

---

東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野

---



助教  
平田祐介

2007年3月 東京大学薬学部薬学科卒業  
2012年3月 東京大学大学院薬学系研究科  
博士後期課程修了（薬学博士）  
2012年4月 大阪大学微生物病研究所  
特任研究員  
2014年10月 現職

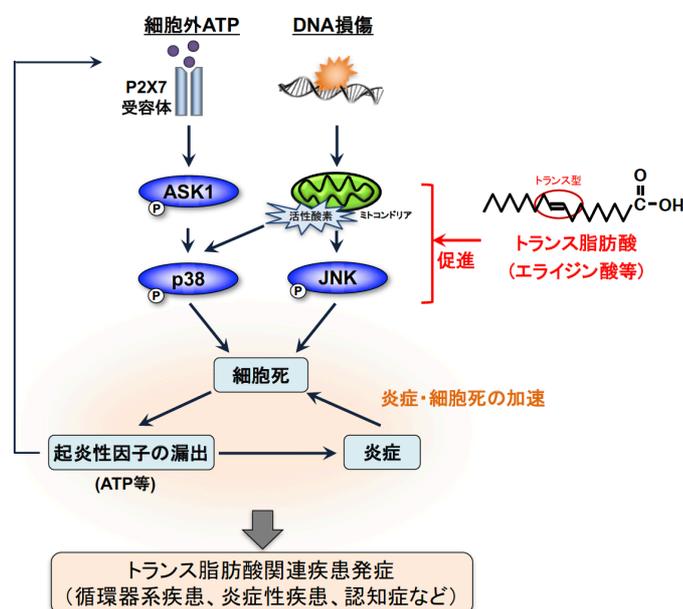
## トランス脂肪酸毒性発現の分子基盤に基づいた 食品の安全性評価

### 1. 背景と目的

トランス脂肪酸は、トランス型の炭素-炭素間二重結合を含む脂肪酸の総称であり、これまでの疫学的な知見から、動脈硬化症をはじめとした循環器系疾患、炎症性疾患、認知症などの様々な疾患の危険因子であることが分かってきた (Estadella et al., *Mediators Inflamm.*, 2013)。しかしその一方で、分子・細胞レベルでの解析例に乏しく、疾患発症機序はほとんど解明されていない。我々は、トランス脂肪酸が、自己由来の起炎性因子の1つである ATP によって誘導されるマクロファージ（免疫担当細胞の1つ）の細胞死を促進するという新規作用を発見し、その作用機構を詳細に明らかにした (Hirata et al., *J Biol Chem*, 2017: 日経新聞等で掲載。社会的影響度の指標となる Altmetric Score: 67)。トランス脂肪酸の作用点は、細胞外 ATP がリガンドとして作用するプリン受容体 P2X7 の下流で活性化するストレス応答性キナーゼ ASK1 であり、トランス脂肪酸が ASK1 活性化を亢進することで、ASK1-p38 MAP キナーゼ経路を介した細胞死誘導を促進することを明らかにした (図1)。さらに我々は最近、トランス脂肪酸が、DNA 損傷により誘導される細胞死を顕著に亢進する作用についても見いだしており、その亢進作用は、ミトコンドリアにおける活性酸素産生の増強を介した、ストレス応答性 MAP キナーゼ JNK/p38 の活性化の亢進によるものであることが示唆されている (未発表データ: 図1)。これらの作用は、トランス脂肪酸の幾何異性体に相当するシス脂肪酸 (自然界に普遍的に存在) では認められないトランス脂肪酸特異的な作用であり、細胞死によって細胞内から ATP などの起炎性因子が更に漏出することで、炎症が加速的に亢進する (図1)。この細胞死・炎症の強力な促進作用が、トラ

