

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00890

研究課題名(和文)新規機能性脂質によるメタボリックシンドローム予防に関する研究

研究課題名(英文)Prevention of metabolic syndromes by novel functional lipids

研究代表者

柳田 晃良 (Yanagita, Teruyoshi)

西九州大学・健康栄養学部・客員教授

研究者番号：00093980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はリン脂質、とくにEPA含有リン脂質の新規機能を中心に研究した。リン脂質は脂肪肝炎症および動脈硬化症を予防改善した。また、リン脂質は運動能力の向上や疲労予防作用も示した。さらに、EPA/DHA リン脂質はアルツハイマーモデル動物の記憶と空間認知能力を改善することを示した。本研究において、長寿社会に有効な機能性脂質に関する新知見を提供することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会においてどのような食事成分の摂取が、メタボリックシンドローム、疲労や非アルコール性脂肪肝や老化と関連するアルツハイマー病やパーキンソン病など脳機能障害に対する予防効果について検討した。EPA含有脂質に関する知見は少なかったため、EPA含有リン脂質の新規機能性を中心に検討した。EPAリン脂質の投与は各種病態モデル動物に対して、EPA-TGやEPAトリグリセリドに比べて、メタボ及び予防脂肪肝効果が高いことを示した。疲労の改善も認められた。さらに、EPAリン脂質は脳アミロイドの産生・蓄積抑制をもたらし、アルツハイマー病やパーキンソン病など脳機能障害を予防することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Effects of lipid quality on the manifestation of lifestyle-related diseases, fatty liver and brain function disorders were evaluated. The study demonstrated the n-3 PUFA-PLs (EPA & DHA) prevented fatty liver and EPA-phospholipids (PLs and plasmalogen) alleviated atherosclerosis in mice. n-3 PUFA-PLs alleviated exercise fatigue and extended the time and distance to running exhaustion as well as inhibiting glycogen consumption and muscle injury. n-3 PUFA-PLs improved memory and learning performance and reduced A $\beta$  level in the brain of Alzheimer's disease (AD) model mice (DHA > EPA). DHA-PC and EPA-PC alleviated oxidative stress and inflammation as well as apoptosis and autophagy in the brain. These improvements in cognitive function were observed even with egg-phosphatidylcholine (PC) that did not contain DHA, but the effect was limiting.

研究分野：食品機能化学

キーワード：メタボリックシンドローム 非アルコール性脂肪肝 疲労 EPA-リン脂質 EPA-プラスマロゲン 脳機能障害 アルツハイマー病 パーキンソン病

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え健康寿命を延伸する方策が求められている。とくに食事脂質への関心が高い。食事脂質の生理機能は脂肪酸と結合部位や構成極性基、非極性基の違いにより異なると考えられているが、グリセロ脂質分子種とくに各リン脂質分子種の健康機能に関する研究は少ない。食事による疾患予防は緊急の課題であり、メタボリックシンドローム、動脈硬化や認知機能を改善する機能性脂質の探索と利用が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、多価不飽和脂肪酸を含む複合脂質の栄養生理機能とその作用機序を明らかにし、機能性食品として利用することである。n-3PUFA である EPA は DHA 前駆体として役割や EPA 代謝物の生理機能が示唆されているが、それらの知見はまだ十分でない。本研究では、メタボリックシンドローム、疲労、運動能力、認知症、アルツハイマー病に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

アルツハイマー病 (AD) モデル動物として老化促進マウス (SAMP8) 等を使い、脂肪肝モデルラットや動脈硬化モデルマウス (アポE 欠損マウス) も用いる。EPA/DHA リッチな海洋魚介類由来各種脂質を調製する。疲労や運動能力への影響はトレッドミルや水泳で測定し、脳内での影響因子および遺伝子発現を調べる。in vivo 実験では動物の記憶や空間認知機能試験 (water maze test) を行い脳組織 (海馬など) のアミロイド (A $\beta$ ) 産生系の酵素や遺伝子への影響を調べる。脳内酸化ストレス、炎症系酵素およびサイトカインの発現を測定する。in vitro 系 AD モデル培養系も用いる。

