

3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化に対するプロリルヒドロキシプロリンの影響

沢谷里江*¹・小山洋一*⁴・永易彩*²・保坂真善*²
植田弘美*²・眞船直樹*³・竹花一成*²

Effect of prolyl hydroxyproline on the differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes *in vitro*

Satoe SAWAYA*¹, Yoh-ichi KOYAMA*⁴, Aya NAGAYASU*², Yoshinao HOSAKA*²,
Hiromi UEDA*², Naoki MAFUNE*³ and Kazushige TAKEHANNA*²

(Accepted 15 July 2008)

緒 論

現代は欠食, 偏食, 過食といったアンバランスな食習慣により乱れた栄養摂取が起り, 肥満者数が急増している。肥満は脂肪細胞の肥大化と細胞数の増加が関与し, 糖尿病, 高血圧, 高脂血症などの主要なリスクファクターでもある。この脂肪細胞は, 全身に分布している脂肪組織の中に存在している。脂肪組織は, 脂肪滴を貯蔵している脂肪細胞と脂肪前駆細胞が存在する間質と脈管系から構成される。また, 脂肪細胞には褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の2種類が存在する。褐色脂肪細胞は, 細胞内中性脂肪 (TG) 由来の脂肪酸を自身で酸化分解し, 熱として放散するエネルギー消費細胞として機能している。一方白色脂肪細胞は, 褐色脂肪細胞とは存在部位や形態, 生理機能も全く異なり, 余剰なエネルギーを TG の形で貯蔵するという従来から知られている機能に加え, レプチン, 腫瘍壊死因子- α (TNF- α), 遊離脂肪酸 (FFA), プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) のようなシグナル分子 "アディポサイトカイン" を分泌する内分泌細胞としても機能する。例えば, 肥大化した脂肪細胞からは TNF- α , レジスチン, FFA が大量に産生・分泌されて骨格筋や肝臓でインスリンの情報伝達を障害し, インスリン抵抗性を惹起する^[2]。これらの背景から, 栄養補助食品等を利用した健康の維持・増

進への取り組みが効果的であると考えられ, 現在様々な健康食品が普及しており, コラーゲンペプチド (CP) はその一つである。

CP を経口摂取すると血液中の TG が低下することや, 真皮の線維芽細胞や腱組織の腱細胞を活性化してコラーゲン細線維を密に集合させることが明らかにされている^[10-11,14,19,22]。その作用機序は明らかにされていないが, CP を経口摂取すると, 血清や血漿中に CP 由来の Pro-Hyp, Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Pro-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp などのオリゴペプチドが認められている。その大半はプロリルヒドロキシプロリン (Pro-Hyp) で, 摂取1~2時間後の静脈内に約 50 nmol/ml 出現したという報告がある^[4]。この報告は, 経口的に摂取した CP が消化管より吸収され, オリゴペプチド状態で血流を介して脂肪細胞や肝細胞などに作用し, TG の取り込みを促進させたり, 線維芽細胞や腱細胞に作用してそれらを活性化したりする可能性を示唆している。すなわち, 細胞に対するこれらオリゴペプチドの作用を明らかにすることは, 栄養補助食品としての CP の有用性をより向上させると考えられる。

そこで本研究では, *in vitro* において血液中出现するオリゴペプチドの大半を占める Pro-Hyp が, 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導に与える影響を生化学的, 形態学的に解析し, 血中 TG が低下す

*¹ 2007 年度酪農学園大学大学院酪農学研究科食品栄養科学専攻修士課程修了

*² 酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医解剖学教室

Department of Veterinary Anatomy, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

*³ 酪農学園大学酪農学部食品科学科栄養学研究室

Department of Medical Dietetics, School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

*⁴ 株式会社ニッピ, バイオマトリックス研究所

Research Institute of Biomatrix, Nippi Incorporated, 520-11 Kuwabara, Toride, Ibaraki 302-0017, Japan

る機序について考察した。

材料および方法

(1) 細胞

3T3-L1 脂肪前駆細胞 (資源番号: IFO 50416, ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) を用いた。