ンス脂肪酸関連疾患の発症・進展を引き起こすメカニズムであると考えられる（図1）。

トランス脂肪酸の中には、エイラジン酸をはじめとした、工業的な食品製造過程で産生される「人工型」トランス脂肪酸と、ウシなどの畜産動物中で微生物により産生されるバクセン酸のような「天然型」トランス脂肪酸が存在する。これまで、欧米諸国では人工型トランス脂肪酸に対する摂取量の法的規制が行われてきた一方で、天然型トランス脂肪酸については、生体への毒性が無いとされ、規制は全く行われてこなかったが、その科学的根拠は乏しい。そこで本研究では、当研究室でこれまで独自に明らかにしたトランス脂肪酸の作用機構とその評価系を基に、食品中に含まれる様々な人工型・天然型トランス脂肪酸の毒性および安全性を評価し、毒性発現に寄与するトランス脂肪酸種の特特定と、その疾患発症への寄与を明らかにすることを目指した。



【図1】トランス脂肪酸による毒性発現機構と疾患発症との関連

## 2. 方法

### 1) トランス脂肪酸による細胞死促進作用の定量的評価

本研究では、食品中含量の高い以下の4つのトランス脂肪酸について毒性評価を行った（図2）。カッコ内は、左から順に、炭素数、二重結合の数、二重結合の幾何異性（シスまたはトランス）、二重結合のカルボキシ末端からの位置を示す（以下同様）。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞に、BSA を抱合させた各種脂肪酸を12時間前処置し、0.5 mM ATP または 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ドキソルビシン（DNA 損傷誘導剤）で各々6時間、24時間刺激後、細胞生存率の評価（MTS/PMS アッセイ）を行った。細胞死促進作用の定量的な評価のため、以下で定義する「相対生存率」という指標を用いた。

相対生存率 = (脂肪酸前処置+刺激時の細胞生存率) / (脂肪酸未処置+刺激時の細胞生存率)

加工食品由来食品中に多い  
トランス脂肪酸 (人工型)



エライジン酸 (C18:1, *trans*-9)  
elaidic acid: EA



リノエライジン酸 (C18:2, *trans*-9,12)  
linoelaidic acid: LEA

反芻動物由来食品中に多い  
トランス脂肪酸 (天然型)



