

## エイコサペンタエン酸の抗脂肪形成作用に関する機序検討：PPARs および cAMP シグナル伝達経路に着目して

河本苺夏<sup>1,2</sup>, 比嘉真美<sup>3</sup>, 内藤一真<sup>3</sup>, 西村浩二<sup>2,3,4</sup>, 地阪光生<sup>2,3,4</sup>, 清水英寿<sup>2,3,4\*</sup>

### Mechanistic Insights into the Anti-Adipogenic Effects of Eicosapentaenoic Acid: Focus on PPARs and the cAMP Signaling Pathway

Moka Kawamoto<sup>1,2</sup>, Manami Higa<sup>3</sup>, Kazuma Naito<sup>3</sup>, Kohji Nishimura<sup>2,3,4</sup>, Mitsuo Jisaka<sup>2,3,4</sup>, Hidehisa Shimizu<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> 鳥取県立鳥取西高等学校

<sup>2</sup> 島根大学生物資源科学部生命科学科

<sup>3</sup> 島根大学大学院自然科学研究科農生命科学専攻

<sup>4</sup> 島根大学学術研究院農生命科学系

\*Corresponding author: hideshowmz@life.shimane-u.ac.jp

**Abstract** The prevalence of obesity and type 2 diabetes in Japan is rising, largely due to the westernization of dietary habits. Controlling adipogenesis is a key strategy for prevention. Eicosapentaenoic acid (EPA), an n-3 polyunsaturated fatty acid, is known to exert anti-adipogenic effects; however, its detailed molecular mechanism during the critical “differentiation induction phase” remains unclear. This study aimed to elucidate how EPA suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells, with a focus on the cAMP signaling pathway. Cells were treated with EPA (50  $\mu$ M) exclusively during the 48-hour differentiation induction phase. Lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining, and signaling pathways were analyzed using specific antagonists and Western blotting. EPA treatment markedly reduced lipid accumulation. Since antagonists of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  also inhibited adipogenesis, EPA is unlikely to exert its effects through activation of these receptors. Mechanistically, EPA decreased PKA phosphorylation, suggesting reduced intracellular cAMP levels. This key finding of cAMP depletion implies a concurrent shutdown of cAMP-dependent pathways, including Epac, which is essential for differentiation. We propose that EPA exerts its anti-adipogenic effect primarily by suppressing cAMP production via a G $\alpha$ i-protein-coupled receptor mechanism, thereby inhibiting the initiation of adipogenesis.

**Keywords:** Adipogenesis, cAMP, Eicosapentaenoic acid, G $\alpha$ i-coupled receptor, Signal transduction

### はじめに

近年、肥満は世界規模での公衆衛生上の深刻な脅威となっている。Seidell and Halberstadt (2015) の報告によれば、肥満は2型糖尿病、心血管疾患、および特定のがんの発症リスクを上昇させ、その疾病負荷は増大の一途をたどっている。日本国内においても、2型糖尿病患者数は増加傾向

にあり、その背景には生活習慣の変化が深く関与しているとされている (Araki et al. 2020)。

2型糖尿病の発症には、遺伝的素因によるインスリン分泌能の低下に加え、環境的要因である生活習慣の悪化が重なることでインスリン抵抗性が惹起される (Kahn et al. 2006)。環境的要因の中でも、食生活の欧米化（動物性脂肪の過剰摂取と魚介類摂取の減少）に伴う肥満は、脂肪組

織からの炎症性サイトカインの分泌異常を引き起こし、全身の代謝恒常性を破綻させる主因となる。Tsugane (2021)によれば、日本人の食生活において肉類の摂取量が魚介類の摂取量を上回る「食事の欧米化」が進行しており、これがn-3系多価不飽和脂肪酸の摂取不足と肥満のリスク増大を招いていると指摘されている。

