

令和元年6月4日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04923

研究課題名(和文) 定性かつ定量的な解析に基づくスフィンゴ脂質の消化管吸収機構と体内動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of absorption and pharmacokinetics of dietary sphingolipids based on qualitative and quantitative analysis

研究代表者

菅原 達也 (Sugawara, Tatsuya)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70378818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質の食品機能性が注目されているが、未だ不明な点も多く残されており、その解明は学術的にも有効活用のためにも重要である。したがって、定性かつ定量的な解析に基づくスフィンゴ脂質の消化管吸収機構と体内動態の解明は不可欠といえる。本研究では、菌体を用いて安定同位体標識スフィンゴ脂質を調製し、経口摂取されたスフィンゴ脂質の消化管吸収における未知の機構を明らかにするとともに、体内動態と代謝的構造変化を詳細に解明しようとした。その結果、一部のグルコシルセラミドやセラミドは、消化を受けず直接吸収され得ることや、体内で再合成されることを確認し、これまで知られていなかった消化管吸収機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの知見として、経口摂取されたスフィンゴ脂質は構成成分に消化を受けてから、吸収されるものとされていた。しかしながら、本研究によって新規の消化管吸収機構が示された。本研究で得られたスフィンゴ脂質の消化管吸収における基礎的な知見は、食品成分の消化管吸収機構の解明につながる学術的価値のあるものといえる。さらに機能性食品成分として、スフィンゴ脂質はすでに利用され始めているが、その作用機構が十分に理解されているとはいえない。本研究の成果は、その解明につながるものであり、産業利用価値を高める上でも重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Although food functionality of sphingolipids has attracted attention, there are still many unclear points which are important for their effective utilization. Therefore, the elucidation of gastrointestinal absorption mechanism and pharmacokinetics of dietary sphingolipid based on qualitative and quantitative analysis is essential. In the aim of this study is to elucidate the mechanisms of the absorption and pharmacokinetics of dietary sphingolipids using stable isotope-labeled sphingolipids prepared from cultured fungi. As the result, it was found that a part of glucosylceramides and ceramides could be directly absorbed without digestion and could be re-synthesized in the body. These results indicated the novel absorption mechanism of sphingolipids.

研究分野：食品機能学

キーワード：セラミド 消化管 スフィンゴ脂質 質量分析 吸収 安定同位体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞膜構成成分の一つであるスフィンゴ脂質は、細胞における分化や増殖、アポトーシスなどのシグナルに対するセカンドメッセンジャーとして、生命現象に深く関わっている。スフィンゴ脂質とは、長鎖アミノアルコールであるスフィンゴイド塩基を分子内に含む脂質の一群である。スフィンゴイド塩基と脂肪酸がアミド結合したものがセラミドとであり、さらに様々な極性基が結合した複合スフィンゴ脂質となる。複合スフィンゴ脂質の代表的なものとして、セラミドにホスホコリンが結合したスフィンゴミエリンや単糖が結合したセレブロシド、シアル酸が結合したガングリオシドなどが挙げられる。一方で、スフィンゴ脂質の構成要素であるスフィンゴイド塩基は、生物種によって異なることが知られている。ほ乳動物では、スフィンゴシン (d18:1^{tt}) が主要であり、その他にスフィンガニン (d18:0) やフィトスフィンゴシン (t18:0) が存在する。植物では、8-スフィンゲニン (d18:1^{8c(t)}) や 4,8-スフィンガジエニン (d18:2^{4t,8c})、4-ヒドロキシ-8-スフィンガジエニン (t18:1) が存在する。また真菌類では、9-メチル-4,8-スフィンガジエニン (d19:2) の存在が報告されている。

