

# 健康増進に資する乳酸菌生成物の細胞老化抑制効果の検証

信州大学 農学部  
三谷 壘一

## 1. 研究の目的と背景

近年, 2型糖尿病をはじめとした肥満関連疾患の発症は, 過度な脂質蓄積によって生体内の必須成分であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>) が減少する脂肪細胞の老化 (細胞老化) が原因であると考えられている<sup>1)</sup>. 脂肪細胞の細胞老化は, 細胞外への炎症性物質の分泌を促し, 糖・脂質代謝改善ホルモンであるアディポネクチンの分泌量を減少することでインスリン抵抗性を引き起こす<sup>2)</sup>. 従って, 細胞内 NAD<sup>+</sup> 量の維持は, 細胞老化を抑制し肥満関連疾患の予防に繋がると考えられる. 細胞内 NAD<sup>+</sup> の合成量は Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) と呼ばれる酵素で制御されている. これまでに私達は, 脂肪細胞への分化能を有する 3T3-L1 細胞において, NAMPT の酵素活性を阻害すると NAD<sup>+</sup> 合成量の低下だけでなく, 脂肪細胞への分化の抑制そしてアディポネクチンの分泌量が低下することを見出している<sup>3)</sup>. NAMPT の発現量は加齢によって減少するだけでなく, 慢性的な高脂肪食摂取などの外部環境因子によって低下することが既に報告されている<sup>4)</sup>. それ故に食習慣の改善によっても NAMPT の発現量を増加もしくは維持することが可能と考えられる.

乳酸は, 細胞内でグルコースを基質としてピルビン酸を経て生成される. また, ラクトバシラス属を代表とした乳酸菌による乳糖を基質として酸素非存在下での発酵による生成物でもある. 乳酸は, キラル中心を持つため鏡像異性体が存在し, 筋肉での解糖や多くの乳酸菌 (ラクチス菌やクレモリス菌など) による乳酸発酵では L-乳酸が生成される. 一方, ヨーグルを発酵するブルガリア菌は, L-乳酸と D-乳酸をおよそ 1:1 で生成する<sup>5)</sup>. 乳酸は, エネルギー源として再利用される他, 近年, 脂肪細胞への分化の促進<sup>6)</sup> や褐色脂肪細胞の誘導<sup>7)</sup> といった効果が見出されている. しかし, 乳酸と細胞老化についての関係性は未だ不明である本研究では, 乳酸飲料などによって摂取可能な乳酸が細胞老化を抑制するのかについて NAMPT の発現制御に着目し解析することとした.

## 2. 研究の方法

### 1. 細胞培養

雄性 ICR マウスの脂肪組織を単離し, Collagenase

type II を含む buffer で脂肪前駆細胞を単離した. 単離した初代脂肪前駆細胞 (adipose-stromal cells, 以下 ASCs と略す) を 10% ウシ胎児血清 (FBS), 4.5 g/mL グルコース, 100 units/mL ペニシリン G, 100 µg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含む DMEM 培地 (DMEM-HG 培地) で培養した. 培養条件は 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C のインキュベーター内で行った. 飽和状態になった ASCs を新しい DMEM-HG 培地に交換し, 培地の交換と同時に 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX), 10 µg/mL インスリン, 1 µM デキサメタゾン, 10 µM ロシグリタゾン, 8 µg/mL ビオチンを添加した. これを分化 0 日とする. 分化開始 2 日, 4 日, 6 日後に培地を新鮮な分化培地に交換し, 10 µg/mL インスリンと 8 µg/mL ビオチンを添加して培養する. 分化 7 日目に細胞を回収して解析に用いた. L-乳酸ナトリウムと D-乳酸ナトリウムは分化 2 日, 4 日, 6 日のタイミングで添加した. 培地中のナトリウム濃度を合わせるためにコントロール群には同濃度の NaCl を添加した.

