

令和元年6月9日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07728

研究課題名(和文) エーテル型リン脂質の抗動脈硬化作用機序の解明とその応用に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Analysis and applications of the protective role of ether phospholipids on arteriosclerosis

研究代表者

西向 めぐみ(Nishimukai, Megumi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：40374730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞、動物個体を用いて動脈硬化に対するエーテル型リン脂質(プラスマローゲン)の関与を調べたところ、末梢組織でのコレステロールの引き抜きにプラスマローゲンが関与すること、また、加齢と卵巣摘出で血中のプラスマローゲンが減少することが明らかになり、閉経後の動脈硬化にもプラスマローゲンが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化症、さらに閉経後の動脈硬化症にもエーテル型リン脂質の関与を示唆する結果を得た。この結果は、エーテル型リン脂質の新たな生理機能を提案するとともに、ヒトの健康に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvement of ether-type phospholipids including plasmalogen on arteriosclerosis using cultured cells and animals, and it has been shown that plasmalogen is involved in the cholesterol efflux in peripheral tissues. Also, our findings indicate that plasmalogen is decreased in the blood with aging and ovariectomy, suggesting that plasmalogen may be involved in postmenopausal arteriosclerosis. These findings indicate the novel function of ether phospholipids and could contribute to the human health.

研究分野：脂質生理学

キーワード：エーテル型リン脂質 動脈硬化 閉経

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

1. 研究開始当初の背景

プラスマローゲン(PIs)は、脳や心筋など酸素消費量の多い組織に多く含まれる。PIsのsn-1位のビニルエーテル基はラジカル感受性が高く、組織局在性と合わせると、酸化傷害から細胞を守る役割を持つことが考えられ、動脈硬化症など酸化ストレスが関係する病態の防御因子としての機能が示唆されてきた。

我々は、健常者および冠動脈疾患患者において、血中のPIsが動脈硬化関連指標と非常に強い相関を持ち、動脈硬化のリスクが高くなると血中のPIs、特にコリン型PIs(PIsCho)濃度が減少することを明らかにしている。また、PIsは動脈硬化関連因子以外に性別間でも差が見られ、男性に比べ女性において血中PIsCho濃度が有意に高くなっていた。冠動脈疾患の罹患率は女性の方が男性に比べ低い、閉経後は罹患率が上昇することが知られている。閉経前後においてホルモン代謝(エストロゲン)が変化し、それに付随したリポタンパク質代謝の変化が原因の一つであると考えられている。また、エストロゲン自体が酸化ストレス軽減作用をもち、閉経後は酸化ストレスマーカーが上昇するという報告もあり、その予防法の探索も急務である。

2. 研究の目的

冠動脈疾患におけるPIsの抗動脈硬化作用機序の解明を目指すとともに、冠動脈疾患の原因の一つとして閉経に注目し、閉経とPIsの相互関係、「体内PIs量を増加させる食品成分」の閉経後の脂質代謝改善作用を探索することにより、PIsを含むエーテル型リン脂質の脂質代謝改善効果に関する研究基盤を確立することを目的とし、以下の検討をおこなった。

- (1) 株化細胞を用いたエーテル型リン脂質の抗動脈硬化作用機序の解明
HDLのコレステロール引き抜き能への影響
リポタンパク質代謝に関するタンパク質発現への影響
- (2) 閉経モデルラットを用いたリポタンパク質代謝へのエーテル型リン脂質の影響
閉経モデルラットの血中パラメータおよび脂質代謝関連分子の解析
閉経モデル動物でのアルキル型リン脂質摂取による脂質代謝改善作用の検討

3. 研究の方法

- (1) 株化細胞を用いたエーテル型リン脂質の抗動脈硬化作用機序の解明
HDLのコレステロール引き抜き能への影響
エーテル型リン脂質の抗動脈硬化の作用機序の一つとして、HDLによるマクロファージからのコレステロール引き抜き能の向上が考えられる。そこで、株化細胞としてHTP-1細胞(ヒト由来)をマクロファージ様に分化後、トリチウムラベルしたコレステロールを取り込ませた後、試験脂質を添加し、HDLによるコレステロール引き抜き能を評価した。

リポタンパク質代謝に関するタンパク質発現への影響

HDLの機能向上には、構成成分であるapoAIのようなタンパク質の変化も関与していると考えられる。また、コレステロールを合成・蓄積する組織への影響も考えられる。そこで、肝臓やマクロファージなどリポタンパク質代謝・動脈硬化と関連のある組織の株化細胞(肝臓:ヒト肝癌由来細胞HepG2細胞、マクロファージ様:ヒト単球由来細胞THP-1細胞、小腸:ヒト結腸癌由来細胞Caco-2細胞)にアルキル型リン脂質もしくはPIs、さらに比較対照としてのジアシル型リン脂質を添加し、リポタンパク質代謝に関するタンパク質(アポタンパク質やABCタンパク質)の遺伝子発現をqPCRで検討した。

- (2) 閉経モデルラットを用いたリポタンパク質代謝へのエーテル型リン脂質の影響

閉経モデルラットの血中パラメータおよび脂質代謝関連分子の解析

ヒトにおける実年齢を考慮し、Retireラット(6か月齢以上)での検討を行った。RetireのWistar/ST雌ラットと、4週齢のWistar/ST雌ラットを用いた。予備飼育後、卵巣摘出(OVX)手術および疑似手術を行い、Retire群、Retire+OVX群、Normal(若齢)群に分け、4ヶ月間飼育した。解剖後、血漿は脂質抽出し、LC-MS/MSを用いてプラスマローゲンを測定した。また、血中中性脂質、リン脂質、コレステロール濃度は、酵素法により測定した。