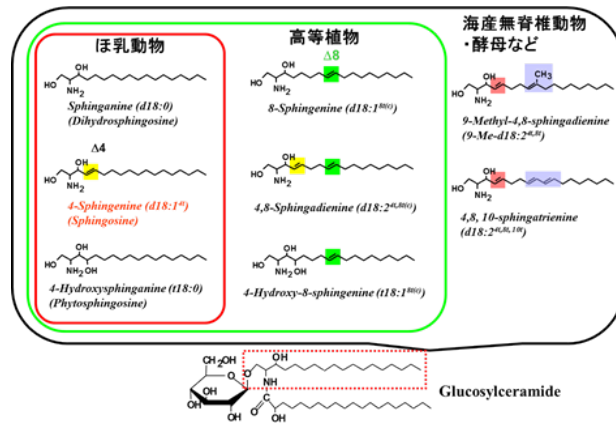


図1 スフィンゴ脂質の化学構造

スフィンゴ脂質は近年、食品機能性成分としても注目されており、大腸がんの発症予防作用やがん細胞に対するアポトーシス誘導作用が示されている。特に、スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚の保湿性向上効果が動物試験や臨床試験で報告されている。スフィンゴ脂質の多様な生物活性について興味深い点は、ほ乳動物由来のものとは化学構造が異なる植物や真菌に特徴的なスフィンゴ脂質であっても動物由来のものとはほぼ同様の作用を示すことである。例えば植物由来のスフィンゴイド塩基と表皮角層中に存在するスフィンゴイド塩基の構造は異なっており、経口摂取された食品由来のスフィンゴ脂質がそのままの形で再利用されているとは考えにくい。実際に、スフィンゴ脂質の摂取による表皮中の角層セラミドの合成の亢進が見出されており、皮膚バリア機能改善効果の機構の一部と考えられている。スフィンゴ脂質の作用機構をより詳細に解明し、さらなる有効活用を図っていくためにはその消化吸收機構や体内動態について詳細な知見を得る必要がある。

経口摂取された複合スフィンゴ脂質は、消化管内でその構成単位であるスフィンゴイド塩基、脂肪酸、極性基へと分解され、その後スフィンゴイド塩基は小腸上皮細胞より取り込まれる。ほ乳動物に主要なスフィンゴイド塩基であるスフィンゴシンと比較すると、植物に主要なスフィンゴイド塩基の吸収率は低いことが示されている。このようなスフィンゴイド塩基の選択的吸収機構には、多剤排出トランスポーターであるP-糖タンパク質の関与が示唆されている。吸収されたスフィンゴシンは、大部分が脂肪酸へと変換される。スフィンゴシンからは偶数鎖の脂肪酸が生じる一方で、フィトスフィンゴシンからは奇数鎖の脂肪酸が生じることが明らかとなってきている。また、吸収されたスフィンゴシンの一部はセラミドや複合スフィンゴ脂質の合成へと再利用されることも知られている。このように、スフィンゴ脂質の消化吸收機構や代謝については精力的に研究が進められているが、スフィンゴ脂質の吸収やスフィンゴ脂質代謝物の体内分布についての知見は未だに十分とはいえない。その一因は、スフィンゴ脂質とその代謝物は内因性のものが存在し、外因性のものと判別することが困難なためである。したがって、スフィンゴ脂質の体内動態をより詳細に解析するためには、内因性と外因性のスフィンゴ脂質とその代謝物を明確に区別する必要がある。

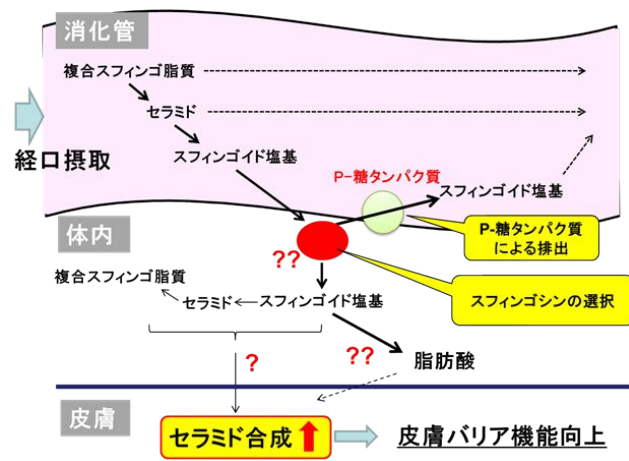


図2 スフィンゴ脂質の消化と吸収

2. 研究の目的

本研究は、安定同位体ラベル化物を用いることで、経口摂取されたスフィンゴ脂質の消化管吸収における未知の機構を明らかにするとともに、体内動態と代謝的構造変化を詳細に解明しようとするものである。

