

多価不飽和脂肪酸による肥満予防に関する基礎的研究

家政教育専修 2511030

関 愛平

1. はじめに

近年、食の欧米化や不規則な食生活、便利な生活がもたらす運動不足などにより様々な生活習慣病が増加した。日本における肥満人口の増加は、特に欧米型の高脂肪食の摂取が主要な要因と考えられている。そのため、古くからの魚介類や穀物が中心で低脂肪の日本食が見直され、日本食素材の健康効果が様々な研究で明らかになっている。例えば魚介類にはドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）等の多価不飽和脂肪酸が豊富に含まれており、これらによる抗動脈硬化、抗腫瘍、抗アレルギー作用が報告されている。

脂肪酸は、飽和、一価不飽和及び多価不飽和脂肪酸に分類され、飽和・一価不飽和脂肪酸は体内での生合成が可能だが、多価不飽和脂肪酸は体内で生合成できないために必須脂肪酸と呼ばれ、食物からの摂取が必須である。多価不飽和脂肪酸には n-6 系と n-3 系があり、リノール酸やアラキドン酸などの n-6 系は多くの生理活性の強いホルモン様物質であるエイコサノイドの前駆体となるため、炎症や血栓形成を促進する。一方で、 α -リノレン酸や EPA、DHA などの n-3 系の脂肪酸はこれらの反応を抑制することが示されている。このように脂肪酸の種類によって生理作用が異なることから、脂質は摂取量および脂肪酸の質の 2 つを考慮すべきであるが、脂肪酸の質に関する認識は低い。

本研究では、これまでの研究で明らかとなった n-3 系多価不飽和脂肪酸の各種疾病予防効果に加えて、肥満予防にどの程度効果的であるのかについて、栄養学的な基礎研究を行った。最初にマウス由来脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いて、DHA をはじめとした多価不飽和脂肪酸の処理が脂肪細胞の分化にどの程度影響するのかを解析し、脂肪細胞に特異的に発現する分子や脂質代謝関連分子の遺伝子発現に及ぼす影響を詳細に解析した。次に、マウスへの摂食実験を行い、多価不飽和脂肪酸の組成が異なる各種油脂を摂取した場合の脂肪組織への影響や遺伝子発現に及ぼす影響を分析した。

2. 実験材料及び方法

培養細胞実験 マウス由来 3T3-L1 細胞はインスリンなどの各種ホルモン処理により脂肪細胞へ分化する。この際に、培地にリノール酸や α -リノレン酸、EPA、DHA などの多

価不飽和脂肪酸を添加することで必須脂肪酸バランスを調整し、脂肪細胞の分化に及ぼす影響を解析した。指標は細胞内に蓄積した脂肪滴を Oil Red O で染色して視覚的に観察する方法や中性脂肪であるトリアシルグリセロール (TG) を定量する方法で評価した。

動物実験 マウスを用いた動物実験系で生体全体での多価不飽和脂肪酸バランスが脂肪組織に及ぼす影響を解析した。この際、無脂肪精製飼料に各種食用油脂を重量比 10% 添加して必須脂肪酸バランスを変化させた食餌を調整し、実験に用いた。飽和・一価不飽和脂肪酸が豊富な牛脂、n-6 系脂肪酸のリノール酸が豊富な月見草油、n-3 系脂肪酸の α -リノレン酸を多く含んだシソ油、DHA 及び EPA を含有した魚油を用いて必須脂肪酸バランスを調整した。給餌期間中の摂食量や体重などの生理的パラメータや臓器重量、脂肪酸組成などを測定した。

脂質分析 3T3-L1 細胞やマウス臓器から Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出した。抽出した総脂質から薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、リン脂質 (PL) と中性脂肪 (トリアシルグリセロール、TG) の画分を分離した。それらを 5% HCl-MeOH を用いて、脂肪酸をメチルエステルに誘導体化し、ガスクロマトグラフィー (GC) により定量分析した。

遺伝子発現の解析 遺伝子発現の指標となる mRNA の定量を行った。3T3-L1 細胞やマウス臓器から TRIzol (Invitrogen) を用いて Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA に含まれる mRNA を PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time、タカラバイオ) を用いて cDNA に変換した。調整した cDNA を使用して SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus、タカラバイオ) を用いて、Real-time PCR 法により mRNA を定量分析した。

