

# 脂質代謝異常を改善する新規機能性食品成分の探索法の確立

井上 奈穂  
東北大学大学院農学研究科 助教

## 緒言

近年、食生活の欧米化や生活スタイルの乱れに伴って、肥満、高脂血症、糖尿病、高血圧などのいわゆるメタボリックシンドローム患者が増加している。メタボリックシンドロームは脳や心臓の血管障害、動脈硬化症やガンなどのさらに重篤な疾病の発症を誘発し、日本のみならず世界的にもその罹患率の増加が問題となっている。メタボリックシンドロームは脂質代謝異常を誘発することから、現在、脂質代謝異常の予防・改善作用を有する食品由来の機能性成分の探索が盛んに行われている。

食品由来機能性成分の効果を調べるために、まず ELISA や培養細胞を用いた *in vitro* 実験によってスクリーニングが行われる。ついで、マウスやラットなどの実験動物を用いた *in vivo* 実験で機能性成分の有効性および安全性が検討され、有効性・安全性が確認されたのち、ヒトでの有効性試験および安全性試験に移行する、というのが一般的である。

しかしながら、実験に用いられる培養細胞および実験動物には多くの種が存在し、なおかつ同一種であっても系統の違いにより、食品由来機能性成分に対する応答が異なることは研究を行う上でよく経験することである。また、実験の再現性を確保することも重要ではあるが、再現性を得ることは困難な場合も多い。

そこで、本研究では、脂肪肝モデルとして長年用いられてきたオロト酸摂取ラットに焦点を当て、*in vivo* で観察される脂肪肝および低脂血症モデルを *in vitro* で再現することを試みた。オロト酸をラットが摂取した場合、著しい脂肪肝および低脂血症を呈するが<sup>1,2)</sup>、マウスではこのような症状は誘発されない。ヒトにおいては肝機能増強の目的でオロト酸が使われており、市販もされている。この脂肪肝および低脂血症の状態を細胞培養系で再現することができれば、脂質代謝異常に対する食品成分の影響を簡便かつ迅速に観察することができるように考えると考え、その系の確立を目指した。

## 実験方法

### 細胞培養

実験には脂質代謝解析を目的とした実験系でよく用いられる肝細胞であるラット由来肝細胞 McA-RH7777<sup>3,4)</sup> を選択した。McA-RH7777 細胞を 10cm dish で目的の細胞数になるまで 10% FBS 添加  $\alpha$ -MEM (+Pen, Str, L-Glu) で継代した。各実験を行う前に、FBS に含まれる脂質の影響を取り除くため、無血清  $\alpha$ -MEM (+Pen, Str, L-Glu) で前培養を行った後、各種分析に供した。

### 実験 1

#### 細胞毒性評価

添加するオロト酸が細胞増殖に与える影響を検討するために、Cell Counting Kit (WST-8) を用いて、細胞毒性評価を行った。96 well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well となるように細胞を播種し、48 時間培養を行った後、無血清培地 (Cont 群) あるいは各濃度 (0 $\mu$ M ~ 1 mM) のオロト酸を添加した無血清培地で 24 時間培養後、WST-8 溶液を各 well に添加し 4 時間の呈色反応を行い、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。Cont 群の吸光度を 100% とし、90% 以下の場合、「細胞毒性がある」と判定して添加濃度から除外することとした。

#### <sup>14</sup>C-acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の評価

*in vivo* で観察される現象を *in vitro* で再現するためには、よりよい実験条件の確立が必要となる。そこで、予備試験として、まず細胞毒性が見られなかった全ての添加濃度での新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の測定を行うこととした。

6 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well となるように細胞を播種し、48 時間培養を行った。その後、無血清培地で 24 時間前培養を行い、脂質前駆体として <sup>14</sup>C-acetic

acid を  $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$  となるように添加した無血清培地 (Cont 群) あるいはオロト酸添加した無血清培地で 24 時間培養し、細胞および培地を回収してした。回収した細胞および培地は Bligh & Dyer 法<sup>5)</sup> により脂質抽出を行い、抽出脂質の 1/5 を液体シンチレーションカウンターで測定し、総脂質量 (dpm) を測定した。抽出脂質の残り (4/5) 全量は薄層クロマトグラフィー分析に供し、ヨウ素発色で各脂質画分の位置を同定した後、薄層をはぎ取って、液体シンチレーションカウンターで測定し、各脂質画分の量 (dpm) を測定した<sup>6)</sup>。

