

かつおだしの培地中への添加が マウス胎児線維芽由来3T3-L1細胞に及ぼす影響

Effect of Dried-bonito Broth on Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line 3T3-L1

住澤 知之
Tomoyuki Sumizawa

鹿児島女子短期大学

かつおだしによるアディポネクチンの産生亢進機構を明らかにするため、細胞培養系での検討を行った。培養上清中のアディポネクチン濃度はELISA法により測定し、脂肪細胞への分化はOil Red O染色による脂肪滴の形成で確認した。マウス胎児線維芽細胞株3T3-L1細胞を分化誘導すると、培養上清への顕著なアディポネクチンの分泌亢進及び脂肪滴形成が確認された。脂肪細胞に分化した3T3-L1細胞の培地中にかつおだしを添加しても、培養上清へのさらなるアディポネクチンの分泌亢進は観察されなかったが、分化誘導により形成された脂肪滴は、かつおだし添加により小型化していた。分化誘導していない3T3-L1細胞の培地中へのかつおだしの添加は、分化誘導時と比べるとはるかに少ないが、有意な培養上清中へのアディポネクチン分泌量の増加が見られた。しかしながら、明らかな脂肪滴形成は観察されなかった。

Keywords : dried-bonito broth, adiponectin, 3T3-L1 cells, adipocyte

キーワード : かつおだし, アディポネクチン, 3T3-L1細胞, 脂肪細胞

1. はじめに

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンで、インスリン感受性の亢進や抗炎症作用などの作用が言われている¹⁾。そのため、血中アディポネクチン濃度の上昇により、2型糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の効果的な予防が出来ることが期待できる。

我々は、かつお本枯れ節より抽出しただしの摂取により、ヒト血清中におけるアディポネクチン濃度が上昇することを再現性良く確認している^{2,4)}。アディポネクチンの増加に関わる食品成分としては、大豆に含まれるタンパク質β-conglycininがラットにおいて血中アディポネクチン濃度を高めるという報告がある⁵⁾。また、シークワサーなどの柑橘類の果皮等に多く含まれるフラボノイドであるノビレチンも、アディポネクチン分泌を亢進することが報告されている⁶⁾。β-conglycininによる血中アディポネクチン濃度の上昇には、β-conglycininの消化産物の寄与が考えられているが、未だその正体は明らかにされていない。かつおだしにおいても、現在までのところ、かつおだし中のどのような成分が血中アディポネクチン濃度の上昇に関与しているのかは不明である。そこで、かつおだし中に含まれるどのような成分が、アディポネクチンの発現を亢進させるのか、そして、どのようなメカニズムで発現を亢進させているのかを明らかにするためのアッセイ系の確立が必要である。そこで、マウス胎児線維芽細胞株3T3-L1を用

いた系の検討を行うことを考えた。

3T3-L1細胞は、マウスの株化線維芽細胞 Swiss/3T3からクローニングされた細胞で、増殖期には線維芽細胞と差異はないが、細胞がコンフルエントになると細胞質に脂肪滴を蓄積するようになるという性質を有している。そのため、3T3-L1細胞は脂質代謝の細胞モデル系として脂質代謝研究などに広く用いられている。そして、dexamethasone, isobutyl-methylxanthine, insulinによる刺激で効率よく脂肪細胞に分化することが明らかとなっている⁷⁾。

そこで今回は、3T3-L1細胞を用いた培養細胞系においても、培地中へのかつおだしの添加によりアディポネクチン産生が亢進するかを調べることにした。

2. 方法

細胞培養

マウス胎児線維芽細胞株3T3-L1は、JCRB細胞バンクより購入した。脂肪細胞への分化誘導前の3T3-L1細胞は、3T3-L1脂肪前駆細胞用培地（株式会社ケーエーシー）を用いて、37°C、5% CO₂で培養を行った。脂肪細胞への分化誘導は、3T3-L1細胞がコンフルエントな状態に達したのちに、培地を3T3-L1脂肪前駆細胞分化培地（株式会社ケーエーシー）に交換し、2日間行った。分化誘導後の培養は、3T3-L1脂肪細胞培養用培地（株式会社ケーエーシー）を用いて行い、2日おきに培地交換を行った。