3. 実験結果

1) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化

パルミチン酸 (16:0)、オレイン酸 (18:1)、リノール酸 (18:2n-6)、 α -リノレン酸 (18:3n-3)、アラキドン酸 (20:4n-6)、EPA (20:5n-3) を各 40 μ M で処理した細胞の間には大きな変化は見られなかった。一方で、DHA で処理したものは、control や他の脂肪酸のものに比べ、脂肪細胞への分化に伴ったトリアシルグリセロールの蓄積を約 2 分の 1 に抑えていた。このことは、Oil Red O で染色された細胞内の脂肪滴の観察からも確認された。以上より、DHA には脂肪細胞への分化を抑制する効果があるが、他の脂肪酸にはそのような顕著な効果はないことが分かった。

通常通り分化させたものを control とし、DHA をそれぞれ 5 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M、60 μ M 処理した培地を使い、濃度に応じた影響が見られるかを比較した。脂肪細胞の分化に伴ったトリアシルグリセロールの蓄積は、DHA の濃度依存的に抑制されていることが分かった。

トリアシルグリセロール中の脂肪酸レベルを解析した結果、飽和脂肪酸のレベルは DHA の濃度が 0~40 μ M までは変動が少ないが、40~60 μ M の高濃度では顕著な低下が見られた。一価不飽和脂肪酸のレベルは、実験に用いた濃度の範囲で DHA の濃度依存的な低

下が見られた。n-6 系多価不飽和脂肪酸のレベルは、DHA の濃度依存的に若干低下していた。一方 n-3 多価不飽和脂肪酸のレベルは、0~40 μ M までは DHA の濃度依存的に顕著な増加傾向が見られたが、40~60 μ M の高濃度では飽和状態となり、それ以上増加しなかった。また、脂肪細胞への分化は DHA の濃度依存的に抑制されることが Oil Red O で染色された細胞内の脂肪的の観察からも確認された。

2) 3T3-L1 細胞の遺伝子発現に及ぼす DHA の影響

Real-time PCR 法を用い、脂肪細胞分化に必須な転写因子の発現に及ぼす DHA の影響を調べた。実験では、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化誘導の際に 50 μ M の DHA を添加して培養し、回収と RNA の抽出を 48 時間後 (2 日目)、5、9、12 日目に行った。PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 、FABP4、Acox1 の発現は、分化 2 日間では Control と比較して 50 μ M DHA を添加した細胞発現が上回っており、それ以降では発現が下回っていた。ACC、Gpam の発現は、分化 5 日間 50 μ M DHA を添加した細胞発現が上回っており、それ以降では発現が下回っていた。Adipoq、SCD1、FAS の遺伝子発現を調べたところ、50 μ M DHA を添加した細胞でいずれの期間も発現が強く抑えられていた。以上のように、脂肪細胞の分化に必須な転写因子や脂質合成系の遺伝子の発現は、長時間の DHA 処理により強く抑制されることが分かった。

3) 食餌脂肪酸がマウスの体重・臓器重量に及ぼす影響

4 週齢の雄性 ICR 系マウスに、実験用油脂を重量比 10% 添加した無脂肪精製飼料を与えて、12 週齢まで 8 週間飼育した。実験用油脂には、牛脂、月見草油、シソ油、魚油の 4 種類を用いた。牛脂は飽和、一価不飽和脂肪酸が多く、月見草油は n-6 系脂肪酸、シソ油は n-3 系の α -リノレン酸、魚油は n-3 系脂肪酸の EPA、DHA が多い油脂である。

その結果、それぞれの食餌群で体重、肝臓・脾臓重量に大きな変化は見られなかったが、脂肪組織では魚油群で顕著な減少傾向が見られた。また、ヒラメ筋、長趾伸筋では魚油群で組織量が増加していた。以上のように、n-3 系脂肪酸の中でも DHA を多く含む魚油を食餌脂肪酸として摂取することで、脂肪組織を減少させ、筋肉量を増加させる作用があることが示された。