### 2. ウェスタンブロット法

回収した ASC を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA) に溶解し, タンパク質量後の試料を電気泳動用試料とした. 電気泳動用試料を用いて Laemmli の方法に従い SDS-PAGE を行った後に, ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した. スキムミルクを用いて PVDF 膜表面をブロッキングした後に一次抗体 {rabbit anti-adiponectin 抗体 (Bioss), rabbit anti-NAMPT 抗体 (GeneTex), mouse anti-β-actin 抗体 (Santa Cruz biotechnology)} を用いて抗原抗体反応を 2 時間行った. 続いて HRP が標識された二次抗体 (anti-rabbit もしくは anti-mouse; BioRad) で 1 時間反応させた. その後, HRP の基質である ImmunostarLD (富士フイルム) を 2 分間 PVDF 膜に浸し, 化学発光をルミノイメーリアライザー (ImageQuant LAS500; GE healthcare) を用いて検出した.

### 3. 定量 PCR

ASC から Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque) を用いて RNA を抽出し, ReverTra Ace qPCR RT Master

Mix (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として定量 PCR を行った。PCR 条件は KAPA SYBR Green Master Mix (日本ジェネティクス) を用いた 2 ステップ反応系で以下のプライマーを用いた。18S rRNA (Fw; 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3', Rev; 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'), Nampt (Fw; 5'-CGGTTCTGGTGGCGCTTTGCT-5', Rev; 5'-AAGTTCCCGCTGGTGCCTA-3')。

#### 4. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Nampt 遺伝子の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した。ASC ではプラスミドの導入は困難だったので、同じく脂肪細胞へと分化する 3T3-L1 細胞を用いた。3T3-L1 細胞を 48-well plate で培養し、70-80% コンフルエントになった際に下記の手法で遺伝子導入を行った。1 well 当たり以下のプラスミド混合液を調製した。pGL4.14-Nampt promoter-Luc (0.1 µg/well) pRL-SV40 (0.001 µg/well), Lipofectamine<sup>®</sup>3000 (0.2 µL/well)。調製したプラスミド混合液を室温で 10 分間静置し、その後 3T3-L1 細胞に添加して 37 °C で培養を続けた。24 時間後に培地に IBMX (0.5 mM) と D-乳酸を添加した新鮮な DMEM-HG 培地に交換し、さらに 24 時間培養した。培養後、培地を取り除き、細胞を Passive lysis buffer (Promega) で溶解した。細胞溶解液をサンプルとして Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) で Nampt 遺伝子のプロモーター活性を測定した。

#### 5. 細胞内 NAD<sup>+</sup> 量の測定

D-乳酸の存在下で 7 日間培養した ASC を bicarbonate base buffer (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 10, containing 10 mM nicotinamide, 0.05% TritonX-100, and 1% dodecyltrimethylammonium bromide) に溶解した。NAD/NADH-Glo assay キット (Promega) を用いて細胞溶解液中の NAD<sup>+</sup> 量を測定した。測定方法は製品のプロトコルに準じ、乳酸未添加群の値に対する相対値として算出した。

#### 6. 動物実験

7 週齢の雄性 ICR マウスを日本 SLC から購入し、1 週間順化期間を設けた。飼育室の室温は 20 ± 3 °C に、湿度を 40-60% に維持した。飼育室の明暗周期は 12 時間で維持し、明期開始を 8:00、暗期開始を 20:00 に設定した。全ての動物実験は信州大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。8 週齢時にマウスをランダムに 2 群に分け、そこから 1 ヶ月間 D-乳酸を 0.5% 混合した PBS を飲水させた (n=6)。コントロール群 (n=5) には PBS を与えた。コントロール群と D-乳酸投与群で摂餌料と飲水料に顕著な差はなかった。飼育終了後、皮下脂肪として鼠径部周辺

脂肪組織、内臓脂肪として生殖器周辺脂肪組織と後腹膜脂肪組を回収しウエスタンブロット法で NAMPT の発現量を解析した。

#### 7. 統計解析

統計解析は IMP statistical software version 11.2.0 (SAS Institute) を使用した。2 群間の比較は t-検定を用いて有意差を解析した。多群間の比較は 1 元配置分散分析を行い、その後 Tukey の HSD 検定にて有意差を決定した。

