

一般財団法人杉山産業化学研究所研究助成報告書

HepG2 細胞を用いた各種脂肪酸の肝臓脂肪蓄積抑制能の定量的評価

東京海洋大学

後藤 直宏

【背景】

代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (MAFLD) とはアルコールやウイルスなどを原因としない脂肪肝の総称であり、肝臓に脂質が過剰に蓄積することで発症する。世界人口の約 4 分の 1 が罹患しており世界的な公衆衛生問題となっている。その原因は肥満や糖尿病、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病であると考えられている。近年、食品に含まれる短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸など様々な脂肪酸が脂肪の蓄積を抑制させる効果があると報告されている。しかし脂肪酸構造の違いによる脂肪蓄積抑制効果を横並びに比較した研究は実施されていない。そこで本研究では、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) を用い、反芻動物や魚介類に含まれる特殊な構造を有する脂肪酸の脂肪蓄積抑制作用を横並びに比較することを目的とした。

【実験】

1) 細胞毒性試験

脂肪蓄積誘導に用いるオレイン酸 (*cis*-18:1n-9) の濃度、添加サンプルの濃度を決定するため、細胞毒性試験を行った。HepG2 細胞を 48 well プレートに 5.0×10^4 cells/well で播種し、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (10 %ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリストレプトマイシンを含む) 中で 37°C、5% CO₂ で培養した。前培養 48 時間後、各脂肪酸 (*cis*-18:1n-9、パルミチン酸 (16:0)、エイコサペンタエン酸 (EPA、20:5n-3)、ヘンイコサペンタエン酸 (21:5n-3)、エライジン酸 (*trans*-18:1n-9)、リノール酸 (18:2n-6)、共役リノール酸 (CLA, 9-*cis*, 11-*trans*-18:2 + 9-*cis*, 11-*trans*-18:2)、酪酸 (4:0)、オクタン酸 (8:0)、ヘプタデカン酸 (17:0)、ノナデカン酸 (19:0)) を各濃度 (100、200、300、500 μ M) で添加した。またコントロールとしてサンプル調製時と同濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) (0.1%) を含む DMEM を添加し 24 時間培養した。その後 MTT 試薬を添加し 3 時間 37°C でインキュベートした後、吸光度 (550 nm) を測定した。

2) *cis*-18:1n-9 添加による蓄積脂肪 (トリグリセリド、TG) の定量 (最適濃度検討)

HepG2 細胞を 6 well プレートに 4.0×10^5 cells/well 播種し、DMEM 中で 37°C、5% CO₂ で培養した。前培養 24 時間後、*cis*-18:1n-9 を 100 μ M を添加し、24 時間処理した。その後 18:1n-9 をさまざまな濃度 (100、200、300、500 μ M) で添加した。さらに 24 時間処理した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて、細胞を回収し、ホモジナイズした後、タンパク質と TG の定量を行った。

3) HepG2 細胞に蓄積した TG の定量

HepG2 細胞を 6 well プレートに 4.0×10^5 cells/well 播種し、DMEM 中で 37°C、5% CO₂ で培養した。前培養 24 時間後、脂肪蓄積誘導のため *cis*-18:1n-9 (500 μ M) を添加し、24 時間処理し脂質蓄積誘導を行った。その後、各脂肪酸 (*cis*-18:1n-9、16:0、20:5n-3、21:5n-

3、*trans*-18:1n-9、18:2n-6、CLA、4:0、8:0、17:0、19:0 (図1))を 200 μ M で添加し、さらに 24 時間処理した。*cis*-18:1n-9 を 200 μ M 添加したものをコントロールとした。PBS を用いて、細胞を回収し、ホモジナイズした後、タンパク質と TG の定量を行った。

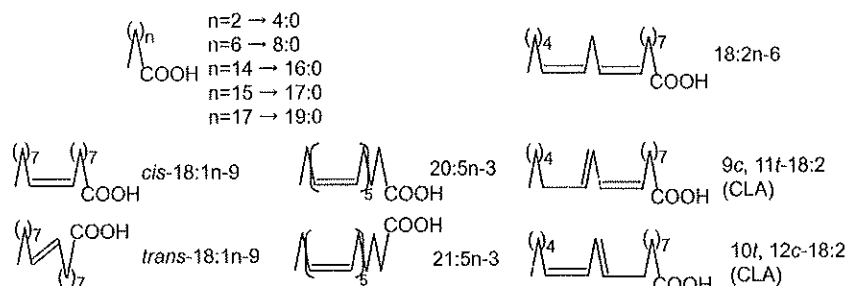


図1 実験で使用した特殊な構造を有する脂肪酸 (反芻動物および魚介類に含まれる)

【結果・考察】

実験 1) より、*cis*-18:1n-9 では 100~500 μ M の濃度では毒性はみられなかった。21:5n-3 以外の脂肪酸では 100~300 μ M の濃度では毒性はみられなかった。21:5n-3 では 300 μ M で毒性が見られた。これらの結果より、TG 測定に使用する各脂肪酸の濃度は 200 μ M とした。

実験 2) より、TG の蓄積は濃度依存的に増え、500 μ M で最も蓄積した。1) の結果を踏まえ、脂肪蓄積誘導に用いる *cis*-18:1n-9 の濃度は 500 μ M とした。

実験 3) より、20:5n-3、21:5n-3、4:0、8:0、18:2n-6、9*c*, 11*t*-18:2 で有意に脂肪 (TG) 蓄積抑制効果が見られた。細胞中の脂肪蓄積抑制効果の強度は、CLA>21:5n-3>8:0>20:5n-3>4:0>18:2n-6 という序列になった (図 2)。20:5n-3 と 21:5n-3 では、21:5n-3 の方が優れた脂肪蓄積抑制機能を有した。しかし、その違いは脂肪酸を構成する炭素数が 1 つ異なるだけである。また、CLA と 18:2n-6 (リノール酸) の違いは、構造中に存在する二重結合が共鳴しているか否かだけであり、それだけで脂肪蓄積抑制機能が大きく異なった。CLA は脂肪燃焼能を高めることが報告されていることから、 β 酸化の惹起により脂肪蓄積が抑えられた可能性が考えられる。しかし、21:5n-3 の効果は、脂肪合成抑制が原因か脂肪燃焼が原因かは不明である。今後この点を精査する予定である。これらの結果より、炭素数や共鳴構造などが脂肪蓄積抑制効果に影響を与えることが示唆された。

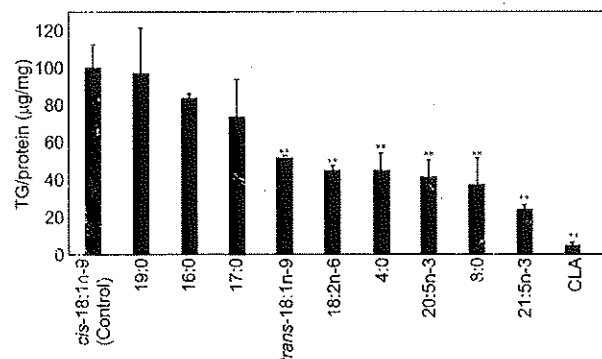


図2 脂肪酸種間のHepG2細胞へのTG蓄積量の比較結果
(n=3, mean $\pm$ S.D., vs control (*cis*-18:1n-9),
* p <0.05, ** p <0.01, Dunnett)