

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

トランス脂肪酸の新規毒性分子基盤に基づく
食品の毒性リスクの検討

研究代表者 平田 祐介 東北大学大学院薬学研究科・助教

研究要旨

トランス脂肪酸は、循環器系疾患との疫学的関連が報告されている。食品安全委員会は健康影響を評価した結果、日本人の平均的な摂取量は総摂取エネルギーの約0.3%で、WHOの目標値(1%)未満であったことから、日本人の通常の食生活では健康への影響は小さいとしている。一方、脂質に偏った食事をしている人に対しては留意が必要とし、厚生労働省は栄養バランスのよい食事を心がけるようウェブサイト上に注意喚起を行っている。トランス脂肪酸に関して、疫学的知見は多い一方、分子・細胞レベルでの解析例に乏しく、詳細な疾患発症機序については長らく不明であった。最近代表者らは、トランス脂肪酸が、細胞外 ATP（自己由来の起炎症因子）や DNA 損傷で誘導される細胞死・炎症を促進する、強力な”病態増悪因子”として作用することを新たに発見し、その作用機構を分子レベルで解明した。この独自に確立した毒性の作用機構・評価系を基に、ウシなどの反芻動物で産生される「天然型」ではなく工業的な食品製造過程で産生される「人工型」のみが強力な毒性を有することをすでに明らかにしている。また、トランス脂肪酸の有害影響が、一部のシス型脂肪酸（DHA・EPA など）や抗酸化物質（アンチオキシダント）によって著しく軽減される一方、酸化促進物質（プロオキシダント）は毒性を増強するなど、食事に共存する物質の含有量が毒性に大きく影響することも発見している。ここで本研究では、代表者らの試験系で、実際に疫学で有害影響が観察されている量から日本人が摂取している量の範囲で、各種脂肪酸摂取の影響がどう反映されるかを確認することで、試験系の妥当性や解釈方法を検討することとした。その上で、各種脂肪酸やアンチ/プロオキシダント等の組み合わせの影響を検討することで、日本人の実際の食生活の文脈におけるトランス脂肪酸の影響、リスク評価に関する科学的根拠の提供を目指した。

ヒトでは、トランス脂肪酸の臓器中の存在量の詳細が知見不足で不明であることを踏まえ、本年度はまず、実際に疫学で有害事象が観察されている量から日本人が摂取している量の範囲内で各種脂肪酸の摂取の影響がどう反映されるか確認するため、「1）トランス脂肪酸の標的部位・臓器における存在量の把握」として、マウスにヒト血中濃度（10 μM 程度）と同程度になるように代表的な「人工型」であるエライジン酸を一定期間摂取させた上で、標的部位・臓器である血管・脳・肝臓などにおける存在量を GC-MS/MS によって経時的に測定し、以降の細胞レベルの実験で使用する適切な処置時間域を算定した。この結果を元に、「2）広範なトランス脂肪酸種・細胞種を対象とした影響調査」を行い、食品中に含まれる代表的な 5 種類のトランス脂肪酸として、人工型 2 種類（エライジン酸、リノエライジン酸）、天然型 3 種類（トランスバクセン酸、ルーメン酸、パルミトエライジン酸）を選定し、毒性影響の調査を行った。その結果、人工型 2 種類では著明な毒性影響が認められた一方、天然型 3 種類には、そのような影響は全く認められなかった。さらに、「3）毒性発現に影響する脂肪酸、アンチ/プロオキシダントの網羅的探索・同定」として、食品中に含まれる様々な脂肪酸やアンチ/プロオキシダントのトランス脂肪酸毒性への影響を調査した。その結果、DHA・EPA などの高度不飽和脂肪酸、エライジン酸の幾何異性体にあたるオレイン酸などのシス型脂肪酸による毒性軽減作用と、その作用機構が明らかになった。一方、アンチ/プロオキシダントについては、食品中に含まれる約 30 個の化合物を評価対象として選定し、トランス脂肪酸毒性への影響を調査したが、選定した 30 化合物の中に、毒性に顕著な影響を与える化合物は存在しなかったことから、次年度さらに広範な化合物の毒性への影響を調査することとした。