肥満の組織学的実体は、白色脂肪組織の過剰な蓄積である。これは、既存の脂肪細胞が肥大化する「Hypertrophy」と、前駆脂肪細胞が新たに分化・増殖する「Hyperplasia」の二つのプロセスからなる。特に、過栄養状態においては前駆脂肪細胞の動員と分化が亢進するため、この分化プロセス (Adipogenesis) を分子レベルで制御することは、肥満の予防において極めて重要である。

脂肪細胞分化の研究モデルとしては、Green and Kehinde (1975) によって樹立されたマウス由来3T3-L1細胞が最も広く用いられている。3T3-L1細胞は、適切なホルモン刺激 (分化誘導剤) を受けることで、線維芽細胞様の形態から脂肪滴を蓄積した球形の成熟脂肪細胞へと劇的に変化する。この過程は、(1) 増殖期、(2) 分化誘導期、(3) 成熟期の3段階に厳密に区分され、特に分化誘導剤 (MDIカクテル: 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX], デキサメタゾン, インスリン) 刺激直後の48時間である「分化誘導期」は、細胞運命が決定される不可逆的なフェーズとして知られる。

分化誘導期における分子イベントの中で、最も重要なトリガーの1つがcAMP (環状AMP) シグナルである。MDIカクテルに含まれるIBMXは、ホスホジエステラーゼを阻害して細胞内cAMP濃度を一過性に上昇させる。従来、cAMPの作用は主にcAMP依存性プロテインキナーゼ (Protein Kinase A : PKA) を介して行われると考えられてきた。しかし、PKAが脂肪前駆細胞の分化を抑制するという報告もあり (Li et al. 2008), その詳細な役割については議論が存在する。加えて、近年の研究により、cAMPの標的分子はPKAだけではないことが明らかになっている。特に注目されているのが、cAMPにより直接活性化されるグアニンヌクレオチド交換因子 (Exchange protein directly activated by cAMP : Epac) である。Ji et al. (2010) の研究によれば、3T3-L1細胞の分化において、PKAの触媒活性自体は必ずしも必須ではなく、Epacの活性化こそがCCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ やPeroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) $\gamma$ の誘導に不可欠であるとされている。また、Petersen et al. (2008) も、cAMPによる分化誘導

にはEpac経路とPKA経路の相乗的な作用が必要であることを報告している。

エイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) は、青魚に多く含まれるn-3系多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用やインスリン感受性改善作用を有することが報告されている (Oh et al. 2010; Lorente-Cebrián et al. 2012)。我々の研究グループのNartey et al. (2023) は、3T3-L1細胞においてEPAが抗脂肪形成効果を示すことを報告したが、その詳細な分子メカニズム、特に分化決定段階におけるシグナル伝達への影響については未解明な点が残されていた。そこで本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の成熟抑制に効果を発揮するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

