

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07441

研究課題名(和文) 食後高脂血症発症メカニズムの解明とその改善作用を有する食品成分の同定

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms in postprandial lipidemia and identification of food-derived factors improving the postprandial lipidemia.

研究代表者

高橋 信之 (Takahashi, Nobuyuki)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50370135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化性疾患発症リスクとして近年、重要と考えられている食後高脂血症が、高脂肪食による腸管炎症で悪化する可能性について検討したところ、1週間の高脂肪食摂取による食後高脂血症の悪化が観察された。また摂取する脂質構成脂肪酸の違いについて検討したところ、不飽和脂肪酸に比べて飽和脂肪酸で食後高脂血症の悪化が認められた。以上の結果より、高脂肪食摂取、特に飽和脂肪酸の摂取により食後高脂血症が悪化する可能性が示唆された。

並行して検討した、抗炎症作用を有する新規食品成分のスクリーニングでは、新たに食品成分Xが同定され、動物レベルにおいても、高脂肪食誘導性の食後高脂血症悪化を改善することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, it has been tried to elucidate a relationship between postprandial lipidemia and intestinal inflammation induced by high-fat-diet (HFD) feeding. HFD-feeding for 1 week ameliorated postprandial lipidemia in the comparison to normal diet (ND) feeding in mice. Interestingly, saturated fatty acids induced the amelioration of postprandial lipidemia, but unsaturated fatty acids did not. These findings indicate that the feeding of HFD, particularly saturated fatty acids, ameliorates postprandial lipimide, suggesting increase in a risk of cardiovascular disease developments.

In addition, using a novel screening system for anti-inflammatory food factors, a novel food factor suppressing LPS-induced inflammation was identified: Food factor X. This compound improved the HFD-induced amelioration of postprandial lipidemia in mice.

研究分野：代謝生化学

キーワード：食後高脂血症 脂質代謝 腸管上皮細胞 炎症 食品成分

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管上皮組織における生体内への脂質輸送は食後高脂血症に関連する。

食品由来の脂質(トリグリセリド: TG)は、腸管内腔で膵リパーゼにより脂肪酸が遊離され、この脂肪酸の形で腸管上皮細胞に吸収されるが、細胞内で再び TG に生合成される。この再構成された TG が ApoB-48 と共にカイロミクロンを形成し、リンパ管を経て生体内循環へと輸送される。したがって、TG 再構成を含む腸管上皮細胞での脂質代謝は食後高脂血症に関連する重要な代謝経路である。しかし、腸管上皮細胞での脂質代謝が生体内への脂質輸送に影響しうるかどうかについては明らかにされていなかった。そこで平成 22~24 年度に申請者が実施した基盤研究 (B)「生体内への脂質取込を制御する腸管上皮組織の脂質代謝メカニズムの解明」により、PPAR 活性化を介した、腸管上皮細胞での脂肪酸酸化の亢進が、食後高脂血症を改善させることを明らかにした (Kimura R, et al., 2012, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410, 1-6; Kimura R, et al., 2013, *Obes. Res. Clin. Pract.*, 7, 353-360)。この成果によって、腸管上皮組織における脂質代謝が、メタリックシンドロームの予防・改善のための新たなターゲットとなりうる可能性が示された。

(2) 炎症は、様々な臓器・組織における脂肪酸酸化を阻害する。

生体内の脂質代謝は、様々な状況で変化する。例えば、感染症などにより引き起こされる炎症は、肝臓での脂肪酸生合成を亢進させ、一方で脂肪酸酸化を阻害する。その結果、肝臓からの TG 分泌量が増大し、血中 TG 濃度が上昇する。この炎症による TG 分泌量の増大は、肝臓だけでなく腸管上皮においても起こる可能性が高い。というのも、炎症時に産生が増加する TNF 投与により、腸管上皮細胞からの TG および ApoB-48 の分泌が増大することが報告されているためである (Qin B, et al., 2007, *Diabetes*, 56, 450-461)。さらに、近年、MAP キナーゼの 1 種である ERK が一過性に活性化されることが、腸管上皮細胞内でのカイロミクロンの形成に必須であることが報告された (Tran TT, et al., 2011, *J. Biol. Chem.*, 286, 25201-25213)。広く知られている通り、ERK は TNF によって活性化される細胞内情報伝達系主要経路の一つである。しかし、この炎症による腸管上皮からの TG 輸送増大が、腸管上皮細胞における脂質代謝の変化に起因するものであるかどうかは不明である。しかし、申請者らのグループは、組織はことなるものの、高脂肪食により肥満させることにより白色脂肪組織で炎症を引き起こすと、PPAR の発現が低下することを見出している (Goto T., et al. 2011, *J. Lipid Res.*, 52, 873-884)。したがって、炎症による TG 輸送の増大は、PPAR 発現量の低下を介した脂肪酸酸化の抑制が