A. 研究目的

トランス脂肪酸は、循環器系疾患との疫学的関連が報告されている。食品安全委員会は健康影響を評価した結果、日本人の平均的な摂取量は総摂取エネルギーの約 0.3%で、WHO の目標値（1%）未満であったことから、日本人の通常の食生活では健康への影響は小さいとしている。一方、脂質に偏った食事をしている人に対しては留意が必要とし、厚生労働省は栄養バランスのよい食事を心がけるようウェブサイト上に注意喚起を行っている。トランス脂肪酸に関して、疫学的知見は多い一方、分子・細胞レベルでの解析例に乏しく、詳細な疾患発症機序については長らく不明であった。最近代表者らは、トランス脂肪酸が、細胞外 ATP（自己由来の起炎性因子）や DNA 損傷で誘導される細胞死・炎症を促進する、強力な“病態増悪因子”として作用することを新たに発見し、その作用機構を分子レベルで解明した。この独自に確立した毒性の作用機構・評価系を基に、ウシなどの反芻動物で産生される「天然型」ではなく工業的な食品製造過程で産生される「人工型」のみが強力な毒性を有することをすでに明らかにしている。また、トランス脂肪酸の有害影響が、一部のシス型脂肪酸（DHA・EPA など）や抗酸化物質（アンチオキシダント）によって著しく軽減される一方、酸化促進物質（プロオキシダント）は毒性を増強するなど、食事中に共存する物質の含有量が毒性に大きく影響することも発見している。ここで本研究では、代表者らの試験系で、実際に疫学で有害影響が観察されている量から日本人が摂取している量の範囲で、各種脂肪酸摂取の影響がどう反映されるかを確認することで、試験系の妥当性や解釈方法を検討することとした。その上で、各種脂肪酸やアンチ/プロオキシダント等の組み合わせの影響を検討することで、日本人の実際の食生活の文脈におけるトランス脂肪酸の影響、リスク評価に関する科学的根拠の提供を目指した。

B. 研究方法

1) トランス脂肪酸の標的部位・臓器における存在量の把握

ヒトでは、トランス脂肪酸の血中濃度の知見はある一方で、臓器中の濃度に関する知見は存在しない。そこで、マウスにヒト血中濃度（10 μ M 程度）と同程度になるように代表的な「人工型」であるエライジン酸を一定期間摂取させた上で、標的部位・臓器である血管・脳・肝臓などにおける存在量を GC-MS/MS によって経時的に測定し、以降の細胞レベルの実験で使用する適切な処置

時間域を算定した。

具体的には、マウスにヒト血中濃度と同程度の血中濃度になるような低容量のエライジン酸（12.5 mg/kg, 強制経口投与, C57BL/6N σ 8 週齢, 各 5 匹/群）を毎日 1 回、10 日間摂取させたのちに、脳、大動脈、肝臓、脂肪などの組織を回収し、脂質解析を行なった。なお、本実験は、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に基づき、動物実験専門委員会による実験計画の承認（2023 薬動-004）を得た上で実施した。

2) 広範なトランス脂肪酸種・細胞種を対象とした影響調査

これまで、主要なトランス脂肪酸種、複数の細胞株ですでに評価済みであるが、本解析の対象を、食品中に存在する他の脂肪酸種、および関連疾患に関わりのある他の細胞種に広げることで、脂肪酸種や細胞種ごとの網羅的な有害影響調査を行い、毒性の構造活性相関や細胞種ごとの感受性の違いを調べた。

具体的には、食品中に含まれる代表的な 5 種類のトランス脂肪酸として、人工型 2 種類（エライジン酸、リノエライジン酸）、天然型 3 種類（トランスバクセン酸、ルーメン酸、パルミトエライジン酸）を選定した（Fig. 0）。また、細胞株としては、細胞外 ATP 誘導性細胞死については、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7、およびマウスミクログリア細胞株 BV2、DNA 損傷（ドキソルビシン）誘導性細胞死については、RAW264.7 細胞、ヒト骨肉腫細胞株 U2OS、マウス肝癌細胞株 Hepa1-6 を使用した。