安定同位体トレーサー法は、 ^{13}C や ^2H といった安定同位体で標識した化合物を用いて生体内における吸収と体内分布や、組織や細胞における化合物の代謝経路を追跡する方法である。代謝研究において同位体元素を標識として利用する方法は、動物における化合物の中間代謝物を追跡するために開発された方法であり、安定同位体標識した化合物やその代謝物を質量分析法で分析することで多数の代謝物に関する情報を高い感度で得ることができる。同位体標識化合物を得る方法は化学合成法以外に、微生物を用いて目的の物質を生産し、分離精製する生物学的合成法も知られている。例えば ^{13}C -グルコースを基質として培養した油脂生産性の糸状菌 *Mortierella alpina* より、 ^{13}C で標識されたスフィンゴ脂質の分離精製が可能であることが確認されている。 ^{13}C 標識されたスフィンゴ脂質を用いることによって、実験動物における内因性のスフィンゴ脂質とその代謝物と区別して、経口投与したスフィンゴ脂質の吸収や代謝の追跡が可能となることが期待される。

そこで本研究では、 ^{13}C -グルコースを炭素源として培養した真菌 *M. alpina* より得られた安定同位体標識スフィンゴ脂質を用いて、スフィンゴ脂質の消化管吸収について定性的および定量的な解析を試みた。また、ラットリンパカニューレ法を用いて、P-糖タンパク質の個体レベルでの関与や特殊なスフィンゴイド塩基の吸収についての評価も試みた。

3. 研究の方法

(1) *M. alpina* 由来スフィンゴ脂質の調製と分析

^{13}C -グルコースを炭素源として培養した *M. alpina* から Bligh-Dyer 法を用いて総脂質を抽出し、0.4N KOH で 38 2 時間インキュベートしてグリセロ脂質を加水分解した。この菌体由来アルカリ安定脂質画分に含まれる安定同位体標識スフィンゴ脂質について、質量分析装置を用いて構造解析を行った。

(2) Caco-2 細胞を用いた吸収と代謝変換の評価

3 週間培養して小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞を用いて、(1) で調製したスフィンゴ脂質の取り込みと代謝変換を評価した。菌体由来アルカリ安定脂質画分を培地中でミセル化し、Caco-2 細胞に添加した。経時的に細胞を回収し、脂質を抽出後、質量分析装置を用いて安定同位体標識スフィンゴ脂質の解析を行った。

(3) マウスを用いた吸収と代謝変換の評価

(1) で調製したアルカリ安定脂質をトリオレインに溶解し、ICR マウス (♂、7 週齢) に経口投与した。1 から 6 時間後に、イソフルラン麻酔下で開腹し、下大静脈より血液を採取した。遠心分離により得られた血漿から脂質を抽出し、質量分析装置を用いて、安定同位体標識スフィンゴ脂質の解析を行った。

(4) ラットリンパカニューレ試験を用いた評価

トウモロコシ由来グルコシルセラミドまたは化学合成グルコシルセラミド (グルコシル-N-パルミトイルスフィンゴシン) を乳化した試料を経胃投与し、投与前後のリンパ液を連続的に採取した。得られたリンパ液から総脂質を抽出し、弱アルカリ分解物 (遊離スフィンゴイド塩基画分) および酸加水分解物 (総スフィンゴイド塩基画分) をそれぞれオルトフタルアルデヒドで蛍光誘導体化して HPLC に供し、スフィンゴイド塩基を測定した。同様の手法で、スフィンゴイド塩基の吸収に与える P-糖タンパク質阻害剤 (ペラパミル) の影響を調べた。また、イカ皮から調製したセラミドアミノエチルホスホン酸についても、同様の方法で特殊なスフィンゴイド塩基 (d19:3) の吸収を評価した。

4. 研究成果

(1) *M. alpina* 由来スフィンゴ脂質の調製と分析

総脂質のアルカリ安定画分の含有率は、重量比で約 30.5 % であり、アルカリ安定画分中のグルコシルセラミドとセラミドの含有率は、重量比でそれぞれ約 1.9 % と約 1.6 % であった。試料に含まれる安定同位体標識グルコシルセラミドの分子種は、d18:2 または真菌に特有な 9-メチル型の d19:2 のスフィンゴイド塩基と炭素鎖 13~16 のヒドロキシ脂肪酸を構成要素とするグルコシルセラミドであった。一方、遊離セラミドの大部分は、トリヒドロキシ型の t18:0 を有し、炭素鎖 14~26 のノルマルまたはヒドロキシ脂肪酸を構成要素とする分子種であった。イオン強度から換算された ^{13}C 全置換体の存在比率はどちらも約 60% であった。グルコシルセラミドとセラミドの主要な分子種はそれぞれ d19:2-C14:0h と t18:0-C14:0h であった。