### 4. 研究成果

#### (1) EPA リン脂質の抗疲労作用

不飽和脂肪酸の抗メタボ作用や抗疲労作用に興味もたれているが、EPA/DHA リン脂質や非極性型 EPA/DHA の影響の違いを検討した知見は少ない。本研究では、主に EPA リン脂質と EPA エチルエステル (EPA-EE) の運動疲労に対する影響の違いをマウスで評価した。マウスは9時間絶食後に EPA リン脂質および EPA エチルエステルエマルジョンを投与し (1g/kg) 2, 4, 8 時間後に負荷をかけた条件で遊泳させた。対照群にはコーン油を与えた。その結果、8時間後の遊泳時間は EPA-リン脂質群で EPA-EE および対照群に比べて有意に遊泳時間が長いことが認められた。一方、血中乳酸濃度は EPA-リン脂質群で低い値を示した。運動終了直後および5分後の血中グルコース濃度、筋肉および肝臓グリコーゲン量は EPA-リン脂質群で有意に高値を示した。筋肉障害の評価指標である血中クレアチンキナーゼ活性と白血球数は EPA-リン脂質群で有意に低下した。したがって、EPA-リン脂質は遊泳による筋肉損傷を予防する作用を持つことが示唆された。

また、生化学的パラメーターは筋肉-肝臓-筋肉間でのコリサイクルを促進し、肝臓および筋肉のグリコーゲン合成亢進を示唆した。これらの研究から、EPA-リン脂質は乳酸リサイクリングを増加させ、さらにグリコーゲン消費と筋肉損傷を抑制することで運動性疲労を抑制するものと推察された。

#### (2) EPA/DHA リン脂質の脂肪肝予防作用

メタボリックシンドロームと密接に関係する脂肪肝発症に対する EPA および DHA 含有リン脂質食およびそれらのリポソーム (Lipo-EPA, Lipo-DHA) の予防効果を比較した。Lipo-EPA は肝臓中性脂肪を減少させ、肝障害マーカーも低下させた。同時に、SREBP-1c と FAS 遺伝子発現を阻害し、SREBP-2 と HMGR 発現レベルを抑制した。また、EPA-リン脂質と Lipo-DHA は脂肪肝の改善作用を示した。したがって、これらの脂質の食品補助剤としての有効性が示された。

#### (3) EPA リン脂質の認知機能改善作用

アルツハイマー病 (AD) はアミロイド病変、神経細胞繊維の乱れ、ニューロン損傷、反応性神経膠症、進行性認知症などの特徴をもつ難治性変成疾患である。A $\beta$  は AD 病理の必須の役割を担っている。DHA-PC および EPA-PC のアルツハイマー病軽減作用と機序について認知症モデルマウス (SAMP8) 系で評価した。その結果、DHA-PC および EPA-PC 両群で記憶や認知症の改善作用が認められた。両リン脂質群は脳内アミロイド (A $\beta$ ) を低下させ、酸化ストレスとアポトーシスを低下させ、炎症をダウンレギュレーション

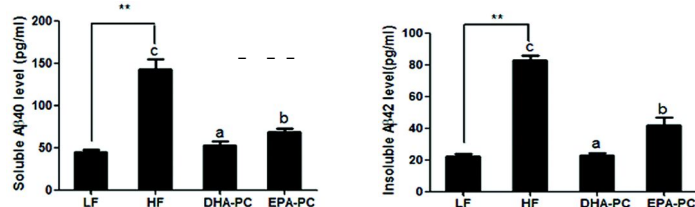
し、ニューロン損傷の改善効果を示したが、DHA-PC で改善効果が EPA-PC に比べて高いことを示した(図 1)。別の実験で、EPA-PC はオートファジー炎症経路を介して A $\beta$  誘発性神経毒を軽減することも示唆された。

**Fig. 1 Effects of DHA-PC and EPA-PC on  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) generation in the hippocampus of SAMP8 mice.**

Left: soluble A $\beta$ 40, Right: insoluble A $\beta$ 42. LF: low fat group, HF: high fat group.

DHA-PC: HF+DHA-PC group, EPA-PC: HF+EPA-PC group.

\*\*P<0.01. H. Che, T. Yanagita et al, Food & Function 9:643 (2018)

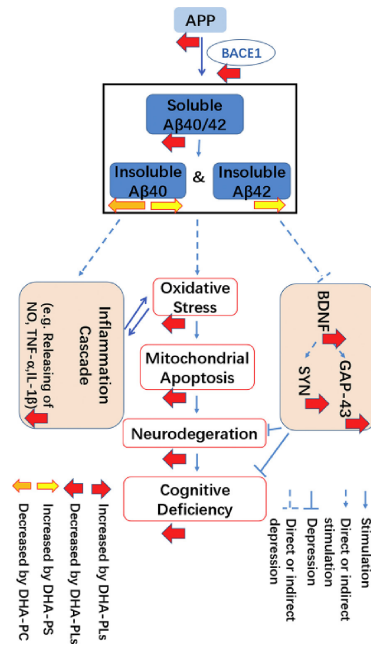


認知症に対するリン脂質型 DHA の効果を検討し、DHA-PC は DHA-TG + 卵 PC や DHA-TG + グリセロホスホリルコリンに比べて、認知症予防改善作用はより有効であることを示し、その作用機序の一端も明らかにした。