(2) 培養方法

3T3-L1 脂肪前駆細胞を, 10% Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, U.S.A.), 1% ペニシリンとストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, U.S.A., 以下 DMEM と略) 培養液を使用し 37°C・5%CO₂ の条件下で培養を行った。脂肪細胞への分化誘導は, 細胞がコンフルエントに達した時点で, DMEM 培養液に 5 μM インスリン (和光純薬, 大阪), 0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (Sigma-Aldrich, U.S.A.), 0.1 μM デキサメタゾン (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を加えたものに交換して行った。2 日後, 上述の DMEM 培養液に 5 μM インスリンを含むものに再度交換した。なお, 生化学的, 形態学的解析は分化誘導日を 0 日目とし, 7 日おきに分化 56 日目まで行った。

(3) ジペプチド

Pro と Hyp を化学的に合成した Bachem 社 (Switzerland) の G-3025 を使用し, Pinent らの方法^[16] と Kim らの方法^[5] を参考にして分化 0 日目と 2 日目に合わせて 2 回, 50 μM または 200 μM の添加を行なった。実験群は, 無添加群, 50 μM Pro-Hyp 群, 200 μM Pro-Hyp 群とした。

(4) 生化学的解析方法

脂肪の定量は Oil Red O 法を用いて行った。培養細胞を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 回洗浄し, 10%ホルムアルデヒド水溶液で 1 時間固定後, 0.1 mg/ml Oil Red O 溶液 (和光純薬, 大阪) で 2 時間染色した。染色後 Oil Red O 溶液を捨て, 100% イソプロピルアルコールを加え, 分光光度計 (V-530 型紫外可視分光光度計; 日本分光, 東京) にて 510 nm の波長での吸光値を測定し, 各群の脂肪量を透過度の対数 (Abs) ± 標準誤差として表した。

(5) 位相差顕微鏡観察

Oil Red O 染色した細胞内脂肪滴の観察は, シャーレに培養液が入った状態で位相差顕微鏡

(CX2; オリンパス, 東京) を用いて行った。Oil Red O 染色前と染色後の位相差像は, 顕微鏡デジタルカメラ (DP20; オリンパス, 東京) を用いて撮影した。染色後の位相差顕微鏡像から 100 個の脂肪滴を無作為に選び, 脂肪滴の直径を解析ソフト (Image J, version 1.30; NIH, U.S.A) で計測した。

(6) 統計学的解析方法

算出された脂肪量と脂肪滴の直径について, Tukey-Kramer の検定 ($P < 0.05$) を行った。

結 果

吸光度を指標とした脂肪量の変化を Fig. 1 に示した。無添加群の細胞形態は, 分化 7 日目で細胞質に小さな脂肪滴が出現し, 14 日目には小さな脂肪滴

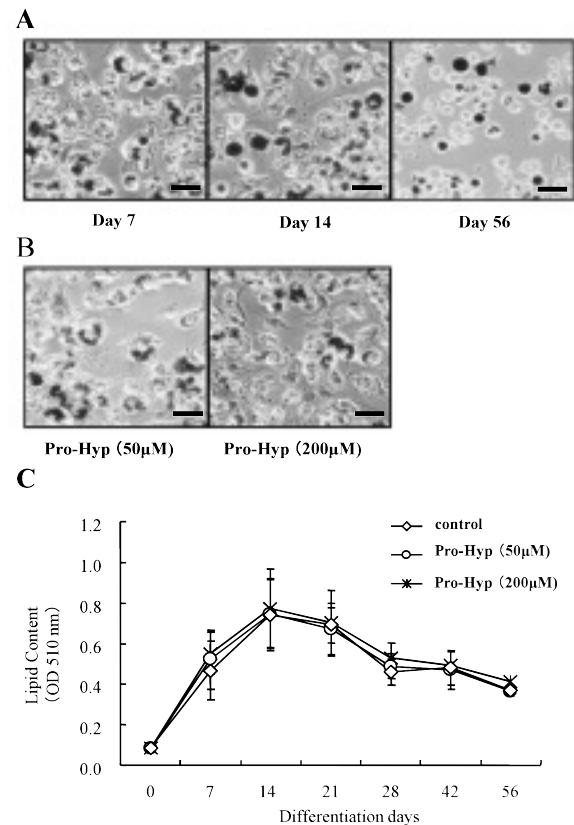


Fig. 1 Effects of Pro-Hyp on intracellular lipid accumulation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes.

Lipid droplets were visualized by Oil Red O staining. Phase-contrast micrographs of cells in (A) the control group on days 7, 14 and 56 and in (B) the 50 μM Pro-Hyp group and the 200 μM Pro-Hyp group on day 7. Bar=50 μm (C) Changes in lipid content during culture for 56 days. No significant difference was detected among the three groups.