培地中への10×かつおだしの添加は、脂肪細胞培養用培地への交換と同時に開始し、培地量の10分の1量を加えた。コントロールには、かつおだしの抽出、調製に用いた蒸留水を用い、分化誘導後12日目の培養上清をアディポネクチンの定量に使用した。10×かつおだしを添加した培地での未分化の3T3-L1細胞の培養では、かつおだしの添加後7日目の培養上清をアディポネクチンの定量に使用した。

Oil Red O 染色

脂肪細胞への分化の確認は、Oil Red O 染色による脂肪滴の形成を確認することにより行った。染色には、Oil Red O 染色キット（株式会社バイオ未来工房）を用いた。染色は、まず、培養液を除去後、PBSにて1回洗浄し、OR 固定液にて、室温で30分間静置して固定を行った。固定液を除去後、OR 洗浄液で2回洗浄し、OR 染色液にて、室温で10分程度静置し、脂肪滴が赤く染まったことを確認

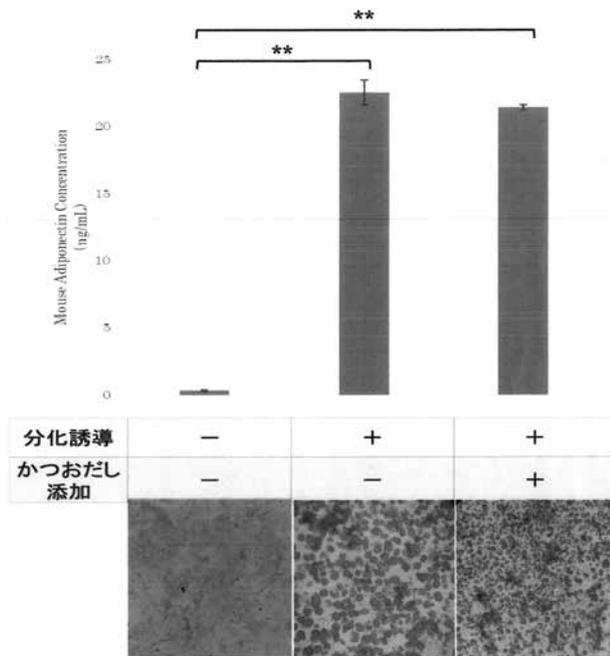


図1 分化誘導した3T3-L1細胞におけるかつおだし添加の影響

(上図) マウス3T3-L1細胞の培養上清、分化誘導した3T3-L1細胞の培養上清及び分化誘導後に培地にかつおだしを添加して培養を行った3T3-L1細胞の培養上清中のアディポネクチン濃度を、ELISA法で測定した。結果は、3回の測定値の平均±標準偏差で示し、対応のないt検定により評価を行った。(**)は、0.01未満で有意差があることを示している。

(下図) 培養上清を除いた後の各細胞をOil Red O染色し、脂肪滴の形成を顕微鏡下で確認した。

後、染色液を除去して精製水で2回洗浄を行い、顕微鏡下で脂肪滴を観察した。

培養上清中のアディポネクチンの定量

培養上清中のアディポネクチン濃度は、Quantikine ELISA, Mouse Adiponectin/Acrp30 (R&D SYSTEMS)を用いたELISA法により測定した。測定は、ASSAY PROCEDUREに従って行い、吸光度の測定は、Multimode Plate Reader, ARVO™ X3 (PerkinElmer)で行った。

統計処理

全ての測定値は、平均値±標準偏差で示した。統計処理には、GraphPad Prism ver.5 for Windows (日本語版)((有)エムデーエフ)を用いた。鯉出汁摂取期間前後の測定値の検定には、対応のないt検定により評価した。統計的有意水準は、すべて5%未満とした。

