

# 脂肪酸が膵臓β細胞のミトコンドリア機能に与える影響

## —脂肪毒性の正体—

Effects of free fatty acids on pancreatic β-cell mitochondrial function.

—Identity of 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 博士後期課程

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

現在、2型糖尿病患者の増加が世界的に問題視されている。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引き起こすが、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、「脂肪毒性」と呼ばれている。

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、最終的にはアポトーシス(細胞死)を引き起こされる。脂肪酸のうち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Ca<sup>2+</sup>動態の異常がインスリン分泌の低下やアポトーシスを引き起こしていると考えられている。一方で、不飽和脂肪酸については脂肪毒性が低いと考えられ、脂肪酸の構造と細胞への影響の関係についての研究は少なかった。しかし近年、二重結合の有無や炭素数の違いなどを遊離脂肪酸の「質」として考慮した研究の必要性が高まってきている。

著者のこれまでの研究で、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(OA)はミトコンドリアエネルギー代謝を活性化すること、その結果としてミトコンドリア酸化ストレスを増加させ、アポトーシス(細胞死)誘導傾向が高まっている可能性が考えられることを報告してきた。

本研究では、脂肪酸の二重結合の有無や炭素鎖

の長さといった「質」の違いが細胞に与える影響を明らかにする目的で、オレイン酸(OA)がインスリンを分泌する膵臓β細胞に与える影響の内容把握と評価を行った。並行して、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸のそれぞれについて、炭素鎖の長さの違いが与える影響を4年生との共同研究で試みた。

### 2. 研究実施内容

ラット膵臓β細胞由来INS-1細胞を用いた。脂肪酸は0.8% または2.0% BSAを含む培養培地に200 μMで添加して1~7日間培養した後、各実験を行った。

**オレイン酸添加が与えるミトコンドリアストレスの評価**：オレイン酸(OA)添加が膵臓β細胞に与える影響を、細胞内活性酸素量の定量、アポトーシス誘導酵素caspase3活性の定量、ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>濃度変化を測定し、飽和脂肪酸であるパルミチン酸(PA)の結果と比較評価した。

**(1)細胞内活性酸素量**：ミトコンドリアでATPが産生されると同時に活性酸素も生成する。必要不可欠な活動の産物であるが、産生量の増加は細胞障害を高め、アポトーシスを引き起こす。この実験では、活性酸素種(ROS)量を蛍光色素CellROX Green(Thermo Fisher Scientific, 励起波長: 460 - 495 nm / 観察波長: 510 - 550 nm)を用いて定量した。

OA または PA を添加した培地で7日間培養後、一晚脂肪酸抜きおよび低グルコース処理を行ったINS-1細胞について、グルコース添加後の活性酸素

生成量を蛍光強度で定量したところ、OA 処理細胞の活性酸素量は PA 処理細胞より高く、また、グルコース添加後の上昇も大きかった。OA はミトコンドリアエネルギー代謝の活性化を通して 活性酸素産生を促進していることが示された。

(2)アポトーシス誘導傾向の評価：アポトーシスの誘導は、細胞量を減少させインスリン分泌量の低下を招く。OA または PA 添加培地で 1~7 日間培養した細胞について、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアポトーシスの誘導されやすさを、アポトーシス誘導酵素 caspase3 の活性を測定することによって評価することを試みたが、良い結果が得られなかった。今後は、初期アポトーシス変化を蛍光観察する方法を試みる予定である。

(3)ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>濃度の観察：ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>濃度は、ミトコンドリアエネルギー代謝の状態を反映するとともに、インスリン分泌の最終シグナルである細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を制御する小胞体の状態も反映している。この実験では、小胞体移行性の Ca<sup>2+</sup>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 で観察を行うことにより、グルコース添加後のミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>濃度変化を調べた。

OA または PA 添加した培地で 6 日間培養後、一晚脂肪酸抜きおよび低グルコース処理を行った INS-1 細胞について、グルコース添加後のミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>濃度変化を観察したところ、OA 処理細胞では、グルコース添加後のエネルギー代謝が活発で、小胞体ストレスは少なめであり、ミトコンドリアストレス型であることが確認できた。PA 処理細胞は小胞体ストレス型の Ca<sup>2+</sup>推移を示した。

**脂肪酸の質の違いが細胞内ストレスに与える影響**：二重結合の有無および炭化水素鎖の長さの違いが細胞内ストレスに与える影響を、4 年生との共同研究で調べた。各脂肪酸を添加した培地で 7 日間培養し、Realtime PCR 法を用いて、酸化ストレス、小胞体ストレス、アポトーシス関連タンパク質の発現量を定量した。

(1)ステアリン酸(SA, 18:0)：飽和脂肪酸である PA(16:0)で処理した細胞では小胞体ストレス関連タンパク質の発現量が増加し、一方、不飽和脂肪酸である OA で処理した細胞では酸化ストレス誘導タンパク質 SOD およびアポトーシス誘導酵素

caspase3 の発現量が増加することをこれまで報告してきたが、SA 処理細胞は PA と似た傾向を示し、その発現量は PA より高かった。

細胞ストレスに与える影響は、二重結合の有無の影響が大きく、SA は PA と似た影響を持つこと、炭素数が多くなるほどその影響が大きくなることが示された。

(2)リノール酸(LA, 18:2)：SOD および caspase3 の発現量を増加させる不飽和脂肪酸型の影響をもち、その割合はオレイン酸(18:1)よりも大きかった。遊離脂肪酸の影響は二重結合の有無の影響が大きく、飽和脂肪酸型と不飽和脂肪酸型に分けることができること、二重結合の数が多くなるほどその影響は大きいことがわかった。

### 3. まとめと今後の課題

これまで細胞への毒性が報告されてこなかった OA 添加の影響について、ミトコンドリアエネルギー代謝を活発にし、細胞内活性酸素量、およびグルコース添加後の活性酸素増加率のいずれも高めることが明らかになった。

一方、脂肪酸における二重結合の数および炭素鎖の長さの違いが小胞体ストレス、酸化ストレス、アポトーシス誘導に与える影響を比較したところ、LA, OA(不飽和脂肪酸)は酸化ストレス/アポトーシス誘導型を示し、SA, PA(飽和脂肪酸)は小胞体ストレス型であることが明らかになった。二重結合の有無によって脂肪酸を選別する何らかの機構が細胞内に存在して細胞への作用を決める可能性が示唆された。

今後は、OA 添加が与える影響について、アポトーシス誘導、およびインスリン分泌を定量し、より総合的に評価し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]齋藤喜久恵, 鈴木真理子他「遊離脂肪酸が膵臓β細胞のミトコンドリア膜電位に与える影響〜トランス脂肪酸の影響〜」, 第30回バイオイメージング学会学術集会, 2021年9月9日, 大妻女子大学(東京都・千代田区)(オンライン開催)

[2]鈴木真理子他「高脂肪酸環境が膵臓β細胞の酸化ストレスに与える影響」, 日本薬学会 第142年会, 2022年3月26日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)(オンライン開催, 発表確定)