

遊離脂肪酸の質が膵臓β細胞の

インスリン分泌機能および障害機構に与える影響

Effect of structural differences in free fatty acids on insulin secretion
and oxidative stress resistance of pancreatic β-cells.

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，酸化ストレス耐性

Key words : Pancreatic β-cell, Free fatty acids, Insulin secretion, Oxidative stress resistance

1. 研究目的

2 型糖尿病の患者数の増加は世界的な課題となっているが、その発症要因の1つに肥満がある。肥満が脂肪細胞などのグルコースの取り込みに影響を与えて高血糖状態を引き起こすことがよく知られている。その一方で、肥満による長期的な高脂肪酸血の状態が、膵臓β細胞のインスリン分泌にも影響を与えて血糖コントロールの破綻を引き起こし、糖尿病の発症・増悪の原因となることが報告されている。具体的には、インスリン分泌機構を障害し分泌の遅れや減弱を引き起こす、細胞死を誘引して分泌細胞量自体を減少させる、などである。

また近年、遊離脂肪酸の「質」というものが注目されている。これは、遊離脂肪酸の炭化水素鎖の長さ（鎖長）や、二重結合の数といった、構造の違いが遊離脂肪酸を特徴付けることに焦点を当てたテーマである。すでに、飽和脂肪酸（パルミチン酸、PA など）は細胞毒性が強いことが知られる一方、不飽和脂肪酸（オレイン酸、OA など）は毒性が低いことが報告されているが、その詳細についての情報はまだ少ない。

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から産生される活性酸素量が増加し、細胞内の酸化ストレス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、これらの結果を踏まえて、遊離脂肪酸の二重結合の有無が膵臓β細胞の酸化ストレ

ス体制および細胞死誘導に与える影響を調べた。並行して、飽和脂肪酸の鎖長が短くなった中鎖脂肪酸がインスリン分泌機構に与える影響を、卒論生との共同研究で実施した。

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% BSAを含む培養培地に200 μMで添加して6~7日間培養した後、各実験を行った。

細胞障害機構への影響

小胞体ストレスを誘起する PA (C16:0) とミトコンドリアを活性化して細胞内活性酸素が増加している OA (C18:1) の比較を行った。外的要因として過酸化水素 (H₂O₂) を用いて酸化ストレスをかけたときの耐性について調べた。

（1）アポトーシス誘導酵素 Caspase-3 の活性：細胞内の活性酸素の増加は、アポトーシス誘導酵素 Caspase-3 を活性化して細胞死を引き起こす可能性がある。これまでの研究から、OA・PA 処理細胞において、Caspase-3 の mRNA 発現量が高まっていたことから、ここでは、H₂O₂ で酸化ストレスをかけた時の Caspase-3 活性について調べた。

H₂O₂ 処理後、PA 処理細胞では Control 細胞の約5倍以上と著しく高い活性が見られたが、OA 処理細胞の Caspase-3 活性に Control 細胞と有意差は見られなかった。

PA 処理細胞では、H₂O₂ 添加によって細胞死が迅速に誘導された。一方、OA 処理細胞では細胞内活性酸素量は Control 細胞と比較して高く、酸化スト

レスによるアポトーシス誘導が起こりやすいのではと推測していたが、Caspase-3の活性化反応はPA処理細胞に比較して遅い可能性が示唆された。

(2) 初期アポトーシスの経時変化：細胞死の初期反応の指標として使用される FITC-Annexin-V を用いて、 H_2O_2 で酸化ストレスを与えた後の初期アポトーシス誘導の様子を、FITC の蛍光強度変化で経時的に観測した。

PA 処理細胞は、 H_2O_2 を添加する前から Control 細胞の約 2.5 倍以上の蛍光強度を示し、 H_2O_2 添加後 40 分間の観察の間に徐々に蛍光強度が増加した。一方、OA 処理細胞は、 H_2O_2 添加前の蛍光強度は Control 細胞と差がなかったが、 H_2O_2 添加後は Control 細胞よりも蛍光強度の増加率が大きく、40 分後の蛍光強度は Control 細胞よりも有意に高かった。

PA 処理細胞では H_2O_2 添加前から初期アポトーシス状態にあり、 H_2O_2 添加後は素早くアポトーシスが誘導されるが、OA 処理細胞では、 H_2O_2 によって酸化ストレスを与えた場合に初めてアポトーシス誘導が開始され、その経過は Control 細胞より速いことが示された。

(3) 細胞生存率： H_2O_2 添加前と添加後 24 時間の細胞数をカウントし、 H_2O_2 添加による細胞の生存率を比較した。

細胞の生存率は PA 処理細胞と OA 処理細胞で高く、Control 細胞がもっとも低い、すなわち Control 細胞が酸化ストレスで最も細胞死を起こしやすいという結果になってしまい、これまでの実験結果と矛盾が生じた。酸化ストレスのかけ方および生細胞のカウントのしかたについて再度検討を行っている。

インスリン分泌機構への影響

PA と同じく飽和脂肪酸だが、鎖長が短い中鎖脂肪酸 (MCT) であるラウリン酸 (LA, C12:0) に着目し、インスリン分泌機構への影響を PA, OA と比較した。LA は、摂取しても体内に蓄積されにくいとされ、ミトコンドリアに影響を与える可能性が考えられたことから、インスリン分泌の最終シグナルである細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の比較とともに、ミトコンドリア膜電位変化への影響も調べた。

(1) インスリン分泌シグナルである細胞内 Ca^{2+} の測定：LA は、細胞内 Ca^{2+} 動態には小胞体ストレスを誘起する PA と似た影響を与えた。すなわち、Control と比較し、インスリン分泌の減少、特にグ

ルコース添加後 20 分以降に現れる第 2 相の分泌の低下が示唆された。

(2) ミトコンドリア膜電位変化の観察：グルコース添加後のミトコンドリア膜電位の変化は、OA 処理細胞と似て、グルコース添加後 6 分後以降、Control 細胞より高めに維持されていた。このことから、LA 処理細胞は、Control と比較してミトコンドリアが活性化されており、グルコース添加後のインスリン分泌を早める可能性が示唆された。

3. まとめと今後の課題

これまで、OA 処理細胞では細胞内活性酸素量が PA 処理細胞と匹敵して高いことが示されていたが、外から酸化ストレスを与えた際の細胞死の誘導されやすさは、OA 処理細胞では PA 処理細胞ほど高くないことが示唆された。細胞生存率を再度評価するとともに、アポトーシスで特徴的に見られる DNA の Ladder 化を調べる実験を行なっている。

LA 添加の影響については、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化からは飽和脂肪酸に特徴的な小胞体ストレスの影響がみられる一方、不飽和脂肪酸に特徴的なミトコンドリアの活性化も見られ、鎖長が中間的な長さ C12 であることでこのような特徴が現れていると推察された。今後は、さらに鎖長の短い脂肪酸など、遊離脂肪酸の質の違いについて追求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

学会発表

鈴木真理子, 遠藤薫子, 永田莉子, 川久保愛美, 田中直子「オレイン酸が膵臓 β 細胞の酸化ストレス耐性に与える影響」, 日本薬学会第 143 年会, 2023 年 3 月 27 日, 北海道大学 (北海道・札幌市) (発表確定)

付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所の研究助成 (BA2203) 「遊離脂肪酸の質が膵臓 β 細胞のインスリン分泌機能および障害機構に与える影響」を受けたものです。