を含有した細胞と大きな脂肪滴を含有した細胞が共に観察された。分化 56 日目では大きな脂肪滴を含有した細胞と脂肪滴を含有していない細胞が観察された。50 μM Pro-Hyp 群, 200 μM Pro-Hyp 群の細胞形態は, 無添加群と同様の結果であった。無添加群の脂肪量は, 分化 7 日目に 0.47 ± 0.15 で, 14 日目では 0.74 ± 0.18 と増加した。その後, 分化 21 日目には 0.69 ± 0.09 , 28 日目 0.47 ± 0.06 , 42 日目 0.48 ± 0.08 , 56 日目は 0.37 ± 0.03 を示し, 分化 28 日目から 56 日目にかけて緩やかに脂肪量が減少した。50 μM Pro-Hyp 群では, 分化 7 日目で 0.55 ± 0.15 , 14 日目では 0.75 ± 0.17 を示して, 細胞内の脂肪量が増加した。その後, 分化 21 日目には 0.67 ± 0.13 , 28 日目には 0.49 ± 0.06 , 42 日目には 0.47 ± 0.10 , 56 日目には 0.36 ± 0.02 と, 分化 14 日目以降では細胞内の脂肪量が減少した。また 200 μM Pro-Hyp 群での脂肪量は, 分化 7 日目で 0.55 ± 0.10 , 14 日目では 0.77 ± 0.20 と増加した。その後分化 21 日目には 0.70 ± 0.16 , 28 日目には 0.53 ± 0.08 , 42 日目には 0.49 ± 0.09 , 56 日目には 0.41 ± 0.05 と, 分化 14 日

目以降では脂肪量が減少した。無添加群と 50 μM Pro-Hyp 群および 200 μM Pro-Hyp 群との間に有意差は認められなかった。また, 50 μM Pro-Hyp 群と 200 μM Pro-Hyp 群との間にも有意差は認められなかった。

培養日数による脂肪滴の直径の分布を Fig. 2 に示した。無添加群では, 分化 7 日目の 10 μm 以上の脂肪滴の割合は 20%, 14 日目で 23%, 56 日目には 36% と分化日数の経過に伴い増加した。一方, 5 μm 未満の脂肪滴は分化 7 日目に 35%, 14 日目に 19%, 56 日目に 18% となり分化日数の経過に伴い減少した。50 μM Pro-Hyp 群では, 分化 7 日目の 10 μm 以上の脂肪滴の割合は 23%, 14 日目には 22%, 56 日目には 39% と分化日数の経過に伴い増加した。分化 7 日目の 5 μm 未満の脂肪滴は 26%, 14 日目で 20%, 56 日目で 15% と分化日数に伴い減少した。200 μM Pro-Hyp 群では, 分化 7 日目の直径 10 μm 以上の脂肪滴の割合は 23%, 14 日目で 31%, 56 日目で 39% と分化日数に伴い増加した。一方 5 μm 未満の脂肪滴は, 分化 7 日目に 26%, 14 日目に 16%, 56