## 実験 2

実験 1 (予備試験) で得られた結果から、脂質前駆体として用いた  $^{14}\text{C}$ -acetic acid だけでなく、 $^{14}\text{C}$ -oleic acid を用いて、脂質の取り込みについて評価を行うこととした。また、対照群として DMSO を、オロト酸添加濃度は  $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$  と決定し、以下の試験を行った。

### $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の評価

6 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well となるように細胞を播種し、48 時間培養を行った。その後、無血清培地で 24 時間前培養を行い、脂質前駆体として  $^{14}\text{C}$ -acetic acid を  $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$  となるように添加した無血清培地 (Cont 群) あるいはオロト酸添加した無血清培地で 24 時間あるいは 48 時間培養し、細胞および培地を回収した。回収した細胞および培地は脂質抽出<sup>5)</sup> を行い、分析に供した<sup>6)</sup>。

### $^{14}\text{C}$ -oleic acid からの脂質取り込みへの評価

6 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well となるように細胞

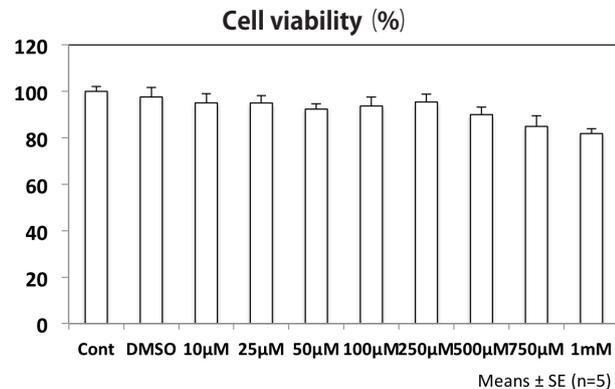


図 1 Cell Counting Kit を用いた細胞毒性評価

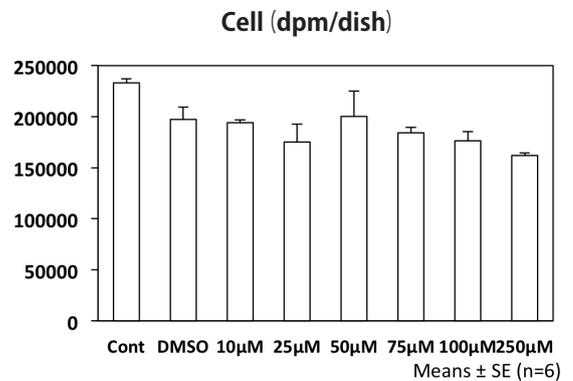
を播種し、48 時間培養を行った。その後、無血清培地で 24 時間前培養を行い、脂質前駆体として  $^{14}\text{C}$ -oleic acid を  $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$  となるように添加した無血清培地 (Cont 群) あるいはオロト酸添加した無血清培地で 24 時間あるいは 48 時間培養し、細胞および培地を回収した。回収した細胞および培地は脂質抽出<sup>5)</sup> を行い、分析に供した<sup>6)</sup>。

## 結果

細胞毒性評価の結果、オロト酸は  $250\mu\text{M}$  までは細胞毒性を示さなかった (図 1)。目視評価でも細胞の形態に異常は認められなかったことから、 $250\mu\text{M}$  を上限として分析を行うこととした。

Cont 群、オロト酸  $0 \sim 250\mu\text{M}$  で  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の評価を行ったところ、オロト酸は脂質合成を増加して脂肪肝を誘発しているのではなく、脂質の取り込みを促進し、脂質分泌を抑制することで、脂質を蓄積している可能性が示唆された (図 2 ~ 4)。