原因である可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

上記のように、近年、食後高脂血症は、空腹時血中脂質濃度よりも動脈硬化性疾患リスクとして重要であると考えられている。腸管上皮組織における管腔側からリンパ管への食事由来脂質の輸送は食後の血中脂質濃度を決定する重要な過程である。この脂質輸送を抑えることが出来れば、食後高脂血症を効果的に抑制可能と考えられる。これまでの研究において、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の活性化を介して、腸管上皮細胞内での脂肪酸酸化を亢進させることで脂質輸送を抑えることができることを示した。しかし一方で、腸管における炎症が小腸上皮組織を介した脂質輸送を増大させることが報告されている。そこで炎症と小腸上皮組織での PPAR 活性ならびに脂肪酸酸化活性との関連を検討し、さらに抗炎症作用を有する食品成分による炎症を伴う病態下における食後高脂血症の改善が可能であるかという検討を目的とする。

3. 研究の方法 (計画)

(1) 炎症惹起が腸管上皮組織での PPAR 機能に影響しうるか?

炎症の惹起により肝細胞や脂肪細胞で PPAR の mRNA 発現が低下することは確認しているが、腸管上皮細胞でも同様に低下するかどうか、またどのような炎症シグナルがその低下に関与しているか、という点は明らかとなっていない。そこでまず、腸管上皮細胞での炎症惹起が食後高脂血症を増悪させるか、つまり PPAR の発現に影響しうるか、さらに腸管上皮細胞内のどのような炎症シグナルが関与しているかについて検討する。

腸管での炎症惹起による影響についての検討: 炎症惹起が食後高脂血症にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、培養細胞ならびに動物個体を用いて、腸管上皮細胞からの TG 放出量ならびに定量的 RT-PCR やウエスタンブロットングによる PPAR ならびにその標的遺伝子の mRNA 発現レベルの検討を行う。

-1 培養細胞レベルの検討: 腸管上皮細胞培養系である Caco-2 細胞をトランスウェルで培養し、頂端膜側から LPS を、もしくは基底膜側から TNF などの炎症性サイトカインを添加し、腸管上皮組織での炎症を擬似的に再現する。その条件で頂端膜側からオレイン酸を加え、基底膜側に分泌される TG ならびに ApoB48 を定量する。そして同じ条件で PPAR の mRNA ならびにタンパク質レベルを定量的 RT-PCR やウエスタンブロットングによりそれぞれ定量する。また PPAR 応答配列により誘導されるルシフェラーゼのレポータープラスミドを Caco-2 細胞に遺伝子導入することで、擬似的炎症条件下における PPAR

の活性を評価する。また放射性同位体ラベルされた脂肪酸を用いた脂肪酸酸化活性の測定も実施し、実際に炎症によって脂肪酸酸化が抑制されたかどうか調べる。さらに炎症誘導刺激を与えた Caco-2 細胞内でどのようなシグナル経路が活性化されているか、ERK などのリン酸化(MAP キナーゼシグナル経路)や I- κ B のタンパク質レベル(NF- κ B シグナル経路)の検討をウエスタンブロッティングにより行う。

-2 動物個体レベルの検討：申請者が以前、脂肪組織における PPAR の発現レベルを検討するために構築した LPS 経口投与による炎症惹起モデルを用いて、オリーブオイル投与後の TG および ApoB48 の血中濃度変化を検討する。また TNF など炎症性サイトカインの腹腔内もしくは静脈内への投与によって食後高脂血症がどのように変化するか検討する。このとき、腸管上皮組織での PPAR の mRNA 発現レベルならびに MAP キナーゼシグナル経路・NF- κ B シグナル経路の活性化、腸管上皮組織での脂肪酸酸化活性の変化についても、定量的 RT-PCR やウエスタンブロッティングにより併せて検討する。

