

膵臓β細胞における脂肪毒性の可視化

—毒性を緩和する食品成分の探索に向けて—

Visualization of "lipotoxicity" against pancreatic β-cells
—For screening of functional food components that suppress the lipotoxicity—

鈴木 真理子

Mariko Suzuki

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード：膵臓β細胞，遊離脂肪酸，インスリン分泌

Key words : Pancreatic β-cells, Free Fatty Acids, Insulin Secretion

1. 研究目的

近年，世界的に2型糖尿病患者の増加が問題となっているが，2型糖尿病の発症機序としては，血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンの分泌障害と作用障害の2つがあげられる。

肥満・メタボリックシンドロームの状態はインスリンの作用障害，いわゆる「インスリン抵抗性」を引き起こすことが知られている。長期的なインスリン作用障害は徐々にインスリン分泌障害を誘引して糖尿病の悪化を招くが，インスリン作用障害が引き起こす高脂肪酸血の状態が，膵臓β細胞に与える「脂肪毒性」が注目されている。高脂肪酸血の状態が続くと，膵臓β細胞のインスリン分泌量は減少し，最終的には細胞死が引き起こされる。脂肪酸の中では飽和脂肪酸の毒性が強いことが知られており，小胞体やミトコンドリアの機能障害，細胞内Ca²⁺の流れの異常を通して影響を与えると考えられているが，脂肪酸ごとの作用機序の違いや毒性の違いについての情報は少ない。

細胞内Ca²⁺はインスリン分泌の最終シグナルであり，細胞内Ca²⁺を制御する小胞体Ca²⁺濃度の変動はインスリン分泌に強い影響を与える。平成29年度修士論文において，遊離脂肪酸が小胞体に与えるストレスを可視化する目的で小胞体内Ca²⁺濃度変化を観察し，パルミチン酸が強い小胞体ストレスを与えることを報告している。一方，小胞体Ca²⁺濃度の変動はミトコンドリア内Ca²⁺濃度の上昇を誘引し，最終的には細胞死に繋がるとみられている。以上を踏まえ，昨年度の卒論研究ではミトコンドリアの受けるストレスの観察に取り組み，

ミトコンドリア内Ca²⁺の可視化を行った。

本研究では，ミトコンドリアCa²⁺の変動が脂肪酸ごとの脂肪毒性の違いとどのような関係にあるか精査することによって，脂肪酸毒性の可視化システムとして構築し，将来的には，脂肪毒性を緩和させる食品成分の探索につなげることを目的としている。具体的には，細胞死につながるミトコンドリアストレスの可視化に取り組む。小胞体ストレスとミトコンドリアストレスの複数のパラメーターを同時に「見る」ことによって，脂肪酸ごと食品成分ごとの影響を多面的に捉えようと試みている。糖尿病発症機序の理解につながり，食品成分の摂取の仕方などの情報を正しく伝えることに寄与すると考えられる。

2. 研究実施内容

今年度行ったのは，主に，実験で扱う細胞の種類の見直し，細胞への蛍光たんぱく質の遺伝子導入効率の見直し，ミトコンドリア機能(ATP産生能)に脂肪酸毒性が与える影響の見直しである。

細胞の種類の見直し：卒論研究時に用いたラット由来細胞株INS-1は，グルコース感受性が高くなく，ATP濃度変化や膜電位変化の違いを検出にくい細胞である。そのため，本研究では，新たにグルコース感受性が高いとされるマウス由来細胞株MIN-6の使用を見直し検討した。MIN-6細胞は，大阪大学医学部の宮崎純一教授より提供いただいた。

MIN-6細胞とINS-1細胞について，脂肪毒性に対する反応性，蛍光観察のしやすさ，蛍光たんぱ

く質の遺伝子導入効率などについて、検討を行った。その結果 MIN-6 は、グルコース感受性は高いが、脂肪毒性に対する反応性が低く、また、遺伝子導入効率も低いなど本実験目的に適さない特徴が複数明らかとなった。そのため、INS-1 細胞を用いて改めて種々の条件を調整・検討した。