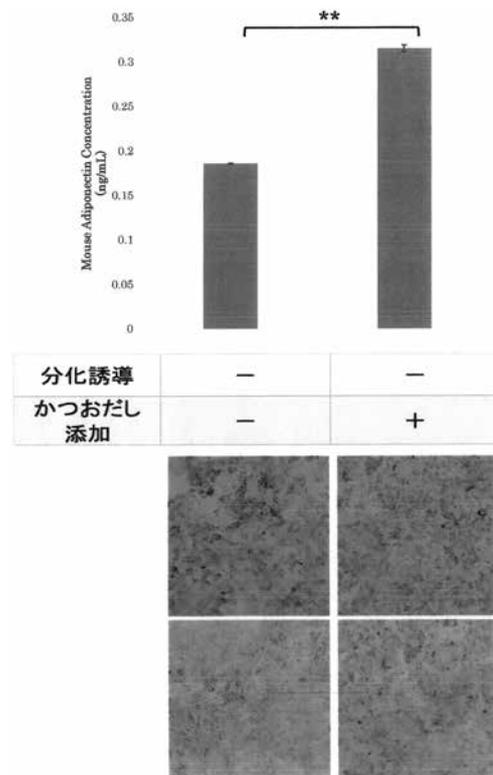


図2 未分化の3T3-L1細胞におけるかつおだし添加の影響

(上図) 分化誘導していないマウス3T3-L1細胞を、培地中にかつおだし添加の有無で培養を行った培養上清中のアディポネクチン濃度を、ELISA法で測定した。結果は、3回の測定値の平均±標準偏差で示し、対応のないt検定により評価を行った。(**)は、0.01未満で有意差があることを示している。

(下図) 培養上清を除いた後の各細胞をOil Red O染色し、脂肪滴の形成を顕微鏡下で確認した。

3. 結果

分化誘導した3T3-L1細胞に及ぼす培地へのかつおだし添加の影響

3T3-L1細胞を分化誘導培地により脂肪細胞に分化させると、培養上清への顕著なアディポネクチンの分泌亢進(図1上)及びOil Red O染色による脂肪滴形成(図1下)が確認された。脂肪細胞に分化誘導した3T3-L1細胞の培地中にかつおだしを添加しても、培養上清へのさらなるアディポネクチンの分泌亢進は観察されなかった(図1上)が、分化誘導により形成された脂肪滴の形態の変化が観察され、かつおだし添加により脂肪滴は小型化していた(図1下)。

分化誘導していない3T3-L1細胞に及ぼす培地へのかつおだし添加の影響

分化誘導していない3T3-L1細胞の培地中へのかつおだしの添加は、分化誘導時と比べるとはるかに少なく、わずかではあるものの、有意な培養上清中へのアディポネクチン分泌量の増加が見られた(図2上)。しかしながら、Oil Red O染色では明らかな脂肪滴形成は観察されなかった(図2下)。

4. 考察

かつおだしは、古来より日本人に親しまれており、日本人の伝統的な食文化の一つとして、多くの食品に使用されている。鹿児島県の薩摩半島南部の郷土料理である「茶節」や沖縄の「鰹湯(カチューユ)」に見られるように、疲労回復や滋養強壮に効果があると言われてきた。かつお節の及ぼす健康増進効果については、江戸時代(元禄10年)に刊行された「本朝食鑑」にも、「気血を補い、腸胃を調え、筋力を壮し、・・・」などと記載されている⁸⁾。また、かつおだしには、血圧降下やコレステロール低下などの健康効果も報告されている。我々は、かつおだしの摂取によりヒト血中アディポネクチン濃度が上昇することを報告してきた^{2,4)}。しかしながら、現在までのところ、かつおだし中のどのような成分が、どのようなメカニズムで血中アディポネクチン濃度の上昇に関与しているのかは不明である。そこで、脂肪細胞への分化能及びアディポネクチン産生能を有する培養細胞を用いたアッセイ系を構築するための検討を行った。今回は、dexamethasone, isobutyl-methylxanthine, insulinによる刺激で効率よく脂肪細胞に分化することが知られているため、脂質代謝の細胞モデル系として広く用いられているマウス胎児線維芽細胞株3T3-L1を用いることとした。かつおだしの培地への添加により、脂肪細胞への分化誘導を行った3T3-L1細胞では、アディポネクチンの分泌亢進は観察されなかった(図1上)が、

