

細胞内小胞輸送経路を利用した脂質代謝評価法の開発

Evaluation of intracellular lipid metabolism by utilizing vesicle trafficking systems

中村優子

Yuko Nakamura-Sugimoto

食品開発研究所 バイオ技術科

体内への脂質蓄積を低減させる食品素材が近年注目されており、その機能性評価法への要望が高まっている。本研究では、従来法より迅速で簡便に脂質代謝を評価する手法として、培養細胞が脂質を代謝する経路を遮断し、食事性の脂質吸収のみを評価する系を開発した。

1. はじめに

食事により摂取されたコレステロールや中性脂肪などの脂質は、肝臓で各種リポ蛋白に封入され、血流により体内を循環し、必要な組織へと再分配される。過剰に摂取された脂質は体脂肪として蓄積されるだけでなく、酸化された過剰リポ蛋白は動脈硬化などの要因となりえる。そのため、普段の食生活から脂質蓄積を低減させることが期待できる食品素材が注目され、特定保健用食品の「コレステロール」や「体脂肪」の軽減を図るカテゴリーの食品は、整腸効果に次ぐ売上高を誇る¹⁾ため、体内への脂質吸収を抑制する効果を示す素材の探索に対する要望が高まっており、培養細胞でその効果を簡易にスクリーニングする系が必要と考えた。

培養細胞では培地中の脂質を、細胞内小胞輸送経路で運搬することが明らかとなっており、その輸送を遮断することで、細胞にとっての「食事性」脂質の蓄積状態を作りだせることが明らかとなっている²⁾。本研究では、この作用を利用し、細胞の脂質蓄積を解消できる食品素材を評価する系を確立することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

評価系の確立のため、細胞内コレステロールの含有量が少ない細胞株として、ハムスター卵巣細胞

(CHO 細胞)を用いた。CHO 細胞の培養は、10%子牛血清を含む Ham's F-12 培地で行った。通常のコレステロールやトリグリセリドの蓄積抑制の評価には、ヒト肝ガン細胞株である HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞は、10%子牛血清を含む D-MEM (低グルコース)で行った。

2.2 コレステロールの蓄積抑制効果

細胞にコレステロールを蓄積させるために、細胞を 3β -(2-Diethylaminoethoxy)androst-5-en-17-one (U18666A)を含む培地で一晚培養した。この際に、食品素材ならびに、陽性対照としてコレステロール吸収阻害効果が実証されている茶カテキンを同時に投与し、コレステロール蓄積を阻害するかを調べた。この評価には、蛍光染色法と定量法を用いた。

蛍光染色法には、遊離型コレステロールを特異的に認識し、自家蛍光を発するカビ毒素である filipin を用いた。細胞をホルマリン固定後、nonidet P-40 で透過性処理を行い、リン酸緩衝液に溶解した filipin で細胞を処理後に、蛍光顕微鏡で観察した。

定量法は、和光純薬の総コレステロール測定キットにより、手順に準じて測定を行った。この際3回の独立した試験の結果を統計し、結果を算出した。

2.3 小胞の分解阻害による蓄積脂質の解析

分解小胞であるライソゾームの機能を阻害する

ために、クロロキンを含む培地で3日間培養した。この際に、食品素材ならびに、陽性対照として、コレステロールと同様に中性脂質の吸収阻害効果が実証されている茶カテキンを同時に投与し、コレステロール蓄積を阻害するかを調べた。この評価には、脂肪滴染色法と定量法を用いた。

脂肪の染色には、オイルレッドOを用いた。細胞をホルマリン処理後、イソプロパノールで洗浄し、イソプロパノールに溶解したオイルレッドO染色液で処理し、光学顕微鏡で観察した。

定量法は、和光純薬のリン脂質測定キットにより、手順に準じて測定を行った。この際3回の独立した試験の結果を統計し、結果を算出した。

3. 結果と考察

3.1 コレステロールの蓄積抑制効果

培養細胞のコレステロールの供給源は、血清中のLDL(低密度リポ蛋白)から取り入れる外因性コレステロールと、アセチル CoA から合成する内因性のコレステロールの主に2つがある。これらの供給源を遮断することで過剰なコレステロールの吸収を抑制するが、コレステロール合成の阻害は医薬品が、外因性コレステロールの吸収阻害は特定保健用食品などの食品素材がそのターゲットとなっている(図1)。LDL から供給されるコレステロールは細胞内小胞輸送経路に乗り、細胞内の分解器官であるライソゾームへと運搬され遊離型のコレステロールに変換されることで、細胞膜として利用されるか、HDL(低密度リポ蛋白)に封入され体内循環を行う。LDL コレステロールをライソゾームから運搬する細胞内小胞は、プロゲステロンのアナログであるU18666Aで特異的に阻害されるものであるため、この薬剤で細胞を処理するとライソゾームに遊離型コレステロールが選択的に蓄積することが明らかとなっている³⁾。細胞内に外因性コレステロール蓄積させる過程で、コレステロールの吸収阻害を起こす食品成分を投与すれば、蓄積を止めるだけでなく、恒常的に代謝される経路があるために吸収阻害の効果を調べるこ