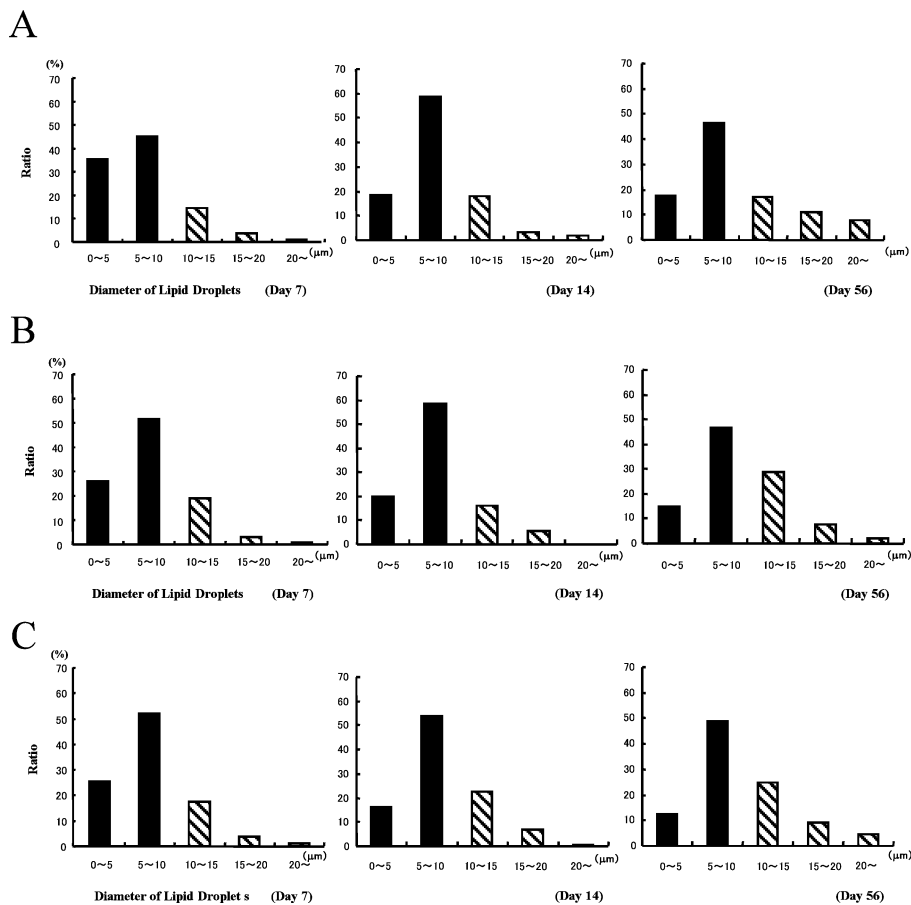


Fig. 2 Distributions of diameter of lipid droplets in (A) the control group, (B) the 50 μM Pro-Hyp group and (C) the 200 μM Pro-Hyp group.

日目に13%と分化日数の経過に伴い減少した。

分化7日目で脂肪滴の直径の分布を比較すると、無添加群と50 μ M Pro-Hyp群および200 μ M Pro-Hyp群の間に有意差はなかったが、5 μ m未満の脂肪滴の割合は、50 μ M Pro-Hyp群と200 μ M Pro-Hyp群でいずれも無添加群より9%減少しており、直径の小さな脂肪滴が減少する傾向が認められた。

考 察

食事から得られた糖や脂質が血液中に必要以上に存在することは体にとって好ましいことではない。このため脂肪細胞は、余剰な糖や脂質をTGに変換して細胞の中に取り込み、血液中の濃度を一定に保つ役割を果たしている。しかしながら、栄養が過剰になると、個々の脂肪細胞の肥大化や細胞数の増加により肥満状態が引き起こされる^[20]。

脂肪細胞のライフサイクルは、中胚葉系多機能幹細胞から脂肪前駆細胞が形成される過程、脂肪前駆細胞が増殖した後に成熟脂肪細胞へと分化する過程、成熟脂肪細胞が機能を終えてアポトーシスなどにより生体より排除される過程に分けて考えることができる。培養脂肪前駆細胞を用いた検討では、適切な分化誘導刺激により一過性の細胞増殖を起こした後、脂肪滴の蓄積と脂肪細胞特異的な遺伝子の発現によって細胞が脂肪細胞へと分化する。さらに、分化した脂肪細胞では数多くの小さな脂肪滴が融合してひとつの大きな脂肪滴となり、その結果として、細胞が肥大化することが報告されている^[21]。このため脂肪細胞には様々な大きさの細胞があり、小型の脂肪細胞と大型の脂肪細胞では性質がまったく異なる。TGを過剰に蓄積して肥大化した大型脂肪細胞ではTNF- α 、PAI-1、FFAなどが多く分泌され、メタボリックシンドロームや糖尿病、脂質代謝異常症、動脈硬化などの生活習慣病の原因になる。一方、TGの蓄積が少ない小型の脂肪細胞はメタボリックシンドロームや生活習慣病を予防、改善する作用を持つアディポネクチンを多く分泌することが明らかにされている^[2,13]。このことから、小型の脂肪細胞が増えれば、メタボリックシンドロームになりにくいと考えられている。また、脂肪細胞の分化、糖代謝を薬理的に制御する第1の目的は、脂肪細胞の質的改変をもたらすことである。しかし単に分化を止めた場合は、本来脂肪細胞に蓄積されるべき脂肪の行き場がなくなり、肝臓や血中の脂肪が増加して脂肪肝や脂質代謝異常症を招く可能性がある^[8]。