3) 毒性発現に影響する脂肪酸、アンチ/プロオキシダントの網羅的探索・同定

1-1) と並行して、食品中に含まれる脂肪酸、アンチ/プロオキシダントのトランス脂肪酸毒性への影響を解析した。具体的には、飽和脂肪酸やシス型脂肪酸（DHA や EPA など）、アンチ/プロオキシダント（各種栄養成分、食品添加物など）を細胞に処置した際の毒性の有無・程度を調べた。

C. 研究結果

D. 考察

1) トランス脂肪酸の標的部位・臓器における存在量の把握

脂質解析の結果、摂取開始から 10 日後のエライジン酸の血漿中濃度がちょうど 10 μ M 程度（13.9 μ M）となるような条件で、脳にはほとんど蓄積が認められず、肝臓では約 200 μ mol/g tissue、脂肪組織では約 3.5 μ mol/g tissue、大動脈

別添 3

では約 4.7 $\mu\text{mol/g tissue}$ で存在していた。これらの測定結果は、今後の細胞レベルでの実験を行なっていく上で、重要な基礎的データとなった。

2) 広範なトランス脂肪酸種・細胞種を対象とした影響調査

食品に含まれる主要なトランス脂肪酸 5 種類について、細胞外 ATP 誘導性細胞死への影響を調べたところ、人工型 2 種類はエフェクター分子であるストレス応答キナーゼ ASK1 およびその下流の MAP キナーゼ p38 の活性化を亢進し、細胞死を著しく促進した一方で、天然型 3 種類には、そのような作用は全く認められなかった (Fig. 1)。また、DNA 損傷誘導性細胞死についても、U2OS 細胞を使用して同様に調査を行ったところ、人工型 2 種類はエフェクター分子であるストレス応答性 MAP キナーゼ JNK の活性化を亢進し、細胞死を促進した一方で、天然型には同作用は認められなかった。また、RAW264.7 細胞、Hepa1-6 細胞における DNA 損傷誘導性細胞死についても、1) で明らかになった肝臓中のエライジン酸存在濃度 (0-200 μM) の濃度域で同様の結果が得られた (Fig. 2)。

これらの発見は、人工型トランス脂肪酸の摂取に伴う循環器系疾患の発症リスク上昇を示唆してきた過去の疫学的知見を支持する科学的根拠として、重要な基礎的知見である。

3) 毒性発現に影響する脂肪酸、アンチ/プロオキシダントの網羅的探索・同定

食品に含まれる様々な脂肪酸について、エライジン酸による細胞外 ATP 誘導性細胞死の促進作用に与える影響を調べたところ、DHA・EPA などの高度不飽和脂肪酸が、低濃度で効果的に毒性を軽減可能であることを見いだした。詳細な解析から、DNA や EPA は、エライジン酸のエフェクター分子である ASK1 の活性化を抑制することで、毒性を軽減することが明らかになった (Fig. 3)。一方、エライジン酸による DNA 損傷誘導性細胞死の促進作用に与える影響を同様に調べたところ、DHA・EPA は毒性を全く抑制できないが、オレイン酸 (エライジン酸の幾何異性体にあたるシス脂肪酸) がエフェクター分子 JNK の活性化を抑制することで、毒性を効果的に軽減できることを見いだした。したがって、人工型トランス脂肪酸摂取に伴う毒性は、食べ合わせなどの工夫によってシス型脂肪酸と合わせて摂取することで、効果的に軽減可能であることが示唆された (Fig. 4, 5)。

一方、アンチ/プロオキシダントについては、食品に含まれる約 30 個の化合物を評価対象と

して選定し、トランス脂肪酸毒性への影響を調査したが、選定した 30 化合物の中に、毒性に顕著な影響を与える化合物は存在しなかった。次年度は、検討する対象化合物をさらに拡大し、毒性に影響する化合物の同定を目指すこととする。