### 3. 研究内容

#### 1. 乳酸が脂肪細胞における NAMPT の発現量に及ぼす影響

L-乳酸、D-乳酸が脂肪細胞における NAMPT の発現量に及ぼす影響を比較した。一般的な脂肪細胞の研究は、マウス線維芽細胞由来の 3T3-L1 細胞が広く使用されているが、より生体に近い条件を模倣するためにマウスの脂肪組織から単離した初代脂肪前駆細胞 (ASCs) を用いて解析した。ASCs を 3 mM の乳酸の存在下で脂肪細胞へと分化誘導を行った。その結果、D-乳酸によって、NAMPT のタンパク質発現量が顕著に増加することが示された (図 1A)。また、D-乳酸の濃度を変えて ASC に感作させたところ、1 mM の D-乳酸で NAMPT タンパク質レベルが増加した。一方、10 mM の D-乳酸では NAMPT のタンパク質レベルは減少した (図 1B)。さらに、NAMPT の発現

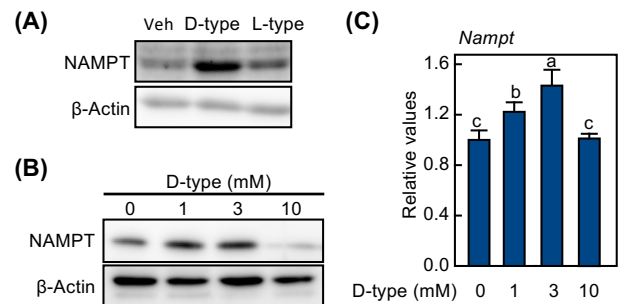


図 1. 乳酸が脂肪細胞の NAMPT の発現量に及ぼす影響

(A) 初代脂肪前駆細胞 (ASC) を D-乳酸と L-乳酸それぞれ 3 mM 存在下で 7 日間かけて脂肪細胞に分化させた場合の NAMPT のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で解析した。内部標準として  $\beta$ -actin を用いた群間でタンパク質量に違いがないことを確認した。(B) D-乳酸を 1 ~ 10 mM で作用させた場合の NAMPT のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で解析した。(C) D-乳酸を 1 ~ 10 mM で作用させた際の NAMPT の遺伝子発現量を定量 PCR で解析した。内部標準として 18S rRNA を用いた。統計解析は Tukey's Kramer の HSD 検定 (n=3) で行った。図中の異なるアルファベット間に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

量に及ぼす D-乳酸の効果は転写レベルでも示されるのかを定量 PCR を用いた解析した。その結果、タンパク質発現量と同様に 1 mM の D-乳酸によって Nampt の発現量が増加し、10 mM では増加効果は示されなかった (図 1C)。以上の結果から、D-乳酸は NAMPT の発現量を転写レベルで増加することが示された。

### 2. D-乳酸が細胞内 NAD<sup>+</sup> 合成量に及ぼす影響

脂肪細胞において D-乳酸が NAMPT のタンパク質発現量を増加したことから、実際に細胞内 NAD<sup>+</sup> 量が増加しているのかを検討した。3 mM の D-乳酸の添加によって脂肪細胞内の NAD<sup>+</sup> 合成量は有意に増加した (図 2)。一方、NAMPT の発現量に影響を及ぼさなかった L-乳酸では細胞内 NAD<sup>+</sup> 量に変化は示されなかった。以上の結果から、D-乳酸は NAMPT の発現量を増加することで細胞内 NAD<sup>+</sup> 量を増加していることが示された。

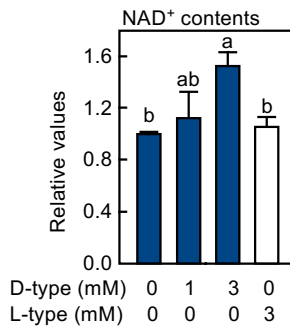


図 2. D-乳酸が細胞内 NAD<sup>+</sup> 合成量に及ぼす影響

初代脂肪前駆細胞 (ASC) を D-乳酸と L-乳酸の存在下で 7 日間かけて脂肪細胞に分化させた場合の細胞内 NAD<sup>+</sup> 量を測定した。統計解析は Tukey's Kramer の HSD 検定 (n=4) で行った。図中の異なるアルファベット間に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

### 3. D-乳酸による Nampt の発現誘導に及ぼす cAMP シグナルの関与

私達の選考研究において、Nampt 遺伝子の発現は細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP のシグナル伝達によって増加することを見出している。そこで、D-乳酸が cAMP によるシグナル伝達の存在下で Nampt 遺伝子の転写を促進しているのかを検討した。Nampt 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを用いて Nampt 遺伝子の転写活性を測定したところ、D-乳酸のみでも Nampt 遺伝子の転写活性は増加した (図 3)。また、細胞内 cAMP 量を増加させる IBMX を同時に添加した結果、3 mM の D-乳酸存在下で相乗的な Nampt 遺伝子の転写活性化が示された。以上の結果から、D-乳酸は cAMP 非存在下でも Nampt 遺伝子の転写を誘導することが示された。