得られた結果から、実験条件の検討を行い、対照群に



### Medium (dpm/dish)

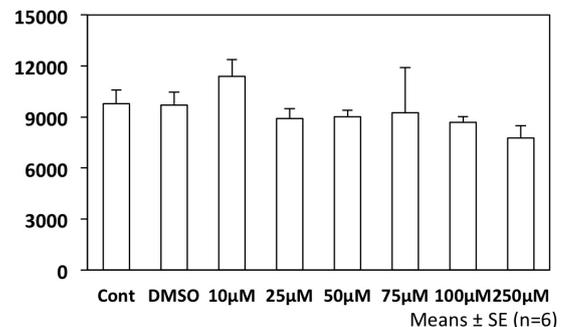


図 2  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量

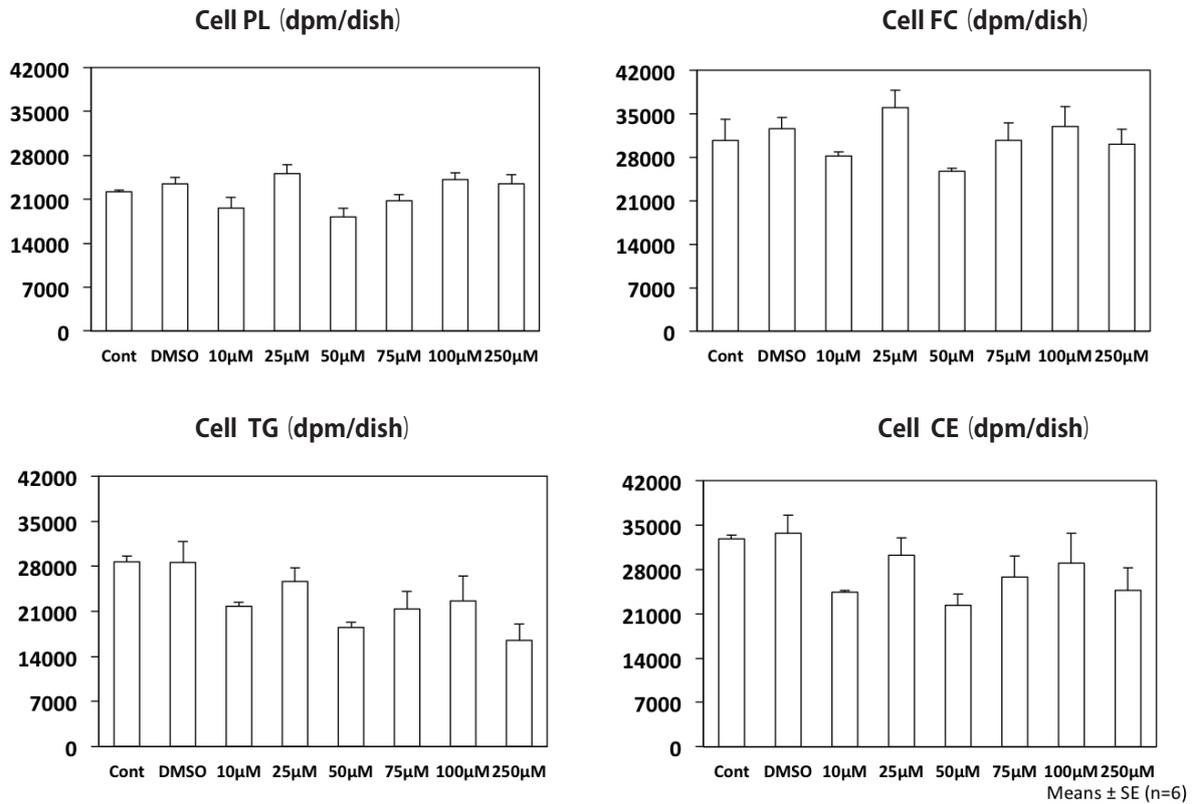


図3  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの各種脂質画分の新規合成量

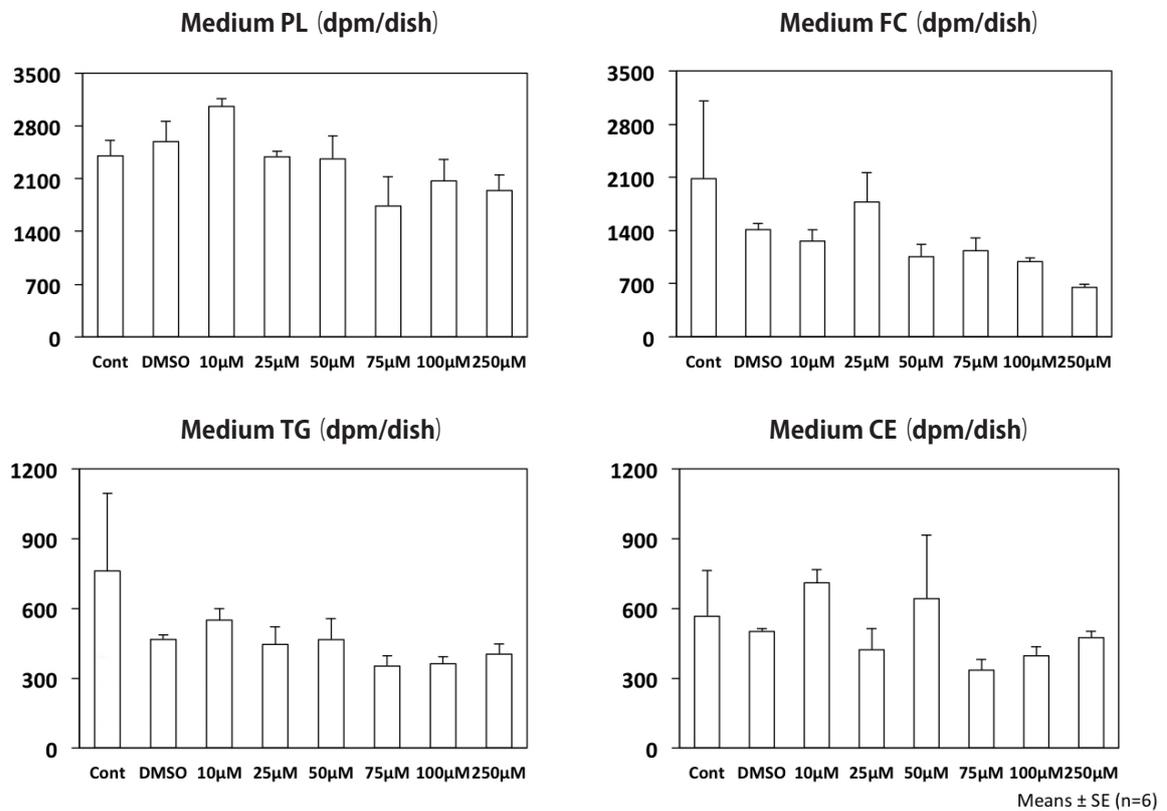


図4  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの各種脂質画分の新規分泌量

は DMSO 群を、オロト酸添加濃度は 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、250  $\mu\text{M}$  と決定し、検討を続けた。

まず、実験 1 と同様の方法で、 $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の評価を行った。その結果、24 時間培養では、オロト酸 100  $\mu\text{M}$  および 250  $\mu\text{M}$  添加で培地中への脂質分泌が有意に低下した。