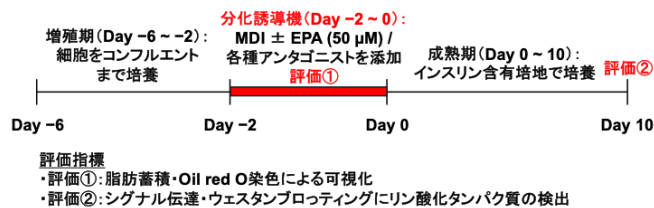
## 材料と方法

### 材料

本研究で使用した各種試薬および抗体は、以下の供給元から入手した。抗 $\beta$ -アクチン抗体 (C4) はSanta Cruz Biotechnology社 (米国・テキサス州ダラス) から供給された。抗PKAリン酸化抗体はCell Signaling Technology社 (米国・マサチューセッツ州ダンバース) から供給された。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) および抗マウスIgG (H+L) 抗体はJackson ImmunoResearch Laboratories社 (米国・ペンシルベニア州ウェストグローブ) から入手した。プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTAフリー) (100 $\times$ ) およびホスファターゼ阻害剤カクテルはナカライテスク株式会社 (日本・京都) から供給された。ペニシリンーストレプトマイシン溶液 ( $\times 100$ ), ジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide : DMSO), デキサメタゾン (Dexamethasone), IBMX, 組換えヒトインスリン (Insulin), 低グルコースおよび高グルコースのDulbecco's改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM) 共に、和光純薬工業株式会社 (日本・大阪) から購入した。EPAはCayman Chemical社 (米国・ミシガン州アナーバー) から供給された。GW6471 (PPAR $\alpha$ アンタゴニスト) とGW9662 (PPAR $\gamma$ アンタゴニスト) はSelleck Chemicals社 (米国・テキサス州ヒューストン) から入手した。Oil Red OはSigma-Aldrich社 (米国・ミズーリ州セントルイス) から購入した。胎児ウシ血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) はMP Biomedicals社 (米国・オハイオ州ソロン) から供給された。

### 3T3-L1細胞の維持および脂肪形成の誘発

脂肪前駆細胞である3T3-L1細胞の維持は、10%FBSとペニシリン・ストレプトマイシン溶液含有の DMEM-低グルコース培地で行った。また、3T3-L1細胞の脂肪形成誘発および解析は次の手順で行った (図1)。3T3-L1細胞を3.5 cm dishに、細胞数が $2 \times 10^5$ となるよう播種した。増殖期では、10% FBSとペニシリン・ストレプトマイシン溶液含有の DMEM-高グルコース培地を用いて合計4日間培養を行った (2日に1度培地交換)。分化期 (Day -2~0) では、10% FBS含有DMEM-高グルコース培地に、分化誘導剤 (0.5 mM IBMX, 1  $\mu$ M デキサメタゾン, 10  $\mu$ g/mL インスリン) を添加した分化誘導培地を用いた。この際、実験群に応じて溶媒 (エタノールおよびDMSO), EPA (50  $\mu$ M), GW6471 (10  $\mu$ M), またはGW9662 (20  $\mu$ M) をそれぞれ添加し、48時間培養した。成熟期 (Day 0~10) では、10%FBSとペニシリン・ストレプトマイシンに加え、インスリンを DMEM-高グルコース培地に添加し、10日間培養を行った (2日に1度培地交換)。



**図1. 3T3-L1細胞の分化誘導および実験プロトコルの概略**  
 図. 3T3-L1前駆脂肪細胞をコンフルエントになるまで培養した (増殖期: Day -6~-2)。分化誘導は、MDIカクテル (0.5 mM IBMX, 1  $\mu$ M デキサメタゾン, 10  $\mu$ g/mL インスリン) を用いてDay -2からDay 0まで行った (分化誘導期)。EPA (50  $\mu$ M) および各アンタゴニスト (GW6471またはGW9662) は、この分化誘導期にのみ処置した。Day 0以降は、インスリンのみを含む成熟培地にて培養した (成熟期)。脂肪蓄積はDay 10にOil Red O染色により評価し、シグナル伝達解析は分化誘導期に実施した。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin。

### Oil Red O染色による細胞内脂質の可視化

10日間培養を行った成熟細胞に分化した3T3-L1細胞を10%ホルマリンで固定し、その後PBS (-) で2回洗浄した。次に、固定したMDIカクテル誘導分化細胞を60%イソプロパノールで処理した後、60%イソプロパノールに溶解したOil Red Oで染色した。Oil Red Oで処理した細胞は60%イソプロパノールで洗浄し、さらにPBS (-) で2回洗浄した。最後に、Oil Red Oで染色された細胞内脂質を可視化した。

なお、染色の手順はRamírez-Zacarias et al. (1992) の方法に準じて行った。また、本実験は独立して3回実施し、再現性を確認した。図中に示した画像データは、得られた結果の中から代表的なものを提示した。