さらに、認知欠如に対する各リン脂質の改善効果を調べた。年齢 10 ヶ月の SAMP8 マウスは、8 週の間、2% (w/w) EPA-PC/PE (EPA : DHA=46.8% : 3.01%)、または 2%EPA-PS (EPA-PC/PE から生成) を食物として与え、バーズ迷路テストおよびモリス迷路テストで行動パフォーマンスを調べた。行動テストの結果は、EPA-PC/PE と EPA-PS がメモリーおよび認識の不足をかなり改善することを示した。さらに、酸化ストレス、アポトーシス、神経栄養性ファクター、tau の過剰リン酸エステル化の低下と A $\beta$  病理の変化を測定した。脳内酸化ストレスとアポトーシスの顕著な改善が EPA-PC/PE と EPA-PS グループに見つけられた。EPA-PS は、tau および  $\beta$ -アミロイドペプチド (A $\beta$ ) 生成と蓄積抑制し、神経栄養活性に対する EPA-PC/PE に比べても顕著な効果を示した。これらの結果は EPA-PS は EPA-PC/PE に比べて記憶と認識を改善する作用が強いことを示し、リン脂質極性基の重要性が示唆された。

次に、EPA-ホスファチジルエタノールアミン (EPA-PE) と EPA エタノールアミンプラズマロゲン (EPA-pPE) の認知機能の欠如への影響について評価した。アミロイド (A $\beta$ )<sub>42</sub> を投与した AD モデルマウスに EPA-PE、EPA-pPE を投与した (150mg/kg/day)。その結果、認知機能欠如に対して EPA-pPE は EPA-PE に比べて有効な作用を示した。機序として、SOD 活性の亢進を介した酸化ストレス調節、MDA レベルの低下、さらに GSK-3 とタウのリン酸化の低下が認められた。EPA-PE は Bax とカスパーゼ 9 の発現を阻害する点で EPA-pPE に比べて効果的であった。EPA-pPE は TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の発現を阻害し、さらに NLRP3、カスパーゼ 1 を低下させる点で効果的であった。すなわち、EPA-pPE は酸化ストレス、ニューロン障害、アポトーシス、ニューロン炎症を阻害し A $\beta$  誘導性ニューロン毒性を改善した。EPA-pPE のビニルエーテル結合の重要性が示唆された。

EPA/DHA リン脂質リッチなクリルオイルの脳機能障害への効果を SAMP8 マウスを用いて評価した。クリルオイル食は Morris water maze/Barnes maze test および Open field test を用いた学習脳、記憶欠如および心配性への顕著な改善効果を示した。さらに、クリルオイルは海馬での A $\beta$  蓄積を低下させた。その機序として、MDA と GSH-Px 活性の増加など広範な因子の関与が示唆された。



#### (4) 動脈硬化症の予防改善作用

プラスマロゲンはリン脂質の一種で、脳に多い成分である。sn-1 位のアルケニル基（ビニルエーテル基）はラジカル感受性が高く、酸化障害から細胞を守る役割を持つ可能性があり、AD や動脈硬化症など酸化ストレスが関係する病態の防御機構が示唆されているが、その詳細は十分解明されていない。本研究では、EPA-ホスホエタノールアミン型プラスマロゲン（EPA-PLsEth）が動脈硬化症モデルマウスに及ぼす影響を検討した。その結果、胆汁酸代謝を調節する腸微生物叢のリモデリングにより動脈硬化を予防する可能性を示した。すなわち、EPA- PLsEths は動脈硬化の病変を低下させ、LDL-C レベルを低下させた。EPA-PLsEth は胆汁酸プロファイルの変化に貢献する腸微生物叢に影響し、FXR 活性の阻害を誘導した。胆汁酸の変化は FXR 活性の阻害により誘導される CYP7A1 発現を増加させ、胆汁酸合成を亢進するものと考えられた。

#### (5) DHA 欠乏マウスに対する各種 DHA 構造体の補足効果

n-3PUFA 欠乏マウスへの DHA-PC, DHA-TG+卵 PC または DHA-TG+グリセロホスホリルコリン投与の効果と比較した。その結果、各組織への DHA 取り込み量から DHA-PC が極めて有効なことが示された。