(2) Caco-2 細胞を用いた吸収と代謝変換の評価

^{13}C -t18:0[M+H-2H₂O]⁺ と ^{13}C -d18:1[M+H-H₂O]⁺ (m/z:300.3) のプリカーサーイオンスクリーンを行ったところ、菌体由来の試料に含まれていたセラミドのなかで、t18:0-C14:0 と d18:1-C14:0h 以外の全ての分子種が 24 時間処理後の Caco-2 細胞から検出された。グルコシルセラミドについては、試料に含まれていた t18:0-C14:0h に加えて、試料では確認されなかった t18:0-C16:0h のグルコシルセラミドも検出された。 ^{13}C -d19:2[M+H-H₂O]⁺ (m/z:295.3) のプリカーサーイオンスクリーンの場合には、試料に含まれていたセラミドとグルコシルセラミド

に加えて、試料からは検出されなかった d19:2-C16h のセラミドの存在が確認された。検出された分子種ごとのスペクトル解析から、標識スフィンゴイド塩基と非標識脂肪酸を有するセラミド (t18:0-C16:0, t18:0-C24:0, t18:0-C24:1) が含まれていることを確認した。また、t18:0-C14:0h, t18:0-C16:0h, d19:2-C14:0h のグルコシルセラミドにおいて、標識セラミドと非標識グルコースを有するグルコシルセラミドが確認された。

これらの情報から各分子の MRM 解析を行ったところ、細胞に取り込まれたセラミド分子種として t18:0-C14:0h が主要であり、グルコシルセラミド分子種では d19:2-C14:0h が大部分を占めていることがわかった。添加した試料と 24 時間処理した Caco-2 細胞から検出された安定同位体標識スフィンゴ脂質の分子種組成は、セラミドとグルコシルセラミドともにほぼ類似していたが、細胞からのみ d19:2-C14:0h と d19:2-C16:0h のセラミドが検出され、標識セラミドと非標識グルコースを有するグルコシルセラミド分子 t18:0-C14:0h, t18:0-C16:0h, d19:2-C14:0h, d19:2-C16:0h も確認された。

以上の結果から、グルコシルセラミドとセラミドは直接吸収され得ることが強く示唆された。さらに、吸収されたセラミドは小腸上皮細胞内でグルコシルセラミドに代謝されることや、グルコシルセラミドの一部はセラミドに分解されることも予想された。

(3) マウスを用いた吸収と代謝変換の評価

マウスの血漿から、投与した試料中に含まれる安定同位体標識されているグルコシルセラミドとセラミドが検出された。グルコシルセラミドでは d19:2-C14:0h の血漿濃度が高く、セラミドでは t18:0-C22:0, t18:0-C24:1, t18:0-C24:0 の血漿濃度が高かった。また、Caco-2 細胞の結果と同様に、標識スフィンゴイド塩基と非標識脂肪酸を有するセラミドや標識セラミドと非標識グルコースを有するグルコシルセラミドが MRM 解析でも確認できた。したがって、個体レベルでも培養細胞とほぼ同様に吸収及び代謝を受けるものと考えられた。

(4) ラットリンパカニューレ試験を用いた評価

リンパ液からトウモロコシ由来グルコシルセラミドに主要な 4,8-スフィンガジエニンが検出されたが、その回収率は極めて低く、哺乳動物由来のスフィンゴシンよりも吸収されにくいことがわかった。ベラパミルは 4,8-スフィンガジエニンの吸収を促進したが、スフィンゴシンは影響を受けなかった。したがって、P-糖タンパク質によるスフィンゴイド塩基の選択的吸収が個体レベルでも確認された。一方、CAEP を投与したラットのリンパ液から、CAEP に含まれる特殊なスフィンゴイド塩基 (d19:3) が検出され、d19:3 が個体レベルで吸収されることを初めて見出した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Fujii A, Manabe Y, Aida K, Tsudoku T, Hirata T, Sugawara T. Selective Absorption of Dietary Sphingoid Bases from the Intestine via Efflux by P-Glycoprotein in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2017;63(1):44-50. 査読有
doi: 10.3177/jnsv.63.44.