E. 結論

1) 2) については、研究計画通り実施・完了した。1) については、これまで知見が存在しないヒト臓器中のエライジン酸の存在量を把握する上で参考となる重要な基礎データが得られた。次年度は、エライジン酸以外のトランス脂肪酸についても同様の評価を行い、組織分布を比較検討する予定である。2) については、人工型トランス脂肪酸特異的な毒性影響が確認できたことで、さまざまな病態との関連が示唆されてきた人工型トランス脂肪酸の疫学的知見を支持する重要な知見になったとともに、天然型トランス脂肪酸については、人工型ほど過度にリスクを見積もる必要がないことを示唆する結果となった。次年度は、ヒト血管細胞を用いた毒性検討も行い、人工型トランス脂肪酸の毒性影響や作用機構についても調査をする予定である。3) について、シス型脂肪酸をトランス脂肪酸と同時に摂取することで、トランス脂肪酸毒性の軽減に効果的であることを示唆する結果が得られた。毒性に影響を及ぼす食品中アンチ/プロオキシダントについては、検討対象化合物を拡大して現在も探索を継続中で、次年度には具体的な毒性軽減・増悪に関わる化合物の同定を目指す予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1) 論文発表

A) 国内合計 2 件

1) 平田 祐介, 松沢 厚

メカノセンシングを介した脂質過酸化に伴う細胞死誘導機構

生物物理, 63(6), 310-312, 2023

2) 平田 祐介, 松沢 厚

DHA・EPA によるトランス脂肪酸毒性の抑制作用機構

食品と開発, 59(2), 4-7, 2024

B) 海外合計 6 件

1) Hirata Y, Kashiwabara N, Nada Y, Inoue A, Sato E, Noguchi T, and Matsuzawa A,
A comprehensive toxicological analysis of *trans*-fatty

別添 3

acids (TFAs) reveals a pro-apoptotic action specific to industrial TFAs counteracted by polyunsaturated FAs
Scientific Reports, 13, 5883 (2023)

2) **Hirata Y***, Kojima R, Ashida R, Nada Y, Kimura S, Sato E, Noguchi T, and Matsuzawa A*

Industrially produced *trans*-fatty acids are potent promoters of DNA damage-induced apoptosis

J. Toxicol. Sci., 49(1), 27-36 (2024)

***co-corresponding authors**

3) Noguchi T, Sekiguchi Y, Shimada T, Suzuki W, Yokosawa T, Itoh T, Yamada M, Suzuki M, Kurokawa R, **Hirata Y**, and Matsuzawa A, LLPS of SQSTM1/p62 and NBR1 as outcomes of lysosomal stress response limits cancer cell metastasis

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 120(43), e2311282120 (2023)

4) **Hirata Y**, Ferreri C, Yamada Y, Inoue A, Sansone A, Vetica F, Suzuki W, Takano S, Noguchi T, Matsuzawa A, and Chatgililoglu C, Geometrical isomerization of arachidonic acid during lipid peroxidation interferes with ferroptosis.

Free Radic. Biol. Med., 204, 374-384 (2023)

5) Yamada Y, Noguchi T, Suzuki M, Yamada M, **Hirata Y**, and Matsuzawa A, Reactive sulfur species disaggregate the SQSTM1/p62-based aggresome-like induced structures via the HSP70 induction and prevent parthanatos

J. Biol. Chem., 299(6):104710 (2023)

6) **Hirata Y**, Cai R, Volchuk A, Steinberg BE, Saito Y, Matsuzawa A, Grinstein S, and Freeman SA, Lipid peroxidation increases membrane tension, Piezo1 gating and cation permeability to execute ferroptosis.

Current Biology, 33(7), 1-13 (2023)

G-2) 学会発表

1) ○平田 祐介 (招待講演)