ATP 結合性蛍光タンパク質 GO-ATeam の遺伝子導入条件の検討：ATP 濃度の可視化には、ATP 結合性蛍光タンパク質 GO-ATeam を遺伝子導入する必要がある。細胞質の ATP 濃度を定量でき ATP 結合定数の異なる 2 種類の GO-ATeam である Cyto1, Cyto2 を INS-1 細胞に導入して検討したところ、より少量の ATP 量変動の反応を観察できる Cyto2 が適していることがわかった。

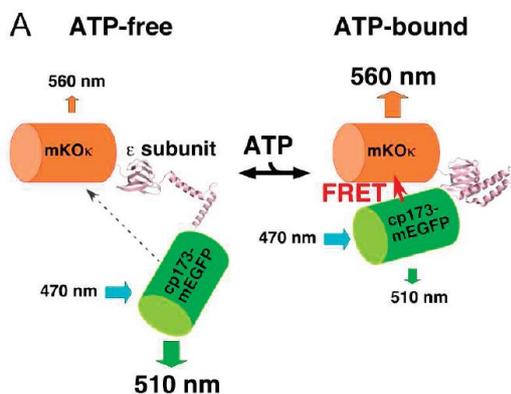


図 1. ATP 結合性蛍光タンパク質 GO-ATeam¹⁾

ミトコンドリア機能に脂肪酸が与える影響の検討：GO-ATeam Cyto2 を遺伝子導入して、グルコース添加後の細胞質内 ATP 濃度変化に脂肪酸添加が与える影響を調べた。不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (OA)、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) をそれぞれ添加した培地で培養した細胞をもちいて、グルコース添加後の ATP 濃度変化に影響があるか調べたところ、OA 処理、PA 処理はいずれも、グルコース添加後の ATP 産生速度に大きな影響を与えないことが示唆された。

3. まとめと今後の課題

本研究では、今年度は、脂肪毒性の可視化に向けて、まず蛍光観察実験を行う細胞系や観察条件の確立を目標とした。使用細胞、蛍光たんぱく質の遺伝子導入条件の検討を行い、グルコース添加後の ATP 産生速度を調べた。

今後の予定としては、グルコース添加後のミトコンドリア内 ATP 濃度変化、ミトコンドリア膜位の変化など、基本的なミトコンドリア機能についてさらに調べ、脂肪酸添加がミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度変化に与えている影響が、何に由来しているかの基礎的データを収集しながら、観察する脂肪酸の種類を追加を予定している。現在は、不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸から 1 種類ずつ用いているが、二重結合の数や立体配位、炭素数の数などが異なる脂肪酸を用いる予定である。

これらの条件の検討・確定が済んだ後、結果に応じて食品成分の添加実験に進む予定である。

4. 引用論文

- [1] Masahiro Nakano, Hiromi Imamura, et al. “Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicator”, ACS Chem. Biol. 6, 2011, 709–715
dx.doi.org/10.1021/cb100313n

5. 主要参考文献

- [1] 川久保愛美, 「小胞体ストレスがインスリン分泌に与える影響: 小胞体カルシウムを観る」大妻女子大学, 2017年, P.1~41
[2] 鈴木真理子, 「膵臓β細胞のインスリン分泌機構に遊離脂肪酸が与える影響」大妻女子大学, 2019年, P.1~28

6. この助成による発表論文等

①学会発表

- [1] Mariko Suzuki, Megumi Kawakubo, Naoko Iida-Tanaka, “Visualization of mitochondrial Ca^{2+} flux in pancreatic INS-1 cells cultured by the medium with high concentration of fatty acids.” The 6th International Symposium on Bioimaging, 2019.09.21-22, Teikyo University (Tokyo, Itabashi-city)
[2] 鈴木真理子, 川久保愛美, 田中直子, 「高脂肪酸環境が膵臓β細胞株 INS-1 細胞の細胞内脂肪酸輸送に与える影響」, 日本薬学会 第 140 年会, 2020 年 3 月 28 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市) (Web 発表)