トランスバクセン酸 (C18:1, *trans*-11)  
*trans*-vaccenic acid: tVA



ルーメン酸 (C18:2, *trans*-9, *cis*-11)  
rumenic acid: RA

【図 2】本研究で評価の対象とした食品中含有量の多いトランス脂肪酸

2) トランス脂肪酸含有高脂肪食摂取マウスの解析

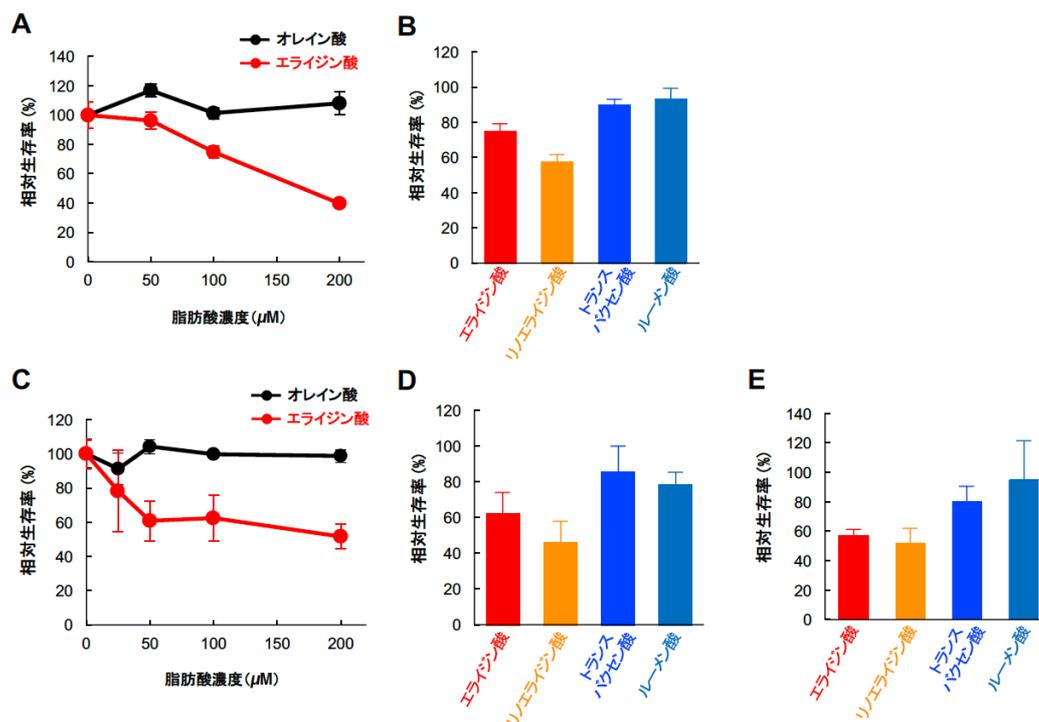
C57BL/6J マウス (♂, 8 週齢) に、トランス脂肪酸含有高脂肪食 (HFD: High fat diet、ショートニング由来の油脂 (トランス脂肪酸の主成分はエライジン酸)) を添加。脂質含有量: 40%kcal) を 12 週間摂取させ、肝臓の病理学的解析を行なった。比較対象として、普通食 (ND: normal diet, 脂質含有量: 10%kcal)、通常の HFD (パーム油由来の油脂を添加。脂質含有量: 40%kcal) 摂取群を置いた。

3. 研究結果

1) 多様なトランス脂肪酸種の毒性・安全性の評価

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞における細胞外 ATP 誘導性細胞死について、エライジン酸の処置濃度依存的な促進作用が認められた一方で、その幾何異性体にあたるオレイン酸では、促進作用は認められなかった (図 3 A)。そこで、エライジン酸以外の様々なトランス脂肪酸種について、同様に細胞外 ATP 誘導性細胞死の促進作用を評価したところ、エライジン酸やリノエライジン酸などの人工型トランス脂肪酸を前処置した際に、天然型トランス脂肪酸 (トランスバクセン酸、ルーメン酸) 前処置時よりも強い促進作用が認められた (図 3 B)。次に、DNA 損傷時の細胞死についても調べたところ、エライジン酸の処置濃度依存的な促進作用が認められた一方で、オレイン酸では促進作用は認められなかった (図 3 C)。その他のトランス脂肪酸種についても細胞死促進作用を評価したところ、細胞外 ATP 誘導性細胞死の場合と同様に、人工型トランス脂肪酸を前処置した際に、天然型トランス脂肪酸を前処置した場合よりも強い促進作用が認められた (図 3 D)。さらに、他の細胞種についても同様の作用が認められるか否か検証するため、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞において、各種トランス脂肪酸の DNA 損傷時の細胞死促進作用を評価したとこ

ろ、本細胞においても、エライジン酸などの人工型トランス脂肪酸が、天然型トランス脂肪酸よりも強い促進作用を示した (図 3 E)。なお、いずれのトランス脂肪酸についても、少なくとも本実験で処置した濃度域では、トランス脂肪酸単独での処置では細胞生存率に特に影響が出ないことを確認している。以上の結果から、細胞外 ATP、DNA 損傷のいずれの細胞死誘導刺激の場合においても、エライジン酸やリノエライジン酸などの人工型トランス脂肪酸の細胞死促進作用が特に強力であることが示唆された。



【図 3】 トランス脂肪酸種ごとの毒性・安全性の評価

(A-D) RAW264.7 細胞における ATP 0.5 mM (A, B) または doxorubicin 0.5 μg/ml (C, D) 刺激時の各種トランス脂肪酸の細胞死促進作用の評価。(A, C) では、比較対象として、エライジン酸のシス異性体にあたるオレイン酸を置いている。(B, D) では、各種脂肪酸を 100 μM で前処置している。