とが難しいコレステロールの含有量にも大きな差が出てくるのではないかと考えた。

試験系の確立のため、まず細胞内コレステロール含量が少ないCHO細胞にU18666A処理を行い、未処理群との差が明らかになるかを確認した。U18666A処理後、遊離型コレステロールを特異的に染色する手法である、filipin染色を実施したところ、薬剤処理により優位にコレステロールの蓄積が確認された(図2)。この時の細胞内コレステロールを定量したところ、処理の有無により有意に差が見られた(図3)。

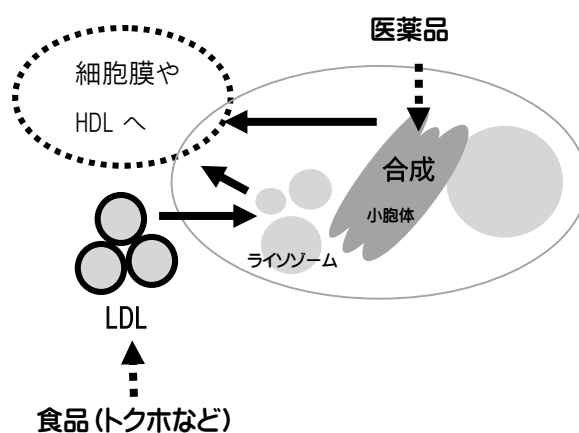
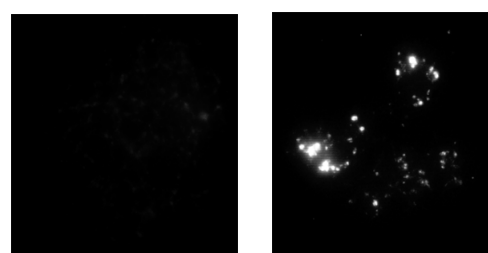


図1 コレステロールの細胞内循環



未処理 U18666A 処理

図2 U18666A投与時のfilipin染色(CHO細胞)

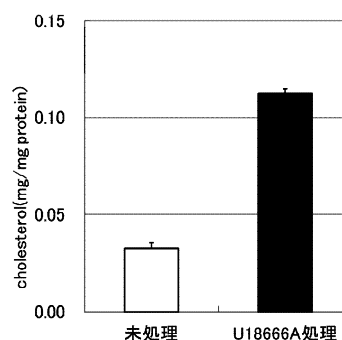


図3 U18666A投与時のコレステロール量(CHO細胞)

次に、コレステロールが盛んに代謝されている肝ガン細胞 HepG2 において、コレステロール吸収阻害を示す茶カテキンが U18666A によるコレステロール蓄積作用を阻害するかどうかを調べた。U18666A 投与により細胞内コレステロール量が増加したが、カテキンを同時に投与したものではコレステロール量の減少が有意に見られた (図4)。filipin 染色によるコレステロールの観察では、カテキン投与によりコレステロールが減少している様子が確認できた (図5)。以上のことから、従来法では有意差を出すのが難しいとされていたコレステロール吸収阻害効果について、顕微鏡像と定量の2つの側面から確実に、且つ迅速に評価する系が確立できた。

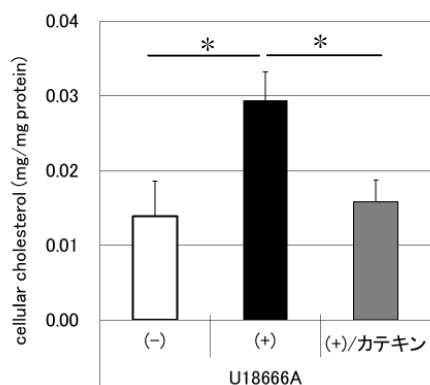


図4 U18666A と茶カテキンの投与時の細胞内コレステロール量 (*:p<0.05)