### ウェスタンブロッティング

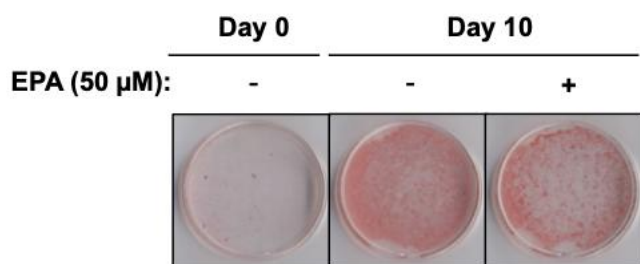
10%FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン, 分化誘導剤 (IBMX・デキサメタゾン・インスリン) をDMEM-高グルコース培地に添加したコントロール溶液, コントロール溶液にEPAを加えたEPA溶液, それぞれを各時間, 増殖期が終了した3T3-L1細胞に処理し, その後に細胞を回収した。回収した細胞は氷上で, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10%グリセロール, プロテアーゼ阻害剤カクテル, ホスファターゼ阻害剤カクテルを含む1% NP-40バッファーで溶解した。調製したタンパク質抽出液はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し, Immobilon-Pポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore Inc., 米国・マサチューセッツ州ベッドフォード) に転写した。膜は次の特異的抗体でインキュベートした: 抗phospho-PKA (PKAリン酸化) 抗体 (1:1000) および抗 $\beta$ -actin抗体 (C4) (1:5000)。その後, 次の二次抗体を用いてインキュベートした: ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) (1:5000) および抗マウスIgG (H+L) 抗体 (1:5000)。標的タンパク質の検出は, Chemi-Lumi One L (ナカライテスク株式会社, 日本・京都) を用いて行い, その後ImageQuant LAS 4010デンストメーター (GE Healthcare Life Sciences, スウェーデン・ウプサラ) で解析した。タンパク質レベルは $\beta$ -actinを内部標準とした。

### 結 果

#### 分化誘導期におけるEPA処理は成熟脂肪細胞への分化を強力に抑制する

詳細な機序検討に先立ち, まず我々の先行研究 (Nartey et al. 2023) で示されたEPAの抗脂肪形成作用が, 本実験系においても再現されるか検証した。分化のスイッチが入る「分化誘導期」の48時間のみEPA (50  $\mu$ M) を添加し, その後は通常の成熟培地で培養した。Oil Red O染色の結果, 対照群 (Vehicle) では細胞全体に高い染色レベルが認められ, 赤色に染色された多数の脂肪滴の蓄積が確認された。一方, 分化誘導期にEPAを処理した群では, 先行研究と同様, 対照群と比較して染色レベルが明瞭に低下しており, 成熟期終了時点においても脂肪滴の形成が抑制されてい

る様子が観察された (図2). 本実験は独立して3回実施し、いずれの場合も同様の結果が得られることを確認した。なお、本実験で用いた50  $\mu$ MのEPA濃度は、先行研究において3T3-L1細胞に対し有意な細胞毒性を示さないことが既に報告されている。以上の結果は、EPAが成熟期の脂肪合成酵素を直接阻害したのではなく、分化誘導期における「脂肪細胞への分化決定 (コミットメント)」プロセスそのものを不可逆的に阻害していることを、改めて強く支持するものである。

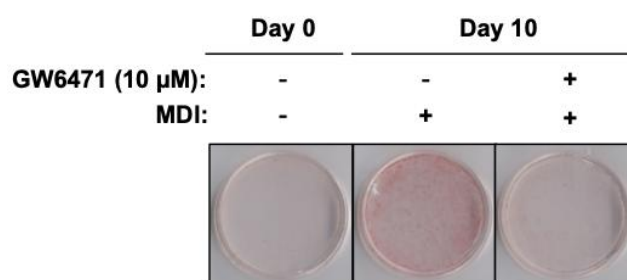


**図2. 分化誘導期における脂質蓄積に対するEPAの影響.** 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。EPA (50  $\mu$ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。EPA処理は、我々の先行研究と同様、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。EPA: Eicosapentaenoic acid; MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin.