コラーゲンに関連するオリゴペプチドが、培養細胞に対して生物活性を示す例が複数報告されてい

る。例えば今回の研究で使用したPro-Hypは、Pro-Hyp-Glyとともに、線維芽細胞や好中球、単球の走化性を活性化する^[9,17-18]。またAsp-Gly-Glu-Alaは骨髄細胞中の骨芽細胞に関連する遺伝子発現を刺激し、Ala-HypとGly-Pro-Valは、アンギオテンシン変換酵素を抑制する^[6,12,15]。さらにGly-Pro-Hypは血小板凝集作用を有するとの報告がある^[7]。

培養系における3T3-L1脂肪前駆細胞の分化は、ドコサヘキサエン酸^[5]やブドウから得たプロシアニン^[16]によって抑制されることから、脂肪細胞への分化過程に対する影響を評価するモデル系となりうる。本研究では、合成される脂肪量と細胞形態には差がない一方、分化誘導7日目で直径5 μ m未満の脂肪滴の割合が、無添加群よりも200 μ M Pro-Hyp添加群および50 μ M Pro-Hyp添加群においてともに低い傾向が認められたことから、Pro-Hypが脂肪滴の癒合を促進している可能性が考えられた。しかし、10 μ m以上の脂肪滴の割合は各群間で差異が認められなかったことから、Pro-Hypは脂肪滴の融合による最終的な大型化は促進しないと考えられた。本研究ではPro-Hypの処理は分化初期の2日間のみとした。そのため分化7日目でのみPro-Hyp処理が脂肪前駆細胞の分化に影響を与えた可能性があることから、さらに長期間の処理についても検討する必要があるが、本研究は、肥満に関係する脂肪前駆細胞および脂肪細胞に対するPro-Hypの作用を検討した最初の報告である。

Wuら^[22]は、ラットへのCP経口投与によって血中TGが低下したことを報告している。その作用メカニズムはまだ不明であるが、肥満児では血清アディポネクチン値とTG値の間に負の相関があることが報告されている^[1]。このことから、CPの経口摂取で血中に出現するPro-Hypが脂肪細胞の大型化を促進せずにアディポネクチンの分泌を促進した可能性が考えられる。また、TG代謝に関連する遺伝子発現を調節する転写因子としてPPARが注目されている。PPARには、主に肝臓、腎臓、心臓、消化管に分布するPPAR α 、骨格筋を含め広く分布するPPAR δ 、主に脂肪組織に分布するPPAR γ の3型が知られている。PPAR α は、肝臓、腎臓、心臓、消化管への脂肪酸の流入を高め、ペルオキシゾームおよびミトコンドリアでの脂肪酸の β 酸化に関与する酵素の転写活性を高める。また、カイロミクロンや超低比重リポタンパク(VLDL)の異化に関与するリポタンパクリパーゼ(LPL)の酵素活性を高め、結果的に血中TG値を低下させるとの報告がある^[3]。このことから、CPの経口摂取で血中に出現す

る Pro-Hyp が RRAR α を活性化させたことにより LPL 活性が増加して肝臓などの組織への脂肪酸の流入を高め、 β 酸化が亢進したことによって血中 TG 値が低下した可能性もあり、今後 Pro-Hyp の作用メカニズムをさらに詳細に解明することが必要であると考えられる。

要 約

本研究では、CP をヒトに経口摂取したときに血液中に出現するオリゴペプチドの多くを占めているジペプチド Pro-Hyp が、脂肪細胞への分化に与える影響を生化学的、形態学的に解析した。その結果、合成される脂肪量と細胞形態には差がない一方、分化誘導 7 日目まで直径 5 μ m 未満の脂肪滴の割合が、無添加群よりも 200 μ M Pro-Hyp 添加群および 50 μ M Pro-Hyp 添加群においてともに低い傾向が認められたことから、Pro-Hyp が脂肪滴の癒合を促進している可能性が示唆された。しかし、10 μ m 以上の脂肪滴の割合は各群間で差異が認められなかったことから、Pro-Hyp は脂肪滴の癒合による最終的な大型化を促進しないと推察した。