(2) 抗炎症作用を有する化合物が腸管上皮組織での脂肪酸酸化活性を回復しうるか？

炎症を抑える作用を有する食品成分が炎症惹起による食後高脂血症に与える影響について、培養細胞ならびに動物個体を用いて検討する。

抗炎症作用を有する食品成分の影響についての検討：炎症による食後高脂血症増悪化が、抗炎症作用を有する食品成分で改善されるかどうかについて下記のような検討を行う。

-1 培養細胞レベルの検討：Caco-2 細胞に炎症を惹起させた状態で、抗炎症作用を有する食品成分を同時に添加し、基底膜側への TG や ApoB48 の分泌を定量する。抗炎症作用を有する食品成分としては、既に申請者が肥満による脂肪組織の炎症を抑制しうることを報告している auraptene (柑橘類に含まれる) や dehydroabietic acid (漢方薬成分) fenugreek (スパイス成分) などを検討する。またこの時、PPAR の mRNA 発現やそのリガンド依存的活性化、および MAP キナーゼや NF- κ B などの炎症シグナル経路の活性化についても検討を行う。

-2 動物個体レベルの検討：前年度に実施した LPS 投与により腸管上皮組織での炎症を惹起させ、その条件下で抗炎症作用を有する食品成分を摂取した場合に食後高脂血症の増悪化が抑制されるかについて検討する。この時、小腸上皮細胞での PPAR の mRNA 発現や脂肪酸酸化活性、MAP キナーゼなどの炎症シグナル経路の検討も行う。

PPAR 活性化作用を有する食品成分に対する影響の検討：申請者は、肥満糖尿病モデ

ルマウスを用いて、病態下であっても腸管上皮細胞での PPAR が活性化されれば、食後高脂血症の改善が認められることを既に報告しているが、その状態では、炎症によって PPAR の発現や活性が低下してしまい、炎症が起こっていない状態に比べて改善作用が弱い可能性が考えられる。そこで食後高脂血症を改善する化合物を摂取する場合、抗炎症作用を有する食品成分が共存するかどうかで食後高脂血症改善作用に違いが生じるかどうかについても検討を行う。

炎症状態にある Caco-2 細胞やマウス腸管において、抗炎症作用を有する食品成分の有無によって、PPAR 活性化作用を有する薬剤 (ベザフィブラート) および食品成分 (DHA; Kimura, et al., 2013, 54, 3258-3268) の基底膜側への TG・ApoB48 の分泌量もしくは血中 TG 濃度の上昇抑制効果を検討する。

(3) 食後高脂血症の改善作用を有する、新たな食品成分が存在するか？

次年度、利用する食後高脂血症改善作用を有する新規食品成分のスクリーニング系を確立する。

脂肪酸の炭素骨格中に蛍光化合物を挿入した構造を持つ BODIPY は、脂肪酸輸送担体 (FATP) のスクリーニングにも利用された脂肪酸類似化合物であり、細胞内酵素により TG に取り込まれることも明らかになっている。96 穴トランスウェルに培養した Caco-2 細胞の頂端膜側からこの BODIPY を添加し、基底膜側培地の蛍光強度を測定することで、Caco-2 細胞の脂質輸送量を検討可能であると考えられる。予備的実験では、PPAR 活性化による基底膜側への TG 分泌抑制効果を再現良く検討することが出来ている。

確立したスクリーニング系を用いて、食後高脂血症改善作用が期待できる食品成分をスクリーニングにより同定し、動物個体レベルでの評価を実施する。

BODIPY を用いた脂質輸送量評価系を用いて、LPS 等により炎症を惹起した Caco-2 細胞における脂質輸送阻害を回復させる食品成分のスクリーニングを行う。スクリーニング対象とする食品成分は、食用植物に多く含まれ、多くの化合物で抗炎症作用が報告されているカロテノイドやテルペノイドから 50~100 種類程度を選ぶ。食後高脂血症改善作用が期待される食品成分が同定できれば、平成 28 年度「抗炎症作用を有する化合物が腸管上皮組織での脂肪酸酸化活性を回復しうるか？」上記の実験により炎症状態下における食後高脂血症に対する作用について動物個体レベルでの評価を行う。