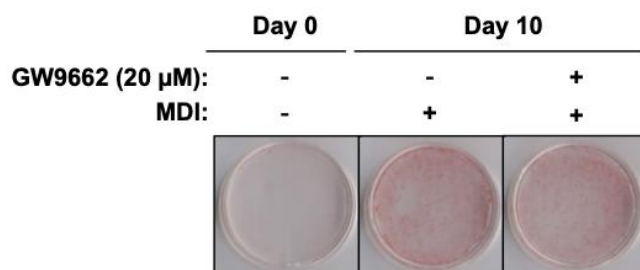
#### EPAの抗脂肪形成作用はPPAR $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ の活性化を介さない

EPAはPPAR $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ のリガンド (アゴニスト) として作用することが広く知られている (Krey et al. 1997). そこで、EPAがこれらの受容体を介して抑制効果を発揮しているのかを検証するため、PPAR $\alpha$ アンタゴニスト (GW6471 10  $\mu$ M) およびPPAR $\gamma$ アンタゴニスト (GW9662 20  $\mu$ M) を用いた阻害実験を行った。結果として、GW6471 およびGW9662を単独で処理した群では、対照群と比較してOil Red Oによる染色レベルが低下していた (図3および図4). 本実験は独立して3回実施し、いずれの場合も同様の結果が得られることを確認した。このことは、「PPAR $\alpha$  およびPPAR $\gamma$ の活性化は、3T3-L1細胞の分化に必須である」という生物学的定説を再確認するものである。ここで重要なのは、EPA処理群もアンタゴニスト処理群と同様に脂

肪形成を抑制したという事実である。もし仮に、EPAがPPAR $\alpha$ やPPAR $\gamma$ を「活性化 (アゴニストとして作用)」することで脂肪蓄積を抑制しているのであれば、アンタゴニストの添加によりその効果は阻害 (キャンセル) されるはずである。しかし実際には、アンタゴニスト単独でも抑制効果を示した。これは、EPAによる抗脂肪形成作用が、PPAR $\alpha$  およびPPAR $\gamma$ の直接的な活性化を介したものではないことを示している。むしろ、EPAの効果は、これらPPARsの活性化に至るより上流のシグナルが遮断された結果、下流プロセスが起動しなかったためである可能性を示唆している。



**図3. 脂質蓄積に対するPPAR $\alpha$ アンタゴニストGW6471の影響.** 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。PPAR $\alpha$ アンタゴニストであるGW6471 (10  $\mu$ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。GW6471処理は、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin; PPAR $\alpha$ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$ .



**図4. 脂質蓄積に対するPPAR $\gamma$ アンタゴニストGW9662の影響.** 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。PPAR $\gamma$ アンタゴニストであるGW9662 (20  $\mu$ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。GW9662処理は、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独



立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin; PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$ .

### EPAは分化誘導期のPKAリン酸化レベルを低下させる

PPAR $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ よりも上流のシグナルとして、分化誘導のトリガーであるcAMPシグナルに着目した。通常、MDIカクテルによる刺激(特にIBMX)は、細胞内cAMP濃度を上昇させ、PKAを活性化(リン酸化)する。図5で示すウェスタンブロットティングの結果のように、対照群ではMDIカクテルによる刺激後にPKA基質のリン酸化レベルの上昇が経時的に抑制されていた。一方、EPAを共添加した群では、このPKAリン酸化レベルの上昇が経時的に抑制されていた。本研究では細胞内cAMP濃度の直接測定は行っていないものの、PKAの活性化(リン酸化)が細胞内cAMP濃度の上昇に依存することは細胞生物学的に広く知られている。したがって、本実験で観察されたPKAリン酸化レベルの低下は、EPA処理によって細胞内のcAMPレベルの上昇が抑制されたことを強く示唆するものである。