しかしながら、250  $\mu\text{M}$  添加では細胞中の新規合成量の添加も観察された (図 5)。48 時間培養では、オロト酸 100  $\mu\text{M}$  および 250  $\mu\text{M}$  添加で細胞中の脂質

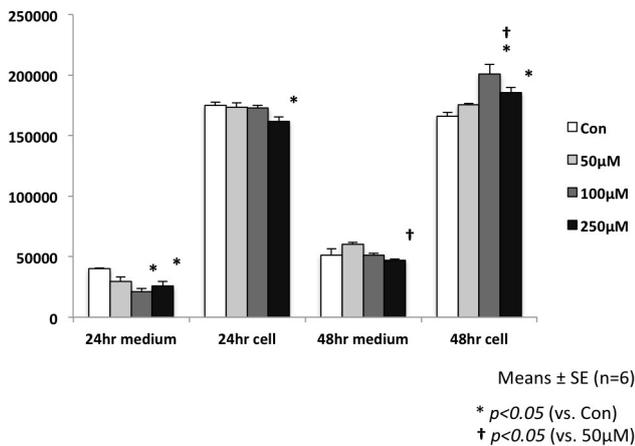


図 5  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量

合成は有意に増加した。一方、培地中への脂質分泌は 250  $\mu\text{M}$  添加で有意に低下した (図 5)。

続いて、 $^{14}\text{C}$ -oleic acid からの脂質取り込みへの評価を行った。その結果、細胞への脂質取り込み量に 24 時間培養においても 48 時間培養においても差は認められず、予備試験の結果から推測された脂質取り込み促進による脂質蓄積の可能性についての結果を得ることはできなかった (図 6)。

$^{14}\text{C}$ -acetic acid からの新規脂質合成量および新規合成脂質分泌量の評価において、オロト酸 100  $\mu\text{M}$  添加条件下が *in vivo* で観察される現象を最も顕著に *in vitro*