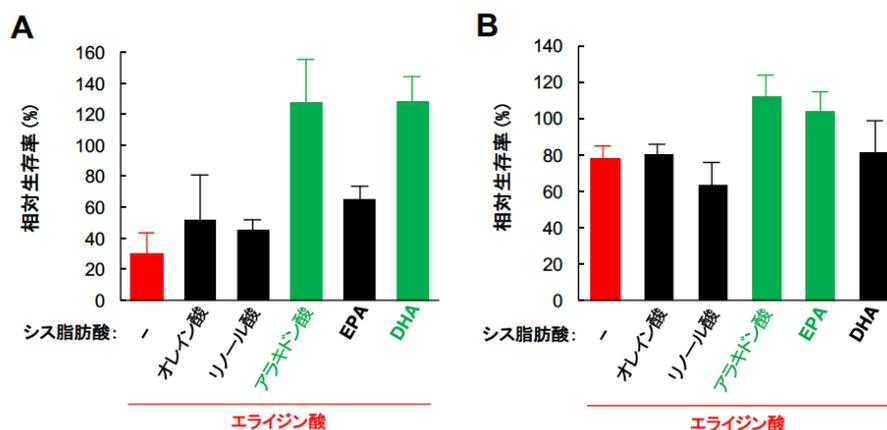
(E) HeLa 細胞における doxorubicin 1 μg/ml 刺激時の各種トランス脂肪酸の細胞死促進作用の評価。各種脂肪酸を 25 μM で前処置している。

## 2) シス脂肪酸による毒性軽減作用の評価

トランス脂肪酸の異性体で、自然界に普遍的に存在する EPA や DHA などの高度不飽和脂肪酸と呼称されるシス脂肪酸には、代謝性疾患や炎症性疾患などの疾患改善効果があることが最近明らかとなり、着目されている (Riediger et al., *J AM Diet Assoc.*, 2009)。

そこで、様々なシス脂肪酸をトランス脂肪酸と共処置した際の、トランス脂肪酸による細胞

死促進作用への影響について評価した。その結果、エライジン酸による細胞外 ATP 誘導性細胞死の促進作用は、アラキドン酸または DHA の共処置によって、顕著に抑制された (図 4 A)。一方、DNA 損傷誘導性細胞死の促進作用については、アラキドン酸または EPA の共処置によって、顕著に抑制された (図 4 B)。従って、トランス脂肪酸による細胞死促進作用は、アラキドン酸、EPA、DHA などのシス脂肪酸存在下では著しく抑制可能であることが示唆された。

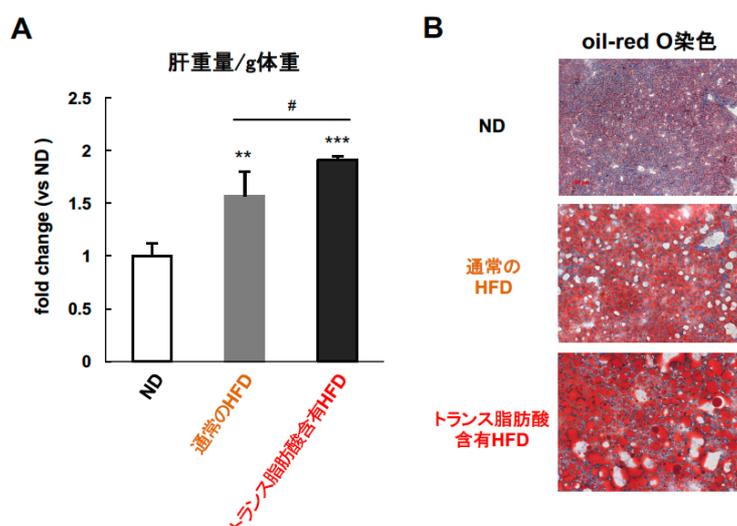


【図 4】 シス脂肪酸によるトランス脂肪酸の毒性軽減作用の評価

(A and B) RAW264.7 細胞における ATP 0.5 mM (A) または doxorubicin 0.5 µg/ml (B) 刺激時の各種シス脂肪酸による毒性軽減作用の評価。200 µM のエライジン酸および 50 µM の各種シス脂肪酸を同時に前処置している。