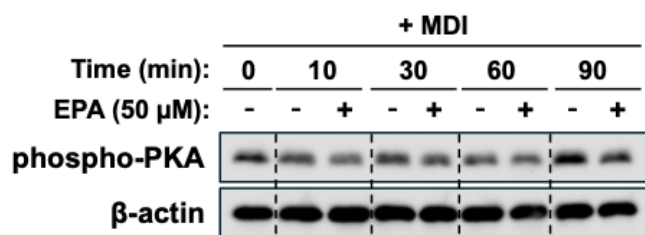


図5. 分化誘導期におけるPKAシグナルに対するEPAの影響。増殖期が終了した3T3-L1細胞に対し、EPA (50 μM)の存在下(+)または非存在下(-)でMDIカクテルによる刺激を行った。指示された時間(0, 10, 30, 60, 90分)で細胞溶解液を回収した。PKAのリン酸化レベルを、抗phospho-PKA (PKAリン酸化)抗体を用いたウェスタンブロットティングにより解析した。β-アクチンはローディングコントロールとして用いた。EPA処理は、MDIカクテルによって誘導されるPKA基質のリン酸化を抑制した。EPA: Eicosapentaenoic acid; MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin.

### 考 察

本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の分化誘導期において細胞内cAMPレベルを低下させることで、抗脂肪形成作用を発揮する可能性が示された。特に本研究の結果から、

EPAの作用はPPAR $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ の直接的な活性化を介したものではないことが示唆された。さらに、我々の先行研究(Nartey et al. 2023)において、PKA阻害剤H89を用いた解析ではEPAによる分化抑制効果が一部解除されるという結果が得られている。本研究で示唆された細胞内cAMP低下という結果と合わせると、そのメカニズムが単なるPKA経路の遮断に留まらず、PKAとは異なるcAMP依存性経路(Epac経路など)の制御を含んでいる可能性が高いと予想される。

### 細胞内cAMP産生レベルの低下によるシグナル抑制の意義

脂肪細胞の分化において、初期(分化誘導期)の細胞内でのcAMP濃度上昇は必須のトリガーである。本研究で示された「EPAによるPKAリン酸化の低下」は、EPAが細胞内cAMPレベルを低下させ、このトリガー機構そのものを不活性化したことを示唆している。先行研究(Ji et al. 2010; Petersen et al. 2008)によれば、分化誘導条件として、cAMPの下流ではPKAだけでなく、Epac経路の活性化が必須であるとされる。したがって、EPAによる細胞内cAMPの産生レベルの低下は、PKAおよびEpacの両経路へのシグナル供給の減弱に繋がり、これが分化抑制の主因であると考えられる。前述の通り、PKA阻害剤H89を用いた実験ではEPAの効果が完全には再現されない(Nartey et al. 2023)。このことは、EPAによる細胞内cAMPの産生低下が、H89では阻害できない経路(すなわちEpac経路)をも遮断していることを示唆している。よって、Epac経路の遮断こそが、EPA特有の強力な分化抑制効果の本質である可能性が高い。

### Gaiタンパク質共役型受容体の関与の可能性

EPAによる細胞内cAMPレベル低下メカニズムについて、受容体の観点から考察する。脂肪細胞における主要なEPA受容体であるGPR120 (FFAR4)は、主にGaqやβ-アレスチン経路を活性化するが、アデニル酸シクラーゼを阻害するGaiタンパク質との共役は一般的ではない(Yamada et al. 2017)。一方、GPR40 (FFAR1)はGaiタンパク質と共役し、cAMP産生を抑制し得ることが報告されている(Hamdouchi et al. 2016)。3T3-L1細胞におけるGPR40の発現レベルについては議論があるものの、本研究で観察された「EPA刺激による即時的なcAMP産生抑制」は、薬理的にGaiタンパク質共役型受容体の活性化を強く示唆する挙動である。本研究では受容体の特定には至っていないが、