4) 食餌脂肪酸がマウス脂肪組織の遺伝子発現に及ぼす影響

Real-time PCR 法を用い、さまざまな食用油脂を摂取したマウスの脂肪組織における mRNA 発現を測定し、摂取による影響を検討した。脂肪細胞の分化にに関連する転写因子 (PPAR α 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ) 及び脂質代謝系遺伝子 (Gpam、FAS、SCD1、FABP4、Adipoq) では、いずれも牛脂群で高く発現し、他の食餌群では低レベルの発現であった。特に、一価不飽和脂肪酸合成酵素である SCD1 の発現は、魚油で mRNA 発現が顕著に低かった。

5. 考察及び総括

脂質の過剰摂取が肥満やメタボリック症候群の原因となることは一般によく理解されているが、脂肪酸バランスという質的要素が生活習慣病予防に重要であるとの認識は低い。特に多価不飽和脂肪酸は生体内で生合成できないことから体内の組成は 100% 食事に依存する。これまでの研究で、多価不飽和脂肪酸の n-6 系 / n-3 系脂肪酸の比率が鍵となり、n-6 系脂肪酸の過剰摂取が動脈硬化、血栓性疾患、炎症性疾患やアレルギー性疾患に対して促進的に働き、n-3 系脂肪酸が抑制的に作用することが明らかとなっていた。多価不飽和脂肪酸のバランスと肥満症との関係については、これまでに明確な関係は示されていなかった。

本研究では、3T3-L1 細胞系において、n-3 系脂肪酸の中でも特に DHA が脂肪細胞の分化に必須な転写因子や脂質合成系酵素の遺伝子発現を抑制することで脂肪細胞の分化を抑制することが明らかとなった。動物実験においては、多価不飽和脂肪酸の組成がことなる 4 種類の食餌を与えたマウスで検証したところ、体重には食餌群間で有意な差は観察されなかった。一方で、脂肪組織の重量は、DHA の豊富な魚油の摂取では他の食餌群と比較して有意に低い値を示した。肥満とは単に体重で決められるのではなく、生理学的には脂肪組織の過剰蓄積した身体症状と定義される。以上より、n-3 系脂肪酸の中でも特に DHA が肥満予防に有効だと考えられる。

また、筋肉(ヒラメ筋、長趾伸筋)の重量については、DHA の豊富な魚油群で有意に高い値を示した。体重に食餌群間で差がなかったのは、魚油群では低下した脂肪組織の重量が筋肉組織の増加で補われていたためであると考えられる。肥満症及びメタボリック症候群の予防には筋肉組織の増加は有益であることから、魚油はこの点からも有効であるといえる。

日本食が健康に良いという情報が世界に広まりつつあるが、その特徴は低脂肪・低カロリーという長所があるのに対し、高食塩・低カルシウムという短所も存在する。これらの短所が、高血圧症や女性の骨粗鬆症の一因となることから、十分に留意する必要がある。一方で、本研究で明らかになったように、魚介類の摂取量が多いことは日本食の大きな長所であるといえる。魚油に含有される DHA 等の n-3 系脂肪酸の摂取は、動脈硬化、血栓性疾患、炎症性疾患やアレルギー性疾患の予防だけでなく、肥満症やメタボリック症候群の予防にも有効であることが示された。今後、このような情報を活用して、食生活の改善に役立てられるような活動を推進することが望まれる。

6. 参考文献

1. 池本 敦、渡辺 志朗、奥山 治美 (1997) 水産加工残滓からの DHA 等の抽出精製・技術及び生理機能の研究に関する報告. DHA 高度精製抽出技術研究組合. 55-65.
2. Okuyama H., Fujii Y., and Ikemoto A. (2000) N-6/n-3 Ratio of Dietary Fatty Acids Rather Than Hypercholesterolemia As the Major Risk Factor for Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. *Journal of Health Science* **46** (3) , 157-177.
3. 池本 敦 (2012) 脳機能における n-3 系脂肪酸の必須性—行動科学的評価と分子基盤の解析. 脂質栄養学, 21 (1), 17~25.