4. 研究成果

(1) 炎症惹起が腸管上皮組織での PPAR 機能に影響しうるか？

まず高脂肪食により食後高脂血症が悪化するかどうかを動物レベルで検討した。当初、

通常飼料 (MF) と高脂肪食 (60 cal%) とを 1 週間摂食させ、食後高脂血症のアッセイ (Oral Lipid Tolerance Test : OLTT) を実施したところ、高脂肪食で食後高脂血症が有意に悪化していることが観察された。しかし、通常飼料中に植物由来成分が多く含まれていることから、高脂肪食の比較対象には適していないと考えられた。そこで改めて飼料組成を揃えた通常食 (10 cal%) および高脂肪食 (45, 60 cal%) を 1 週間、マウスに摂食させ、OLTT を実施した。その結果、やはり通常食に比べて高脂肪食において食後高脂血症が悪化した。また飽和脂肪酸ならびに不飽和脂肪酸の違いで、食後高脂血症の悪化に差が生じるかどうか検討したところ、不飽和脂肪酸が多い食用油に比べて、飽和脂肪酸が多い食用油で食後高脂血症の悪化が観察され、脂質構成脂肪酸の違いで食後高脂血症への影響が異なることが示唆された。

これらの現象に腸管での炎症が関与しているかどうか、遺伝子発現レベルでの解析を行ったが、実験条件のためか、個体差が大きく、炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルに有意な差が認められなかった。この点については、実験条件の再検討が必要であり、現在、条件を変えて実施している。

(2) 抗炎症作用を有する化合物が腸管上皮組織での脂肪酸酸化活性を回復しうるか？

および

(3) 食後高脂血症の改善作用を有する、新たな食品成分が存在するか？

上記の動物実験と並行して、細胞レベルにおいて抗炎症作用を有する新規食品成分のスクリーニングのため、マクロファージ培養株である RAW264.7 細胞に、炎症性転写調節因子 NF- κ B 応答配列とレポーター遺伝子ルシフェラーゼをつなげたレポータープラスミド DNA を導入し、薬剤選択により安定導入細胞を確立した。ポジティブコントロールとして、マクロファージ活性化因子であるリポ多糖 (LPS) を添加すると、細胞内での NF- κ B 活性化によるルシフェラーゼ活性の増加が認められた。そこで、複数の食品由来候補成分をアッセイしたところ、「食品成分 X (特許申請に関わるため、化合物名は公開しない)」が最も強い抗炎症作用を示した。なおこの食品成分 X には、以前、食後高脂血症改善作用があると報告した DHA のような PPAR 活性化作用は認められなかった。

そこで食品成分 X の動物レベルでの食後高脂血症に対する作用を検討するため、高脂肪食摂食条件下で OLTT を実施した。食品成分 X を 0.1% 含む高脂肪食を摂食したマウスでは、コントロールである高脂肪食摂食マウスと比べて、有意に食後高脂血症が改善した。現在、その食品成分 X の作用が抗炎症作用を介したものであるかどうか、遺伝子発現レベルで解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 35 回日本骨代謝学会「動脈硬化性疾患発症リスクとしての食後高脂血症の食品成分による改善 (シンポジウム)」高橋信之、上原万里子、2017 年 7 月 (長崎)

第 20 回日本病態栄養学会「魚油摂取による腸管での脂質代謝制御を介した食後高脂血症の改善 (シンポジウム)」高橋信之、2017 年 1 月 (福岡)

グルコサミン研究会「慢性炎症とメタボリックシンドローム発症 (特別講演)」高橋信之、2015 年 8 月 (東京)

第 69 回日本栄養・食糧学会「消化管における脂質代謝制御による食後高脂血症の改善 (シンポジウム)」高橋信之、2015 年 5 月 (神奈川)

国際フードファクター学会 (ICoFF) “DHA attenuates postprandial hyperlipidemia by activating PPAR- α in intestinal epithelial cells.” Takahashi N, Kimura R, Goto T, Kawada T, Inoue H, Murota K, Uehara M. 2015 年 11 月 (韓国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 信之 (TAKAHASHI, Nobuyuki)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号 : 50370135

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

上原 万里子 (UEHARA, Mariko)

室田 佳恵子 (MUROTA, Kaeko)