GPR40あるいは類似の特性を持つ受容体がEPAに応答し、Gaiタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを阻害したというモデルが、観測されたデータ (cAMP低下) を最も矛盾なく説明できる。

## 研究の限界と今後の展望

本研究は、EPAが脂肪細胞の分化誘導期においてcAMPシグナルを抑制するという新規メカニズムを提唱するものであるが、いくつかの限界が存在し、今後の課題として残されている。第一に、EPAが細胞内cAMPレベルを低下させる詳細な分子機構の特定である。本研究ではGaiタンパク質共役型受容体 (GPR40等) の関与を示唆したが、EPAが細胞膜の流動性を変化させ、アデニル酸シクラーゼ活性に直接影響を与えている可能性や、cAMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化させている可能性も完全には排除できない。今後、GPR40特異的アンタゴニストやsiRNAを用いた機能阻害実験、あるいはPDE阻害剤を用いた解析を行うことで、上流シグナルの全容を解明する必要がある。第二に、Epac経路の関与に関する直接的な証明である。本研究ではPKA阻害剤の結果からEpac経路の重要性を推察したが、Epac特異的活性化剤 (8-pCPT-2'-O-Me-cAMPなど) を用いたレスキュー実験や、Epac遺伝子のノックダウン実験を行うことで、この仮説をより強固なものにする必要がある。第三に、EPAの代謝産物の影響である。EPAは細胞内で代謝され、COX経路等を介して抗炎症性プロスタグランジン (PGE3など) へと変換される。Nartey et al. (2023) も指摘しているように、EPAそのものではなく、これら代謝産物が受容体を介して作用している可能性についても、COX阻害剤等を用いた検討が待たれる。最後に、生体レベルでの検証である。本研究で得られた3T3-L1細胞における知見が、実際の肥満モデル動物やヒト脂肪組織においても同様に機能しているかを検証することは、臨床応用へ向けた重要なステップとなるだろう。

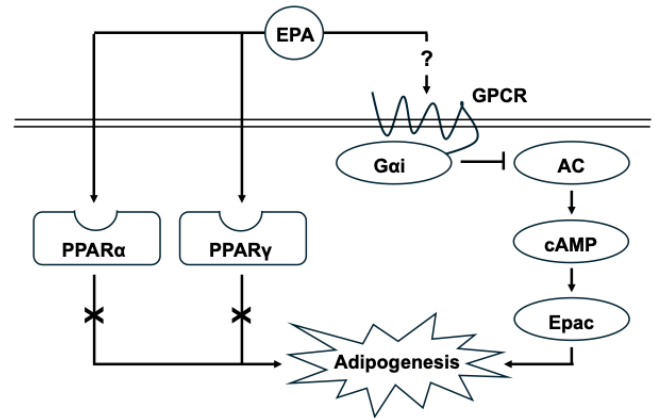


図6. EPAの抗脂肪形成作用に関する想定メカニズムの概略図。EPAは分化誘導期において抗脂肪形成作用を発揮する。本研究の結果から、この作用はPPARαやPPARγの直接的な活性化を介したものではないことが示された。その代わりに、EPAはGaiタンパク質共役型受容体 (GPR40など) を介してアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、細胞内cAMPの産生レベルを低下させる。このcAMPの細胞内での産生低下が、Epac経路などの下流シグナルの不活性化を招き、その結果として脂肪細胞分化の開始が阻害されると考えられる。AC: Adenylate Cyclase; EPA: Eicosapentaenoic acid; Epac: Exchange protein directly activated by cAMP; GPCR: G Protein-coupled Receptor; PPARα: Peroxisome Proliferator-activated Receptor α; PPARγ: Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ。