DHA・EPA によるトランス脂肪酸毒性の抑制作用機構

第 24 回公開講演会『食品として健康に寄与する DHA・EPA』

2023 年 10 月 26 日 主婦会館プラザエフ

2) ○平田 祐介, 柏原 直樹, 野口 拓也, 松沢 厚
トランス脂肪酸の新規毒性分子基盤に基づく脂肪酸種ごとの毒性リスク評価

ポスター発表

日本薬学会第 144 年会

2024 年 3 月 28 日～31 日

H. 知的所有権の取得状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

尚、下記に本研究の協力研究者を列挙する。

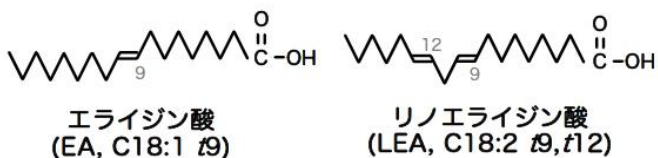
佐藤 恵美子 東北大学大学院薬学研究科

伊藤 隼哉 東北大学大学院農学研究科

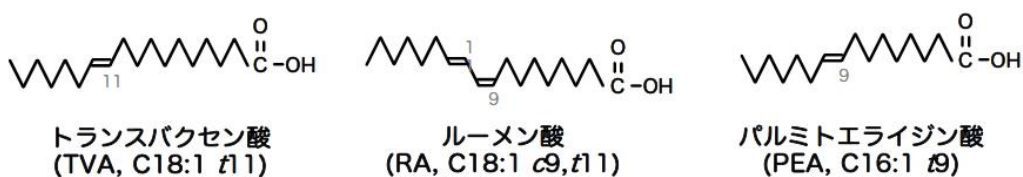
Fig. 0 本研究で用いた脂肪酸の構造

トランス脂肪酸

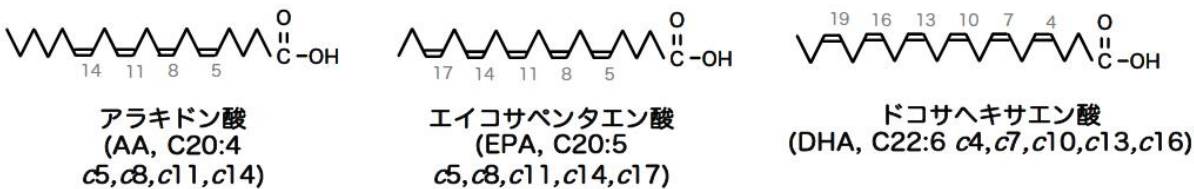
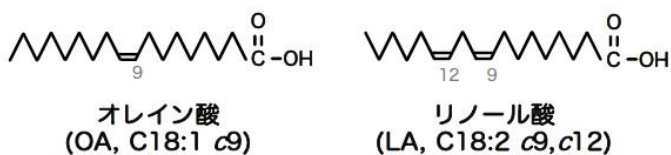
人工型トランス脂肪酸



ruminant TFAs (rTFAs)