#### (6) ホスファチジルコリン代謝物 TMAO の作用

コリン含有化合物の一部は生体内で TMAO に変換されることから、その影響が懸念されている。そこで、通常の実験系で用いられるコリン濃度の影響を評価したところ、リン脂質群と対照群との間に生体内 TMAO 濃度の差異はなかった。一方、過剰 TMAO 投与でアポ E<sup>-/-</sup>マウスの動脈病変形成は促進し、腸での胆汁酸代謝が関与する可能性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Che Hongxia, Zhou Miaomiao, Zhang Tiantian, Zhang Lingyu, Ding Lin, Yanagita Teruyoshi, Xu Jie, Xue Changhu, Wang Yuming	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparative study of the effects of phosphatidylcholine rich in DHA and EPA on Alzheimer's disease and the possible mechanisms in CHO-APP/PS1 cells and SAMP8 mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 643 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1039/c7fo01342f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Chengcheng, Wang Dan, Xu Jie, Yanagita Teruyoshi, Xue Changhu, Zhang Tiantian, Wang Yuming	4. 巻 45
2. 論文標題 DHA enriched phospholipids with different polar groups (PC and PS) had different improvements on MPTP-induced mice with Parkinson's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 417 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hamajima Hiroshi, Tanaka Masaru, Miyagawa Miyuki, Sakamoto Mayuko, Nakamura Tsuyoshi, Yanagita Teruyoshi, Nishimukai Megumi, Mitsutake Susumu, Nakayama Jiro, Nagao Koji, Kitagaki Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Koji glycosylceramide commonly contained in Japanese traditional fermented foods alters cholesterol metabolism in obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/09168451.2018.1562877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanagita Teruyoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 How functional lipids affect on fatty liver and brain function disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Nutrition	6. 最初と最後の頁 171 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.4010/jln.27.171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Munir Maliha T., Ponce Christopher, Powell Catherine A., Tarafdar Kaiser, Yanagita Teruyoshi, Choudhury Mahua, Gollahon Lauren S., Rahman Shaikh M.	4. 巻 183
2. 論文標題 The contribution of cholesterol and epigenetic changes to the pathophysiology of breast cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Che Hongxia, Li Qian, Zhang Tiantian, Wang Dandan, Yang Lu, Xu Jie, Yanagita Teruyoshi, Xue Changhu, Chang Yaoguang, Wang Yuming	4. 巻 66
2. 論文標題 Effects of Astaxanthin and Docosahexaenoic-Acid-Acylated Astaxanthin on Alzheimer 's Disease in APP/PS1 Double-Transgenic Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 4948 ~ 4957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b00988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Qian, Wu Fengjuan, Wen Min, Yanagita Teruyoshi, Xue Changhu, Zhang Tiantian, Wang Yuming	4. 巻 83
2. 論文標題 The Protective Effect of Antarctic Krill Oil on Cognitive Function by Inhibiting Oxidative Stress in the Brain of Senescence-Accelerated Prone Mouse Strain 8 (SAMP8) Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 543 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/1750-3841.14044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chang Mengru, Zhang Tiantian, Han Xiuqing, Tang Qingjuan, Yanagita Teruyoshi, Xu Jie, Xue Changhu, Wang Yuming	4. 巻 66
2. 論文標題 Comparative Analysis of EPA/DHA-PL Forage and Liposomes in Orotic Acid-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Rats and Their Related Mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 1408 ~ 1418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.7b05173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wu Fang, Wang Dan-dan, Wen Min, Che Hong-xia, Xue Chang-hu, Yanagita Teruyoshi, Zhang Tian-tian, Wang Yu-ming	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative analyses of DHA-Phosphatidylcholine and recombination of DHA-Triglyceride with Egg-Phosphatidylcholine or Glycerolphosphorylcholine on DHA repletion in n-3 deficient mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1186/s12944-017-0623-2">https://doi.org/10.1186/s12944-017-0623-2</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Gao X, Jiang C1, Xu J, Yanagita T, Xue C, Wang Y	4. 巻 80 (11)
2. 論文標題 Serum pharmacokinetics of choline, trimethylamine and trimethylamine-N-oxide after oral gavage of phosphatidylcholines with different fatty acid compositions in mice	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2217-2223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2016.1206813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Teruyoshi Yanagita
2. 発表標題 Dietary Bioactive Lipids for Healthy Ageing
3. 学会等名 1st International Conference on Sciences and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teruyoshi Yanagita
2. 発表標題 Beneficial Foods for Healthy Ageing
3. 学会等名 2019 International Students Academic Conference, Yuanpei University of Medical Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳田 晃良
2. 発表標題 機能性脂質とメタボリックシンドローム予防
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第26回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永尾晃治 柳田晃良
2. 発表標題 脂質構造異性体とメタボリックシンドローム
3. 学会等名 日本栄養食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考