脂肪酸である PA は、モノエン酸である POA、OA、CVA に比べて強い作用を持つことが、in vivo および in vitro で示された。肥満、インスリン抵抗性を示す SHR/ND-cp ラットにおいては、血中遊離脂肪酸レベルは特に上昇しておらず、また、肝臓においても顕著な ER ストレスは認められなかった。さらにこのラットに高脂肪食 (サフラワー油、魚油) を負荷しても、ER ストレスの増加は認められなかった。一方、クロフィブリン酸を事前に投与することにより、血中の遊離脂肪酸濃度の低下を伴って PA で惹起された肝臓の ER ストレスを低減されることが明らかとなった。

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 4 件)

- ① Hirose, A., Yamazaki, T., Sakamoto, T., Sunaga, K., Tsuda, T., Mitsumoto, A., Kudo, N. and Kawashima, Y., Clofibric acid increases the formation of oleic acid in endoplasmic reticulum of the liver of rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 査読あり、116, 2011, 362-372
DOI: 10.1254/jphs.11020FP
- ② Yamazaki, T., Okada, H., Sakamoto, T.,

Sunaga, K., Tsuda, T., Mitsumoto, A., Kudo, N. and Kawashima, Y., Differential Induction of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2 genes by fibrates in the liver of rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読あり、35, 2012, 116-120. DOI: 10.1248/bpb.35.116

- ③ Tanaka, S., Yagi, Y., Yamazaki, T., Mitsumoto, A., Kobayashi, D., Kudo, N., Kawashima, Y., Characterization of fatty acid profile in the liver of SHR/NDmcr-cp (cp/cp) rats, a model of the metabolic syndrome. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読あり、35, 2012, 184-191. DOI: 10.1248/bpb.35.184
- ④ Yamazaki, T., Wakabayashi, M., Ikeda, E., Tanaka, S., Sakamoto, T., Mitsumoto, A., Kudo, N., Kawashima, Y., Induction of 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase genes by fibrates in the liver of rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読あり、35 (2012) 1509-1515. DOI: 10.1248/bpb.b12-00243

[学会発表] (計 11 件)

- ① 田中昭宏、山崎 研、工藤なをみ、川嶋洋一、TSOD マウスの脂肪酸代謝の解析、日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 29 日、静岡)
- ② 堤 大輔、山崎 研、工藤なをみ、川嶋洋一、GK ラットにおける高脂肪高スクロース食摂取の影響、日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 29 日、静岡)
- ③ 田中静代、沢田祐一、山崎 研、工藤なをみ、川嶋洋一、SHR/NDmcr-cp ラットの脂肪酸合成に対するベザフィブラートの効果、日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 29 日、静岡)
- ④ 山本博基、池ノ上智代、佐藤悠平、早坂尚子、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、TSOD マウスの脂質代謝に対する bezafibrate および metformin の影響、第 55 回日本薬学会関東支部大会 (平成 23 年 10 月 8 日、東邦大学)
- ⑤ 岡田仁美、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、Stearoyl-CoA desaturase 遺伝子発現に対する fibrate 系薬物の影響、第 55 回日本薬学会関東支部大会 (平成 23 年 10 月 8 日、東邦大学)
- ⑥ 田中静代、沢田祐一、工藤なをみ、川嶋洋一、2 型糖尿病モデル SHR/NDmcr-cp/cp ラットの肝オレイン酸合成に対する bezafibrate および metformin の効果、第 55 回日本薬学会関東支部大会 (平成 23 年 10 月 8 日、東邦大学)

- ⑦ 田中静代、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、SHR-/NDmcr-cp ラットにおけるトリグリセリド蓄積機構の解析、日本薬学会第 132 年会 (平成 24 年 3 月 31 日、北海道大学)
- ⑧ 田中静代、桑原沙季、師富ユキ、藤井拓也、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、SHR/NDmcr-cp/cp ラットの肝 TG 合成に対する食餌性脂肪酸摂取の影響、第 56 回日本薬学会関東支部大会 (平成 24 年 10 月 13 日、昭和大学)
- ⑨ 武藤由季、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、クロフィブリン酸によるリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの誘導、第 56 回日本薬学会関東支部大会 (平成 24 年 10 月 13 日、昭和大学)
- ⑩ 桑原沙季、藤井拓也、田中静代、山崎研、工藤なをみ、川嶋洋一、SHR/NDmcr-cp/cp ラットの肝トリグリセリド代謝に対する魚油の効果、日本薬学会第 133 年会 (平成 25 年 3 月 29 日、横浜)
- ⑪ 山崎研、池田英里香、横田のぞみ、布施啓、工藤なをみ、川嶋洋一、フィブレートによる肝 LPCAT の誘導とリン脂質組成の変動、日本薬学会第 133 年会 (平成 25 年 3 月 29 日、横浜)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川嶋 洋一 (KAWASHIMA YOICHI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：80126515

(2) 研究分担者

山崎 研 (YAMAZAKI THORU)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：9037299

坂本 武史 (SAKAMOTO TAKESHI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：20187040