脂肪滴の形態の変化が観察された(図1下)。一方で、分化誘導していない3T3-L1細胞では、アディポネクチンの分泌の有意な亢進が見られた(図2上)が、脂肪細胞への明らかな分化は観察されなかった(図2下)。かつおだしの培地への添加による明らかな影響が観察されたため、今後は、用量依存性などさらに検討を重ねて、かつおだしによるアディポネクチン産生亢進機構を解明するための*in vitro*の系を構築する必要がある。アッセイ系の構築は、かつおだし中の機能性成分のスクリーニングや、同定された有効成分を活用したメタボリック症候群の予防や治療につながる可能性がある。

現在までに、アディポネクチンの発現制御には核内レセプタースーパーファミリーのメンバーの転写因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ)の関与が明らかにされている⁹⁾。そのため、かつお節に含まれる栄養成分の中で、アディポネクチンの増加に関わる可能性があるものとしては、PPAR γ のリガンドであるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)も考えられる¹⁰⁾。しかしながら、この報告では高濃度のEPAやDHAを給餌したマウスでの実験結果であるため、かつお本枯れ節だしの摂取実験で摂取したかつおだし中のDHAやEPAの量で、ヒトにおいても血液中的のアディポネクチンが十分に上昇するのかが不明である。*in vitro*アッセイ系の構築により、かつおだしによるアディポネクチン産生におけるPPAR γ の関与やDHA、EPAの関与の可能性の検討なども可能になる。

本研究により、ヒト血清中のアディポネクチン濃度を高めるかつおだしの成分を検索し、アディポネクチン産生機構を解明するための基盤が築かれた。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、客員研究員として迎え入れてくださり、いろいろと便宜を図っていただきました鹿児島大学大学院医歯学総合研究科糖尿病・内分泌内科学研究室の方々に感謝いたします。特に、有用なご助言をいただきました西尾善彦教授と橋口裕博士に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Adiponectin and adiponectin receptors. Kadowaki T and Yamauchi T, Endocrine Reviews, 26: 439-451, 2005
- 2) 鰹出汁摂取によるヒトの体組成と血液検査値の変動, 住澤知之, 鹿児島女子短期大学紀要, 48: 11-16, 2013
- 3) 鰹出汁摂取によるヒトの体組成, 血液検査値及び精神状態の変化, 住澤知之, 田中友莉恵, 宮内香奈, 浜崎真美, 胸元孝夫, 竹中正巳, 宮内朝世, 鹿児島女子短期大学紀要, 49: 5-9, 2014
- 4) 鰹出汁摂取による血中アディポネクチン濃度の上昇-指宿市

「地域食材の健康に及ぼす機能性効果研究委託事業」による
検証, 住澤知之, 鹿児島女子短期大学紀要, 52: 1-4, 2017

- 5) β -conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. Tachibana N *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 74: 1250-1255, 2010
- 6) Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. Kunimasa K *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19(7) : 2062-2064, 2009
- 7) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3 T 3 - L1 cells. Rubin CS, Hirsch A, Fung C and Rosen OM, J. Biol. Chem., 253: 7570-7578, 1978
- 8) 丹岳野必大千里, 本朝食鑑, 9巻, 1697
- 9) The Mechanisms by Which Both Heterozygous Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Deficiency and PPAR γ Agonist Improve Insulin Resistance. Yamauchi T *et al.*, J. Biol. Chem., 276: 41245-41254, 2001
- 10) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. Flachs P *et al.*, Diabetologia, 49: 394-397, 2006

(2023年11月23日 受領 / 2023年12月7日 受理)