### 3) トランス脂肪酸摂取マウスの肝臓の病態解析

1) の結果を踏まえ、エライジン酸を主成分としたトランス脂肪酸を含有する高脂肪食をマウスに摂取させた際に起きる病態について、解析を行なった。本実験では、比較対象として、通常食摂取群、および通常の高脂肪食 (トランス脂肪酸不含) 摂取群を置き、特にトランス脂肪酸含有高脂肪食摂取群で認められる表現型を調べることにした。12 週間の高脂肪食摂取により、トランス脂肪酸摂取の有無によらず、血中コレステロール値や肝障害マーカーの上昇が認められ、脂肪肝の発症が確認された。そこで、肝臓の病理学的解析を行ったところ、興味深いことに、トランス脂肪酸含有高脂肪食摂取群では、通常の高脂肪食摂取群よりもさらに肝重量が有意に増加する傾向が認められ、oil-red O 染色によって、実際に脂肪が蓄積していることが確認できた (図 5)。なお、この時、副睾丸脂肪や後腹膜脂肪の重量については、トランス脂肪酸の有無で有意な差は認められなかった。



【図5】トランス脂肪酸摂取マウスの肝臓の病態解析

(A and B) 普通食 (ND)、通常のHFD (トランス脂肪酸不含)、またはトランス脂肪酸含有HFDを12週間給餌後のマウスの相対肝重量 (A) および肝臓切片のoil-red O染色結果。  
\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (vs ND); #,  $p < 0.05$  (One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's test)

#### 4. 考察

本研究より、トランス脂肪酸の中でも、エライジン酸やリノエライジン酸などの、主に工業的な食品製造過程で産生される人工型トランス脂肪酸の毒性が、反芻動物由来の天然型トランス脂肪酸より強力であることが実証された。過去の様々な疫学研究から、人工型トランス脂肪酸が特に疾患発症に寄与することが示唆されていたが、これまで詳細な毒性発現機構が未解明であった背景から、その科学的根拠は不明であった。従って、本研究成果は、疫学研究に基づく人工型トランス脂肪酸の疾患発症との関連を裏付ける重要な基礎的知見として位置付けられる。さらに本研究では、EPAやDHAなどの高度不飽和シス脂肪酸によるトランス脂肪酸毒性の軽減作用も示されたことから、本研究成果を基に、食品中の脂肪酸組成を工夫することで、食品安全性の向上が期待される。

また、マウスレベルでの解析から、トランス脂肪酸と脂肪肝発症との関連が示唆された。近年、脂肪肝が進行することで引き起こされるNASH (非アルコール性脂肪性肝炎)や動脈硬化症などの循環器系疾患、認知症などが社会的な問題となっており、これら疾患の発症機序の解明、および予防・治療戦略の開発が喫緊の課題となっている。上記疾患はいずれも、トランス脂肪酸摂取がリスクファクターとなる疾患とされていることから、今後は、本研究成果を基に、関連疾患全般との関連についても詳細な検証を行いたい。

## 5. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団様に、厚く御礼申し上げます。

## 6. 引用文献

Estadella, D. et al. (2013) Lipotoxicity: effects of dietary saturated and trans fatty acids. *Mediators Inflamm* **2013**, 137579

Hirata, Y., et al. (2017) trans-Fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *J Biol Chem* **292**, 8174-8185

Riediger ND., et al., (2009) A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J AM Diet Assoc* **109**, 668-679