

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。2型糖尿病は，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，インスリン抵抗性増加による作用障害の2つが相まって発症する。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，これはインスリン作用障害が引き起こす血中脂肪酸濃度の上昇（高脂肪酸血）が一因と考えられており，これを「脂肪毒性」と呼んでいる。

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。飽和脂肪酸は毒性が強いことがすでに知られており，小胞体ストレスと細胞内Ca²⁺動態の異常がインスリン分泌の低下や細胞死を引き起こしていると考えられている。一方，不飽和脂肪酸の脂肪毒性に関してはあまり研究されておらず，脂肪酸の種類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。

平成29年度修士論文において，飽和脂肪酸であるパルミチン酸が強い小胞体ストレスを与える一方，不飽和脂肪酸であるオレイン酸も，細胞死を誘引する酵素の発現量を増加させ，ミトコンドリア酸化ストレスを増加させている可能性が示唆された。

以上を踏まえ，本研究では，小胞体とミトコンドリアという，インスリン分泌機構および細胞死に深く関わる，2つの細胞内オルガネラの機能異常を，ミトコンドリアのパラメーターを可視化することで一元的に評価することを目的とした。飽

和脂肪酸であるパルミチン酸（PA）または不飽和脂肪酸であるオレイン酸（OA）を添加して培養した細胞で，グルコース添加後の細胞内ATP濃度，ミトコンドリア膜電位，ミトコンドリアCa²⁺濃度の各変化を測定し，それらの結果から各脂肪酸がミトコンドリアおよび小胞体に与えるストレスについての可視化を行い，総合的に判断することを試みた。

2. 研究実施内容

ラット膵臓β細胞由来INS-1細胞を用いて，0.8% BSAを含む培養培地にパルミチン酸（PA）またはオレイン酸（OA）を200μM濃度で添加し，6日間培養後，細胞内ATP濃度，ミトコンドリア膜電位，ミトコンドリアCa²⁺濃度を以下のように観察した。蛍光観察はすべてグルコース添加後の変化で観察した。

細胞内ATP濃度の観察：ATP結合性蛍光タンパク質GO-ATeam（京大・今村博臣准教授より供与）を蛍光観察3日前に遺伝子導入し，緑色蛍光を示す非結合型（励起487nm / 観察510nm）と，オレンジ色蛍光を示すATP結合型（励起487nm / 観察560nm）の蛍光強度比を観察した。

膵臓β細胞では，グルコースはそのほとんどが好氣的に代謝されるため，細胞内ATP濃度変化はミトコンドリアにおけるATP合成速度を反映していると考えられる。グルコース添加後の細胞内ATP濃度の増加率を解析したところ，Control細胞，PA処理細胞では，10～20分後に最も増加率が高く，20分後以降は低下してATP合成速度が緩やかにな

った。これに対して、OA 処理細胞では 0～10 分後に最も増加率が高く、40 分後まで Control 細胞に対して有意に高かった。OA を添加して 6 日間培養することによって、グルコース添加後の ATP 合成速度が高まっており、グルコース感受性が高まっている可能性が示唆された。

ミトコンドリア膜電位の観察：膜電位依存性蛍光色素 TMRE を用い、励起光 553 - 550 nm で生じた 575 nm 以上の蛍光を観察した。

ミトコンドリア膜電位は、グルコースの代謝に伴って生成する H^+ がミトコンドリアの膜間に一時的に増加することによって上昇し（過分極）、その H^+ が ATP 合成に利用されて H_2O に変わると低下する。Control 細胞では、グルコース添加直後に上昇し、その後徐々に低下する様子が観察された。一方、PA 処理細胞ではグルコース添加直後の膜電位変化が小さかった。グルコース代謝系の活性が低下していると考えられ、グルコース感受性の低下が示唆された。OA 処理細胞では、グルコース添加後の上昇は Control 細胞と同程度であったが、その後の低下が緩やかで 7～15 分の間、Control 細胞より高い膜電位が維持されていた。膜電位が高めに維持されることによってミトコンドリアで産生される活性酸素が増加している可能性が考えられ、血中 OA 濃度の上昇により、ミトコンドリア酸化ストレスが増加している可能性が示唆された。

ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度の観察：ミトコンドリア移行性の Ca^{2+} 結合性蛍光タンパク質 CEPIA2mt (Addgene より購入) を蛍光観察 3 日前に遺伝子導入し、励起光 460 - 495 nm / 蛍光観察 510 - 550 nm で観察を行った。細胞を事前に 1 μ M タブシガルギンで室温 30 分間処理し、小胞体内 Ca^{2+} ストックを枯渇させた場合の Ca^{2+} 変化の観察も行った。

Control 細胞では、グルコース添加直後に上昇後、いったん低下し、10 分後から再びゆっくりと上昇して 20～40 分の間はグルコース添加前の蛍光強度の 1.4 倍程度を維持していた。これに対して、PA 処理細胞では、前半、後半いずれの濃度上昇も小さかった。一方 OA 処理細胞では、前半の Ca^{2+} 濃度が高く、後半は PA 処理細胞と同程度に下がる様子が観察された。グルコース添加後のミトコンド

リア Ca^{2+} 濃度変化のうち、前半の上昇は ATP 合成と密接に関係があり、後半の濃度上昇は小胞体機能と密接に関係があると考えられた。前半の濃度変化の結果から、PA 処理細胞のグルコース感受性の低下が、後半の結果から PA 処理細胞、OA 処理細胞のいずれにおいても小胞体ストレスが見られることが示唆された。

3. まとめと今後の課題

膵臓 β 細胞の、インスリン分泌能および細胞死に密接に関わる、ミトコンドリアおよび小胞体の機能低下を、一元的に可視化する方法を模索し、ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度変化の観察が有望な方法であることを示した。

また、小胞体ストレスを誘引することが知られていた PA が、ミトコンドリア機能低下も引き起こしていること、OA はミトコンドリア電子伝達系の活性化と酸化ストレスの増加を通して細胞ストレスを引き起こしている可能性が高いことを見出した。膵臓 β 細胞に与える影響が、脂肪酸の種類によって異なることを示した。

今後は、ミトコンドリア酸化ストレス、アポトーシス誘導の可視化を行い、これまで明らかにされてこなかった不飽和脂肪酸であるオレイン酸による膵臓 β 細胞への影響についてさらに調べていく予定である。また、多価不飽和脂肪酸や、炭素数の異なる種類の脂肪酸による脂肪毒性の影響の評価、さらに、それらに影響を与える食品成分の探索へと繋げていきたいと考えている。

4. この助成による発表論文等

①学会発表

[1]鈴木真理子他「脂肪酸が膵臓 β 細胞の小胞体及びミトコンドリアに与える影響」、第 29 回バイオイメージング学会学術集会、2020 年 11 月 20 日、生命創成探究センター（愛知県・岡崎市）（オンライン開催）

[2]鈴木真理子他「高脂肪酸環境が膵臓 β 細胞のミトコンドリア機能に与える影響」、日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 27 日、広島大学（広島県・広島市）（オンライン開催、発表確定）