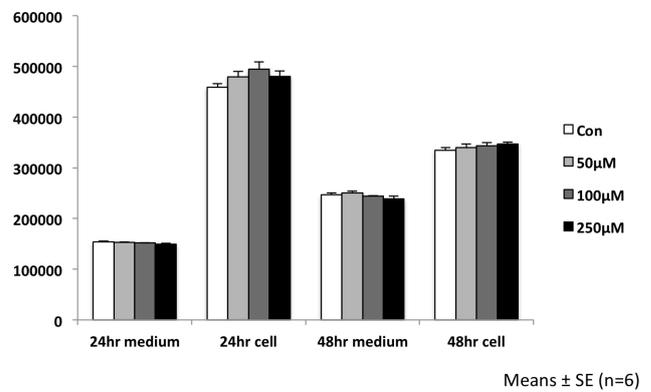


図 6  $^{14}\text{C}$ -oleic acid からの脂質取り込み

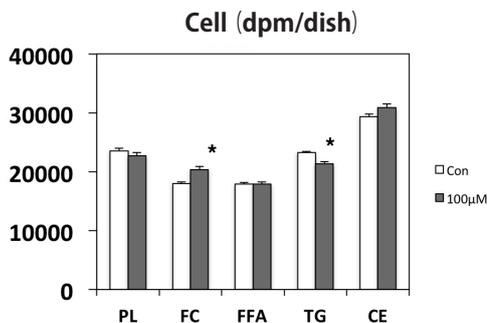


図 7 オロト酸 100  $\mu\text{M}$  添加条件下での  $^{14}\text{C}$ -oleic acid からの各種脂質画分の新規合成量

24hrs まとめ		
	Con	100 $\mu\text{M}$
PL	23552 $\pm$ 433	22706 $\pm$ 565
FC	17979 $\pm$ 277	20365 $\pm$ 532 *
FFA	17857 $\pm$ 319	17906 $\pm$ 345
TG	23271 $\pm$ 181	21376 $\pm$ 328 *
CE	29374 $\pm$ 407	30887 $\pm$ 626

\*  $p < 0.05$

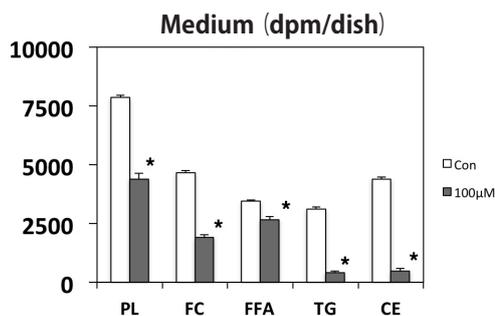


図 8 オロト酸 100  $\mu\text{M}$  添加条件下での  $^{14}\text{C}$ -acetic acid からの各種脂質画分の新規分泌量

	Con	100 $\mu\text{M}$
PL	7853 $\pm$ 91	4390 $\pm$ 250 *
FC	4667 $\pm$ 75	1904 $\pm$ 118 *
FFA	3445 $\pm$ 63	2658 $\pm$ 133 *
TG	3120 $\pm$ 89	402 $\pm$ 76 *
CE	4383 $\pm$ 90	478 $\pm$ 121 *

\*  $p < 0.05$

で再現できていたことから、対照群と 100  $\mu$ M 添加群での詳細な検討を行った。その結果、オロト酸添加は細胞内での遊離コレステロールおよびトリグリセリド画分において新規合成が有意に増加していた (図 7)。一方、培地中への脂質の分泌は全ての画分で有意に抑制されており、とくにトリグリセリド画分およびコレステロールエステル画分で顕著であった (図 8)。

## 要 約

本研究より、ラットのオロト酸誘発脂肪肝は血中への脂質分泌阻害による肝臓への脂質蓄積が一因である可能性が示された。また、動物実験系で観察されるオロト酸添加による脂質蓄積の増加および脂質分泌の低下について、ある一定条件下での再現には成功したものの、動物実験で観察されるような普遍的な実験条件の確立とまで

は行かなかった。今後、実験条件のさらなる検討を進めて、普遍的条件の確立を目指したいと考えている。

## 謝 辞

本研究は三島海雲記念財団研究助成金の助成によって行われた。

## 文 献

- 1) Buang Y, et al. : Nutrition, 21, 867-873, 2005.
- 2) Cha JY, et al. : Plant Hoods Hum Nutr, 56, 349-356, 2001.
- 3) Dashti N, et al. : J Biol Chem, 282, 28597-28608, 2007.
- 4) Sundaram M, et al. : J Lipid Res, 51, 150-161, 2010.
- 5) Bligh EG, Dyer WJ : Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959.
- 6) Inoue N, et al. : J Oleo Sci, 58, 171-175, 2009.