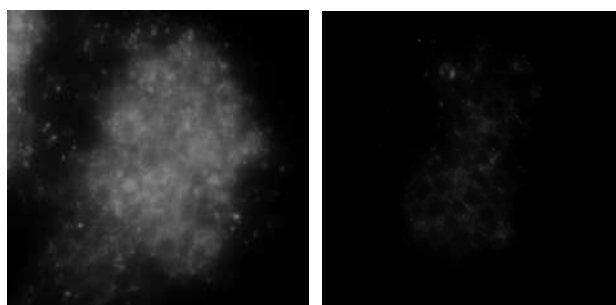
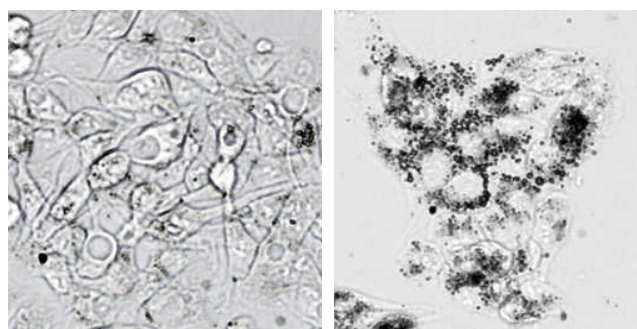


図5 U18666A 投与における茶カテキンの効果 (filipin 染色)

3.2 リン脂質の蓄積抑制効果

細胞内の脂質輸送には、U18666A が阻害する経路以外にも多くの小胞輸送が関与している。そこで、小胞の最終目的地であるライソゾームの pH を上昇させることで分解機能を破壊するクロロキンを細胞に投与し、多くの小胞輸送を停止させた場合にどの

ような脂質が蓄積するかを確かめた。クロロキンを肝ガン細胞 HepG2 に投与したところ、オイルレッド O 陽性の脂肪滴が多数観察された (図6)。そのため、クロロキン投与により中性脂質が蓄積することが予想されたが、この細胞にはリン脂質も蓄積し、カテキンの投与によりリン脂質量が投与前のレベルまで下がるのが分かった (図7)。以上のことから、クロロキン投与による脂質蓄積モデルにより、リン脂質と中性脂質の複合蓄積を引き起こし、肝細胞においては脂肪肝のモデルとして利用できることが示唆された。



未処理 クロロキン処理

図6 クロロキン投与時のオイルレッド O 染色

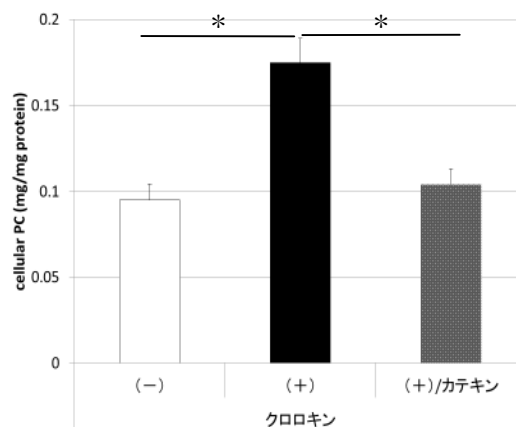


図7 クロロキンと茶カテキン投与時の細胞内リン脂質量 (*:p<0.05)

4. おわりに

本研究は、各脂質に特有の細胞内運搬小胞を特異的に阻害する薬剤を用いて細胞内に脂質を蓄積させる手法を、脂質吸収阻害作用を持つ素材の効果を視覚的に、且つ、定量的に評価する系へと発展させた。

従来法での脂質吸収効果の評価は脂肪細胞や肝細胞に、単に素材を投与し、細胞内の脂質を定量するものであったため、細胞内で恒常的に代謝回転している脂質では素材の効果を調べるのが非常に難しかった。本法は、外因性の脂質のフローを止めることで、1) 脂質含量の少ない細胞であってもその差を優位に確認できる、2) 蛍光等を用いた染色により蓄積個所が見やすくなるため、視覚的な評価がしやすい、3) 代謝回転が非常に早い脂質であれば、非常に短い時間でのアッセイを可能にする点で優れた手法であると言える。

今回は、コレステロールと中性脂質、リン脂質の評価法を確立したが、他の輸送阻害薬を用いることで、脂質だけではなく様々な基質の代謝の吸収阻害や促進の効果を評価できる系へと発展させたい。

文献

- 1) 日本健康・栄養食品協会; トクホ市場調査 (2011), <http://www.jhnfa.org/tokuho2011.pdf>
- 2) Sugimoto, Y. *et.al.* ; Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 129(6), p.875-80(2001)
- 3) Liscam, L. *et.al.* ; The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem*, 264(20), p.11796-806(1989)