シス脂肪酸



括弧内は、左から順に略称、Cの数、二重結合の数、二重結合のシス (*c*)/トランス(*t*) の別、二重結合の位置を表す

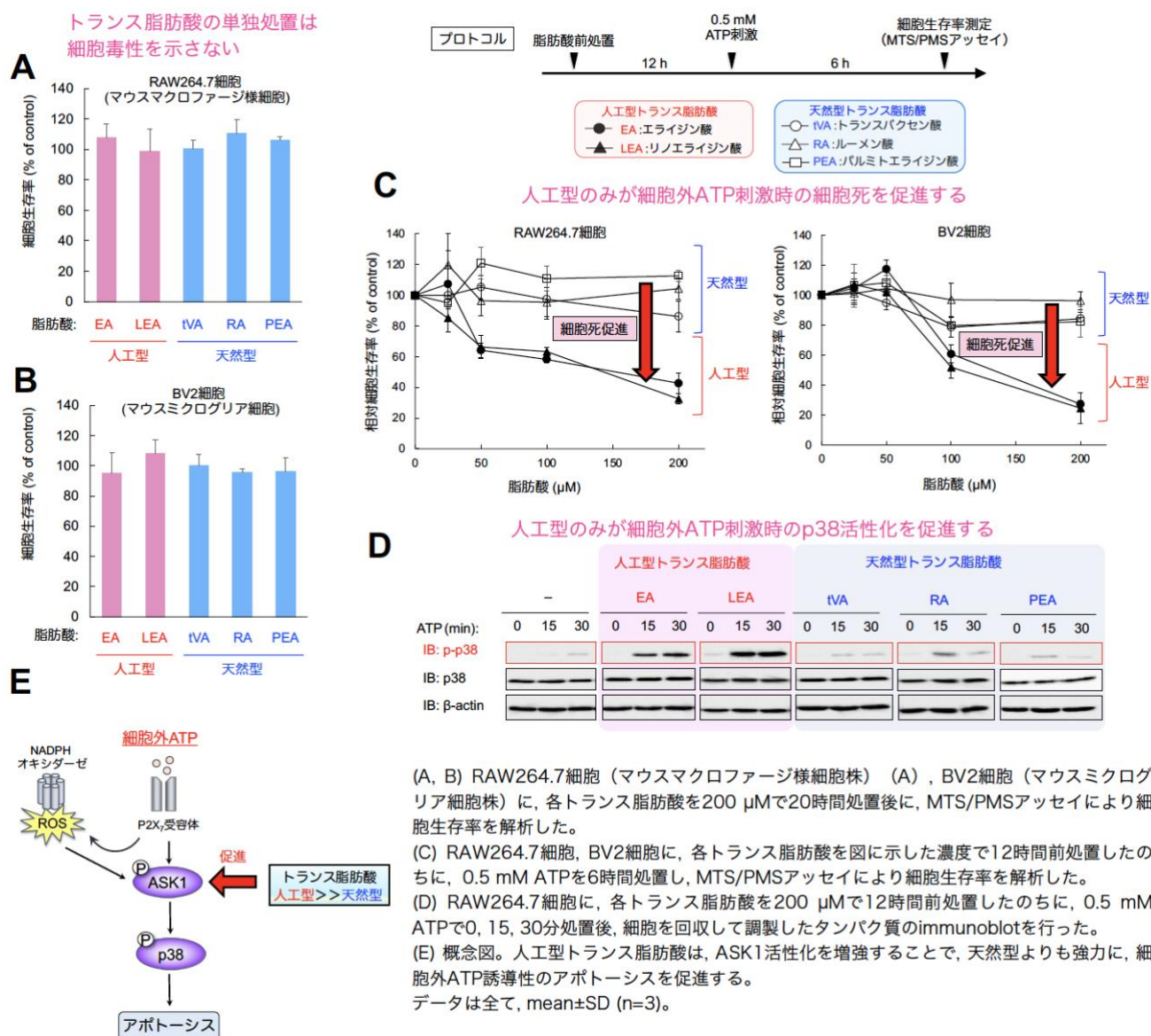
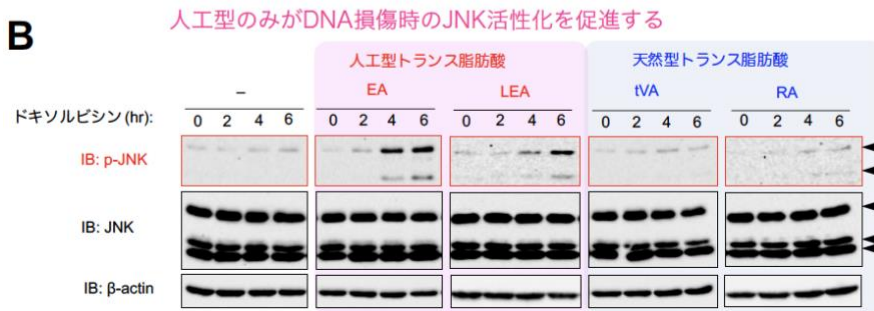
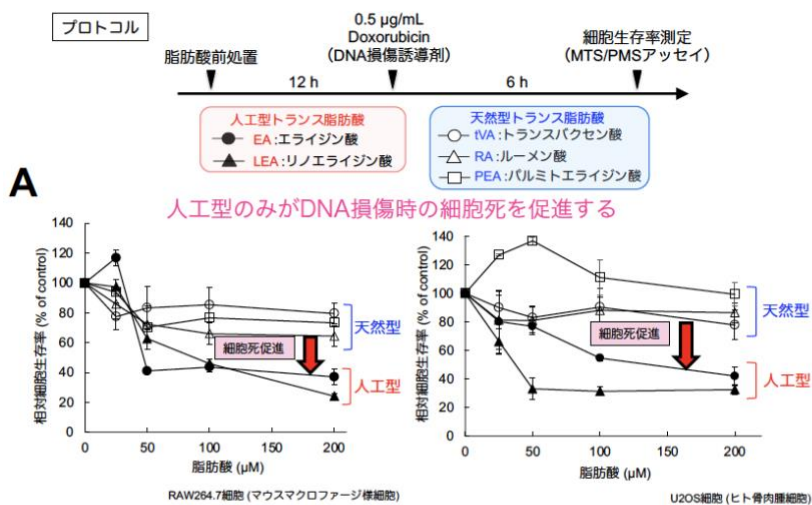
Fig. 1 人工型トランス脂肪酸は細胞外ATP誘導性のアポトーシスを促進する