謝 辞

本研究の一部は、2007 年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成を受けたものである。

引用文献

- [1] Asayama, K., Hayashibe, H., Dobashi, K., Uchida, N., Nakane, T., Koderu, K., Shirahata, A. and Taniyama, M. 2003. Decrease in serum adiponectin level due to obesity and visceral fat accumulation in children. *Obesity Research* **1**: 1072-1079.
- [2] 藤田幸一, 船橋 徹. 2006. アディポサイトカインの概念 *細胞* **38**: 224-2532.
- [3] Inoue, I. 2006. PPAR. *Jap. J. Clin. Nutri.* **108**: 707-717.
- [4] Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y. and Ohtsuki, K. 2005. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 6531-6536.
- [5] Kim, H.K., Della-Fera, M., Lin, J. and Baile, C.A. 2006. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* **136**: 2965-2969.
- [6] Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J. and Shahidi, F. 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2992-2997.
- [7] Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Ichinohe, T., Okuma, M., Farnedale, R.W. and Barnes, M.J. 1999. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc. Res.* **41**: 450-457.
- [8] 楠堂達也, 森山達哉, 高橋信之, 河田照雄. 2004. ゲノム創薬からみた脂肪細胞分化と肥満 *ゲノム医学* **4**: 629-636.
- [9] Laskin, D.L., Kimura, T., Sakakibara, S., Riley, D.J. and Berg, R.A. 1986. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **39**: 255-266.
- [10] Matsuda, N., Koyama, Y., Hosaka, Y., Ueda, H., Watanabe, T., Araya, T., Irie, S. and Takehana, K. 2006. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **52**: 211-215.
- [11] Minaguchi, J., Koyama, Y., Meguri, N., Hosaka, Y., Ueda, H., Kusubata, M., Hirota, A., Irie, S., Mafune, N. and Takehana, K. 2005. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **51**: 169-174.
- [12] Mizuno, M. and Kuboki, Y. 2001. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J. Biochem.* **129**: 133-138.
- [13] 西澤 仁, 船橋 徹. 2005. メタボリックシンドロームとアディポサイエンス *Adiposcience* **2**: 63-71.
- [14] Oliveira, D.R., Portugal, L.R., Cara, D.C., Vieira, E.C. and Alvarez-Leite, J.I. 2001. Gelatin intake increases the atheroma for-

- mation in apoE knock out mice. *Atherosclerosis* **154**: 71-77.
- [15] Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* **566**: 128-137.
- [16] Pinent, M., Blade, M.C., Salvado, M.J., Arola, L., Hackl, H., Quackenbush, J. and Trajanoski, Z., Ardevol, A. 2005. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int. J. Obes.* **29**: 934-941.
- [17] Postlethwaite, A.E. and Kang, A.H. 1976. Collagen and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J. Exp. Med.* **143**: 1299-1307.
- [18] Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M., Kang, A.H. 1978. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 871-875.
- [19] Ratnayake, W.M., Sarwar, G. and Laffey, P. 1997. Influence of dietary protein and fat on serum lipids and metabolism of essential fatty acids in rats. *Br. J. Nutr.* **78**: 459-467.
- [20] Saito, T., Abe, D. and Sekiya, K. 2007. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**: 371-376.
- [21] 酒井太門, 阪上 浩. 2006. 細胞周期と脂肪細胞分化・肥大化. *医学の歩み* **217**: 135-140.
- [22] Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, M., Mu, G. and Ishimi, Y. 2004. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J. Bone Miner. Metab.* **22**: 547-553.

Summary

Collagen peptide is a popular ingredient of functional foods. A number of oligopeptides appear in blood when collagen peptide is ingested, and prolylhydroxyproline (Pro-Hyp) is the most abundant among those oligopeptides. In this study, the effect of Pro-Hyp on differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes was investigated *in vitro*. Pro-Hyp was added to culture at 50 μ M or 200 μ M on days 0 and 2 of differentiation, and the amount of triglyceride and the size of lipid granule were determined during 56 days of culture. Although the amount of triglyceride was not changed by the addition of Pro-Hyp, the ratio of lipid granules less than 5 μ m in diameter decreased in both of the Pro-Hyp-treated groups in comparison with that in the control group. However, the ratio of lipid granules larger than 10 μ m in diameter did not change. The results suggest that Pro-Hyp affects the differentiation of preadipocytes by promoting the fusion of smaller lipid granules to granules of moderate size, but not by promoting the formation into one large lipid granule, which occurs in the final stage of adipocyte differentiation.