## まとめ

本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の分化誘導期において、PPARαおよびPPARγの直接的な活性化を介さずに、抗脂肪形成作用を発揮する可能性を明らかにした。その詳細なメカニズムとして、EPAが受容体 (Gai共役型受容体) を介して細胞内cAMP産生を抑制し、これにより分化に必須なシグナル伝達系 (PKAおよびEpac経路) を遮断するという「EPA-cAMP-Epac軸」の存在が強く示唆された。これらの知見は、EPAが単なる栄養素としてだけでなく、細胞内シグナル伝達のモジュレーターとして機能することを示しており、将来的な肥満予防・治療戦略における新たな分子的基盤を提供するものである。

## 謝 辞

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) の次世代人材育成事業「グローバルサイエンスキャンパス (GSC)」の支援を受けて実施された。ここに記して謝意

を表する.

## 引用文献

- Araki, E., Goto, A., Kondo, T., Noda, M., Noto, H., Origasa, H., Osawa, H., Taguchi, A., Tanizawa, Y., Tobe, K. and Yoshioka, N. (2020) Japanese Clinical Practice Guideline for Diabetes 2019. *Journal of Diabetes Investigation*, 11(4): 1020–1076.
- Green, H. and Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1): 19–27.
- Hamdouchi, C., Kahl, S. D., Patel Lewis, A., Cardona, G. R., Zink, R. W., Chen, K., Eessalu, T. E., Ficorilli, J. V., Marcelo, M. C., Otto, K. A., Wilbur, K. L., Lineswala, J. P., Piper, J. L., Coffey, D. S., Sweetana, S. A., Haas, J. V., Brooks, D. A., Pratt, E. J., Belin, R. M., Deeg, M. A., Ma, X., Cannady, E. A., Johnson, J. T., Yumibe, N. P., Chen, Q., Maiti, P., Montrose-Rafizadeh, C. and Chen, Y. (2016) The Discovery, Preclinical, and Early Clinical Development of Potent and Selective GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus (LY2881835, LY2922083, and LY2922470). *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(24): 10891–10916.
- Ji, Z., Mei, F. C. and Cheng, X. (2010) Epac, not PKA catalytic subunit, is required for 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, 2(2): 392–398.
- Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121): 840–846.
- Krey, G., Braissant, O., L'horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*, 11(6): 779–791.
- Li, F., Wang, D., Zhou, Y., Zhou, B., Yang, Y., Chen, H. and Song, J. (2008) Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Research*, 18(2): 311–323.
- Lorente-Cebrián, S., Bustos, M., Martí, A., Fernández-Galilea, M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. (2012) Eicosapentaenoic acid inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced lipolysis in murine cultured adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(3): 218–227.
- Nartey, M. N. N., Shimizu, H., Sugiyama, H., Higa, M., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M. and Yokota, K. (2023) Eicosapentaenoic Acid Induces the Inhibition of Adipogenesis by Reducing the Effect of PPARgamma Activator and Mediating PKA Activation and Increased COX-2 Expression in 3T3-L1 Cells at the Differentiation Stage. *Life (Basel)*, 13(8): 1704.
- Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M. and Olefsky, J. M. (2010) GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 142(5): 687–698.
- Petersen, R. K., Madsen, L., Pedersen, L. M., Hallenborg, P., Hagland, H., Viste, K., Døskeland, S. O. and Kristiansen, K. (2008) Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(11): 3804–3816.
- Ramírez-Zacarias, J. L., Castro-Muñozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*, 97(6): 493–497.
- Seidell, J. C. and Halberstadt, J. (2015) The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66 Suppl 2: 7–12.
- Tsugane, S. (2021) Why has Japan become the world's most long-lived country: insights from a food and nutrition perspective. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(6): 921–928.
- Yamada, H., Umemoto, T., Kakei, M., Momomura, S. I., Kawakami, M., Ishikawa, S. E. and Hara, K. (2017) Eicosapentaenoic acid shows anti-inflammatory effect via GPR120 in 3T3-L1 adipocytes and attenuates adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Nutrition & Metabolism (Lond)*, 14: 33.