菅原達也. *Topics in Oleo Science* 食品機能性脂質としてのスフィンゴ脂質の消化と吸収, *オレオサイエンス*, 17(3), 136-139, 2017. 査読無

菅原達也. セラミドと皮膚機能について, *調理食品と技術*, 24, 60-69, 2018. 査読無

Tomonaga N, Tsudoku T, Manabe Y, Sugawara T. Sphingoid bases of dietary ceramide 2-aminoethylphosphonate, a marine sphingolipid, absorb into lymph in rats. *J Lipid Res*. 2019;60(2):333-340. 査読有
doi: 10.1194/jlr.M085654

[学会発表] (計 18 件)

菅原達也, シンポジウム SY12 「脂質素材の新たな展開」食品セラミド素材としてのスフィンゴ脂質の有用性 -皮膚に対する効果-, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016 年、招待講演

菅原達也, 皮膚に対する食品機能に注目した脂質成分の評価、平成 28 年度日本油化学会関東支部第 2 回セミナー、2016 年、招待講演

菅原達也, -脂質機能に関する新展開- 「脂質成分の皮膚機能保全作用」, 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 2017 年、招待講演

Tatsuya Sugawara, Nami Tomonaga, Jingjing Duan, Yuki Manabe, Tsuyoshi Tsudoku, Takashi Hirata, Dietary marine sphingolipids as functional food components IUNS 21st International Congress of Nutrition, 2017 年, 国際学会

菅原達也、肌をいつまでも若々しく保つために～セラミドの秘密、FFF 健康食品フォーラム 2017 年度、2017 年、招待講演

菅原達也、スフィンゴ脂質の食品機能性について、第 28 回美容・アンチエイジング食品研究会、2018、招待講演

菅原達也、スフィンゴ脂質の消化・吸収と代謝の研究、第 20 回脂質栄養シンポジウム「脂質の消化・吸収と代謝の最前線」、2018 年、招待講演

Yui Tomo, Nami Tomonaga, Yuki Manabe, Akinori Ando, Tsuyoshi Tsuduki, Jun Ogawa, and Tatsuya Sugawara, Evaluation of Intestinal Absorption of Dietary Sphingolipids, 2018 AOCS Annual Meeting & Expo, 2018 年、国際学会

菅原達也、食品セラミド素材の消化・吸収と機能性、第 31 回水産油脂技術懇話会、2018 年、招待講演

塘由惟、友永奈美、川上祥子、安藤晃規、小川順、真鍋祐樹、菅原達也、¹³C ラベル化したスフィンゴ脂質の消化管吸収の評価、日本油化学会第 57 回年会、2018 年

菅原達也、スフィンゴ脂質の消化と吸収、第 49 回日本消化吸収学会総会、2018 年、招待講演

菅原達也、食品セラミド素材としてのスフィンゴ脂質の機能性と分析法、第 18 回基準油脂分析試験法セミナー、2018 年、招待講演

友永奈美、都築毅、真鍋祐樹、菅原達也、イカ皮スフィンゴ脂質の消化管吸収と皮膚に対する効果、日本食品科学工学会第 1 回関西支部大会、2018 年

菅原達也、皮膚に効果を与える食品成分 セラミド素材と海洋カロテノイド、平成 30 年度 第 2 回 バイオ産業研究会、2018 年、招待講演

友永奈美、都築毅、真鍋祐樹、菅原達也、イカ皮由来スフィンゴホスホノ脂質の食品機能性評価、第 6 回リン化合物討論会（第 33 回 C-P 化合物研究会）、2018 年

Tatsuya Sugawara, Sphingolipids as functional food components, The 3rd International Symposium on Lipid Science and Health, 2018 年、国際学会、招待講演

Tatsuya Sugawara, Jingjing Duan, Nami Tomonaga, Kazuhiko Aida, Yuki Manabe, Takashi Hirata, Analysis of Glucosylceramides from Rice by Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry, The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health, 2018 年

Tatsuya Sugawara, Nami Tomonaga and Yuki Manabe, Evaluation of sphingolipids as functional foods by mass spectrometry、第 3 回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2019 年、国際学会、招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：都築毅

ローマ字氏名：Tsuyoshi Tsuduki

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00404848

研究分担者氏名：安藤晃規

ローマ字氏名：Akinori Ando

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：10537765

研究分担者氏名：真鍋祐樹

ローマ字氏名：Yuki Manabe

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：20730104

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。