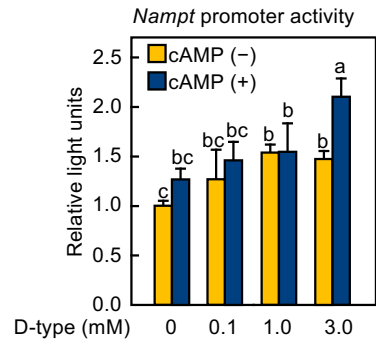


図 3. D-乳酸による Nampt の発現誘導に及ぼす cAMP シグナルの関与

3T3-L1 細胞に Nampt 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだ pGL4.14-Nampt promoter-Luc を導入後、D-乳酸と細胞内 cAMP 量を増加する IBMX を同時添加し 24 時間培養した。その後、細胞溶解液を用いた Nampt 遺伝子の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した。統計解析は Tukey's Kramer の HSD 検定 (n=3) で行った。図中の異なるアルファベット間に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

### 4. 細胞外 NAMPT の分泌に及ぼす D-乳酸の効果

脂肪細胞における NAMPT は細胞内で機能する iNAMPT と細胞から血管へと分泌される eNAMPT に分けられる。eNAMPT は血流を介して脳の視床下部へと到達し、視床下部での NAD<sup>+</sup> 合成量を増加することが報告されている。D-乳酸によって細胞内 NAMPT 量が増加したので、それに伴って培地中に分泌される eNAMPT も増加しているのかを解析した。その結果、D-乳酸によって培地中の eNAMPT も増加し、この効果は L-乳酸では示されなかった (図 4)。培地中の全タンパク質をポンソー (ponceau) 染色で観察したが、群間で大きな差は示されなかった。

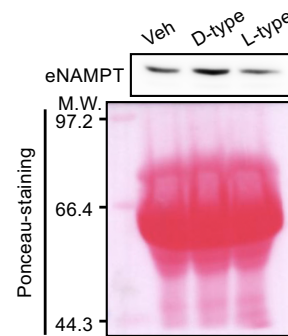


図 4. 細胞外 NAMPT の分泌に及ぼす D-乳酸の効果

初代脂肪前駆細胞 (ASC) を D-乳酸と L-乳酸それぞれ 3 mM 存在下で 7 日間かけて脂肪細胞に分化させた。培養終了後、培地を回収しタンパク質を氷冷アセトンによって沈殿させ、培地中の NAMPT のタンパク質量をウエスタンブロット法で解析した。培地中の全タンパク質を ponceau 染色によって確認し、群間で差がないことを確認した。



## 5. D-乳酸の短期摂取が脂肪組織における NAMPT の発現量に及ぼす影響

培養細胞レベルで D-乳酸が NAMPT の発現を誘導することで細胞内 NAD<sup>+</sup> 合成量を増加することが示された。そこで、個体レベルでも同様の効果が得られるのかをマウスを用いて解析した。pH を中性付近に保つために PBS に終濃度が 0.5% になるように D-乳酸を混合した。D-乳酸を 1 ヶ月間自由飲水させた後に内臓脂肪組織、皮下脂肪組織を回収し、NAMPT のタンパク質発現量を解析した。その結果、D-乳酸の摂取によって内臓脂肪組織である後腹膜脂肪組織と生殖器周辺脂肪組織における NAMPT の発現量が有意に増加した。一方、皮下脂肪組織では D-乳酸摂取による NAMPT の発現量の増加は示されなかった。以上の結果から、D-乳酸は個体レベルにおいても脂肪組織の NAMPT 発現量を増加することが示された。

## 4. 研究から得た結論・考察

本研究課題では、食習慣の改善による NAMPT の発現誘導について乳酸に着目して解析を行った。その結果、D-乳酸によって脂肪細胞での NAMPT の発現誘導と細胞内 NAD<sup>+</sup> 量の増加が示された。また、動物個体レベルにおいても 1 ヶ月という短期間の D-乳酸の摂取でも NAMPT の発現誘導が確認できた。これらの結果は、D-乳酸の摂取が高脂肪食負荷や加齢による NAMPT の発現と NAD<sup>+</sup> 量の低下を改善し、細胞老化を抑制することで肥満関連疾患の予防につながる可能性を示唆している。