Fig. 2 人工型トランス脂肪酸はDNA損傷誘導性のアポトーシスを促進する

(A) RAW264.7細胞, U2OS細胞 (ヒト骨肉腫細胞株) に, 各トランス脂肪酸を図に示した濃度で12時間前処置したのちに, 0.5 µg/ml ドキシソルピシン (DNA 2本鎖切断誘導剤) を24時間処置し, MTS/PMSアッセイにより細胞生存率を解析した。

(B) RAW264.7細胞に, 各トランス脂肪酸を200 µMで12時間前処置したのちに, 0.5 µg/ml ドキシソルピシンで0, 2, 4, 6時間処置後, 細胞を回収して調製したタンパク質のimmunoblotを行った。

(C) 概念図。人工型トランス脂肪酸は, ミトコンドリアROS産生, ストレス応答キナーゼJNKの活性化を増強することで, 天然型よりも強力に, DNA損傷誘導性のアポトーシスを促進する。データは全て, mean±SD (n=3)。

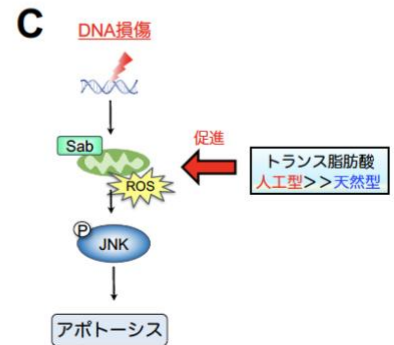


Fig. 3 PUFAはエライジン酸によるATP誘導性細胞死の アポトーシス促進作用を抑制する