運動後の筋肉で生じる乳酸は L 型であり、L-乳酸では NAMPT の発現誘導効果は示されなかった。L-/D-乳酸の効果に区別については未だ未解明な部分が多い。大阪府立大学の原田博士等の研究では、乳酸によって脂肪細胞の分化が促進されるものの、L 体よりも D 体の方で促進効果が強いと述べている<sup>6)</sup>。一方、脂肪組織の性質変化にも乳酸が関与していることも報告されている。今回採取した内臓脂肪組織、皮下脂肪組織は余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵する白色脂肪組織に分類される。白色脂肪組織とは反対に中性脂肪を分解する褐色脂肪組織が存在する。寒冷曝露によって白色脂肪組織は褐色様脂肪組織へと変換されるのだが、その分子メカニズムに寒冷曝露によって筋肉から分泌される L-乳酸が関与するとされる。このように L-/D-体で乳酸の機能が異なることは非常に興味深いことであるが、なぜ異なる作用を発揮するのかといった作用機序は未だ不明である。

## 5. 残された問題、今後の課題

今回の課題では、正常なマウスに対して D-乳酸を摂取させた効果を検証したものであり、今後実際に高脂肪食摂取や高齢マウスに対して D-乳酸の摂取が細胞老化を軽減できるのかを検証する必要がある。

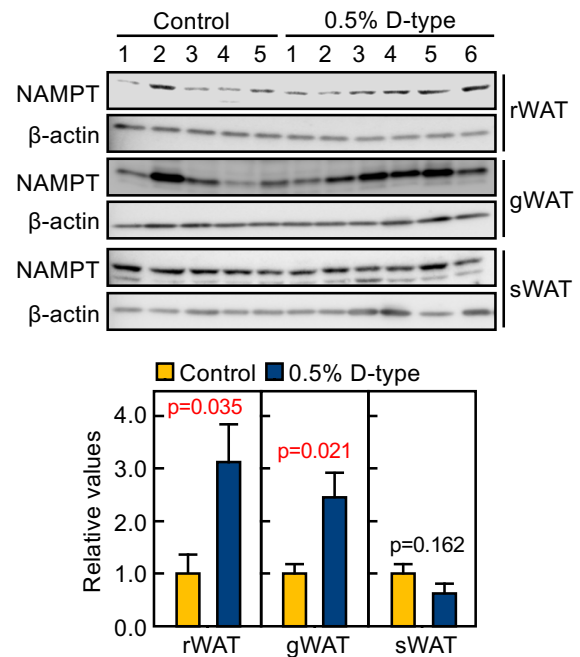


図 5. D-乳酸の短期摂取が脂肪細胞における NAMPT の発現量に及ぼす影響

0.5% D-乳酸を含む PBS を 1 ヶ月飲水させたマウスから内臓脂肪組織として後腹膜脂肪組織 (rWAT)、生殖器周辺脂肪組織 (gWAT) を、皮下脂肪組織として鼠径部周辺脂肪組織 (sWAT) を回収した。コントロール群 (n=5) と 0.5% D-乳酸群 (n=6) の各組織からタンパク質を抽出し NAMPT のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で解析した。上図はウエスタンブロットの結果であり、下図は NAMPT の各バンド強度を  $\beta$ -actin で標準化しグラフ化したものである。統計解析は Tukey's Kramer の HSD 検定で行った。図中の p 値が 0.05 未満である場合に群間に有意差があると言える。

## 引用文献

- 1) Mills *et al.*, *Cell. Metab.*, **24**, 795-806, 2016.
- 2) Gustafson *et al.*, *Nat. Commun.*, **10**, 1-9, 2019.
- 3) Mitani *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **522**, 770-775, 2020.
- 4) Yoshino *et al.*, *Cell. Metab.*, **14**, 528-536, 2011.
- 5) Mjolkcentralen Arla, *J. Dairy Sci.*, **65**, 515-520, 1982.
- 6) Harada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498**, 105-110, 2018.
- 7) Lagarde *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100137, 2020.