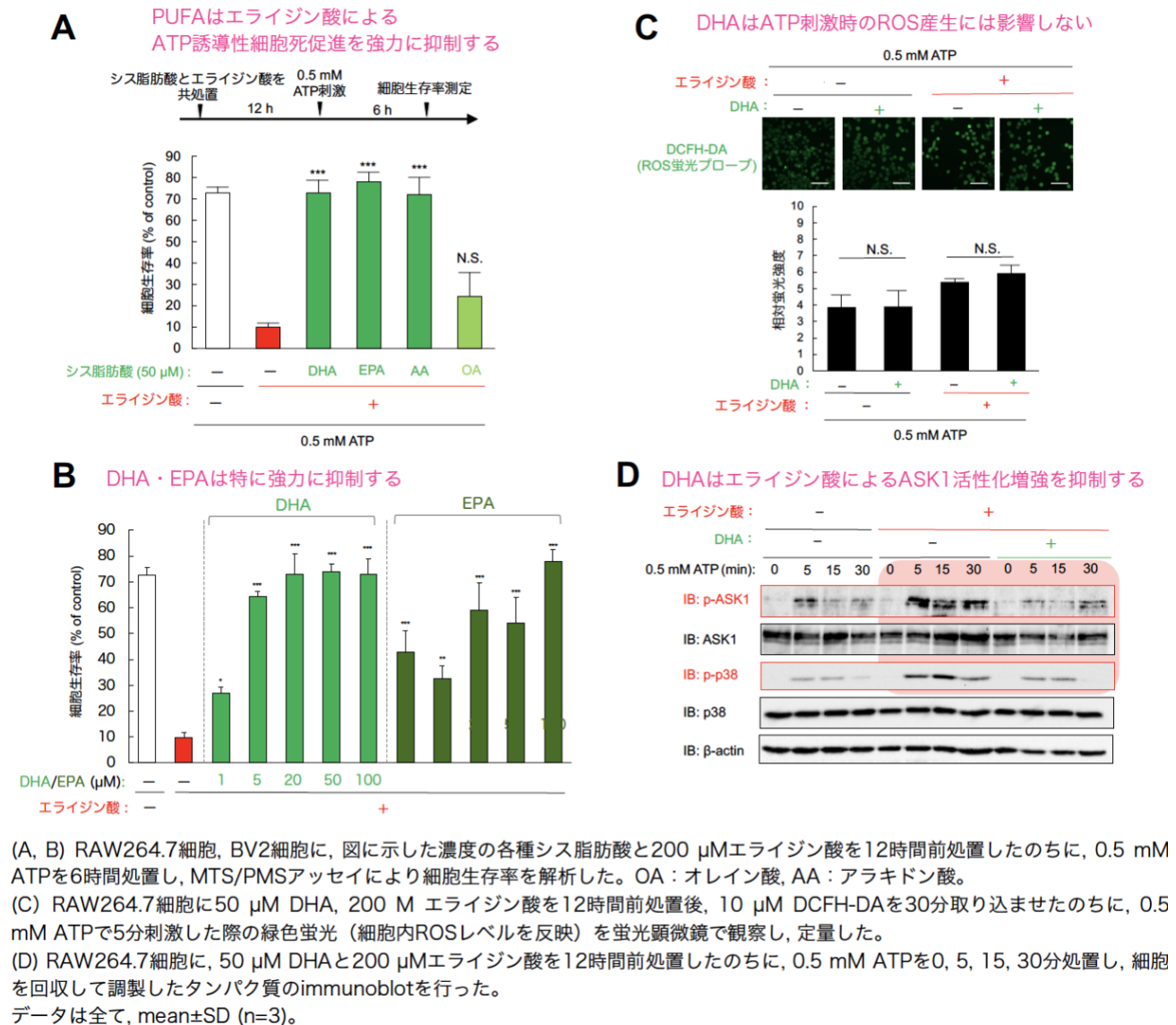
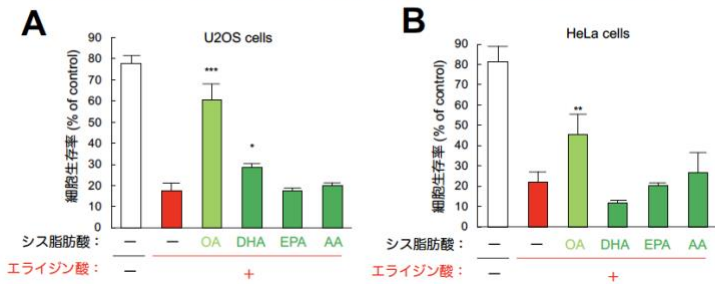


Fig. 4 **オレイン酸はエライジン酸によるDNA損傷誘導性細胞死のアポトーシス促進作用を抑制する**

オレイン酸はエライジン酸によるDNA損傷誘導性細胞死促進を抑制する



(A, B) U2OS細胞 (A) , HeLa細胞 (B) に, 200 μ Mの各種シス脂肪酸と200 μ Mエライジン酸を12時間前処置したのちに, 0.5 μ g/ml ドキソルビシンを24時間処置し, MTS/PMSアッセイにより細胞生存率を解析した。
(C, D) U2OS細胞に100 μ M オレイン酸 (C) またはDHA (D) を12時間前処置したのちに, 0.5 μ g/ml ドキソルビシンを0, 6, 8時間処置し, 細胞を回収して調製したタンパク質のimmunoblotを行った。
データは全て, mean $\pm$ SD (n=3)。

オレイン酸はエライジン酸によるJNK活性化増強を抑制する



Fig. 5 まとめの図