さらに、卵巣摘出をしたRetire雌性ラットにコレステロール食を与え、4ヶ月間飼育し、上述と同様の分析を行なった。

4. 研究成果

- (1) 株化細胞を用いたエーテル型リン脂質の抗動脈硬化作用機序の解明
HDLのコレステロール引き抜き能への影響
sn-2位にオレイン酸結合したジアシル型リン脂質またはPIsをマクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞に各リン脂質を添加したところ、ジアシル型に比べ、細胞にプラスマローゲンをとりこませると僅かではあるが引き抜き能が向上が見られた。
リポタンパク質代謝に関するタンパク質発現への影響
マクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞に各リン脂質を添加したところ、ABCA1とAPOBの遺伝子発現はジアシル型、アルキル型、PIsのいずれの添加においても発現が増

加した。ABCG1 は Pls とジアシル型で増加したが、アルキル型は添加濃度依存的に低下した。

肝臓のモデルである HepG2 細胞では、ABCA1 および APOA にて、ジアシル型リン脂質の添加で遺伝子発現が低下したが、エーテル型リン脂質の影響は見られなかった。

小腸のモデルである分化させた Caco-2 細胞では Pls またはジアシル型リン脂質の添加により、ABCA1 および APOA の遺伝子発現が上昇していた。

以上をまとめると、添加したリン脂質および臓器の違いによってリポ蛋白質代謝関連遺伝子の発現が異なる結果となった。今回用いたリン脂質の特徴から考察すると、sn-1 位の結合様式によってリポ蛋白質代謝応答が異なる可能性が示唆された。中でも、THP-1 細胞での検討で、エーテル型リン脂質の添加で、関連遺伝子の発現上昇が見られたことより、末梢でのコレステロールの輸送にエーテル型リン脂質が関係していることが示唆された。

(2) 閉経モデルラットを用いたリポタンパク質代謝へのエーテル型リン脂質の影響

閉経モデルラットの血中パラメータおよび脂質代謝関連分子の解析

Retire ラットでは若齢ラットに比べ、血中リン脂質中の Pls の割合は減少し、卵巣摘出を行なった Retire ラットではさらに減少していた。また、血中の中性脂質およびコレステロール濃度も上昇していた。血中中性脂質、コレステロール濃度は、特に Retire + OVX 群で有意な増加または傾向が認められ、閉経後の女性と似た脂質プロファイルを示した。これは、加齢および閉経が原因であると考えられる。これら脂質プロファイルにより、血中 Pls 減少を指標とした動脈硬化モデルとして、加齢および卵巣摘出ラットは有用であることが示唆された。

さらにコレステロール添加食を Retire+OVX ラットに与えたところ、血中総コレステロール濃度の有意な増加が認められ、特に non-HDL コレステロール濃度の増加が認められた。一方、Pls 濃度は、コリン型、エタノールアミン型共に、コレステロール添加群で有意な減少が認められた。

これらの結果より、加齢や閉経で Pls が減少すること、さらに、コレステロール食を摂取し、血中のコレステロール濃度が上昇すると、血中 Pls が減少することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Ikuta A, Sakurai T, Nishimukai M, Takahashi Y, Nagasaka A, Hui SP, Hara H, Chiba H. (2019) Composition of plasmalogens in serum lipoproteins from patients with non-alcoholic steatohepatitis and their susceptibility to oxidation. Clin Chim Acta. 493:1-7. (査読有)

Watanabe N, Suzuki T, Yamazaki Y, Sugiyama K, Koike S, Nishimukai M. (2019) Supplemental feeding of phospholipid-enriched alkyl phospholipid from krill relieves spontaneous atopic dermatitis and strengthens skin intercellular lipid barriers in NC/Nga mice. Biosci Biotechnol Biochem. 83:717-727. (査読有)

Makino R, Takano K, Kita K, Nishimukai M. (2018) Influence of long-term feeding of high-fat diet on quercetin and fat absorption from the small intestine in lymph duct-cannulated rats. Biosci Biotechnol Biochem. 82:2007-2011. (査読有)

Maeba R, Kojima KI, Nagura M, Komori A, Nishimukai M, Okazaki T, Uchida S. (2018) Association of cholesterol efflux capacity with plasmalogen levels of high-density lipoprotein: A cross-sectional study in chronic kidney disease patients. Atherosclerosis. 270:102-109. (査読有)

Jannatul Ferdouse, 阪本真由子, 酒谷真以, 浜島浩史, 松永陽香, 柘植圭介, 西向めぐみ, 柳田晃良, 永尾晃治, 光武進, 北垣浩志 (2017) 麹で造られる醸造食品のグリコシルセラミド含量定量手法の検討とそれを用いた定量. 日本醸造学会誌, 112, 9, 655-662. (査読有)

Maeba R, Araki A, Ishii K, Ogawa K, Tamura Y, Yasunaga M, Minami U, Komori A, Okazaki T, Nishimukai M, Hara H, Fujiwara Y. (2016) Serum ethanalamine plasmalogens improve detection of cognitive impairment among elderly with high excretion levels of urinary myo-inositol: A cross-sectional study. Clin Chim Acta, 453:134-140.(査読有)

[学会発表](計23件)

藤盛和子, 山崎裕也, 杉山 梢, 滋野浩一, 原 博, 西向めぐみ, 機能性リン脂質がリポ蛋白質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響, 2018 年度 北海道支部・東北支部 合同支部大会, 2018 菊池太郎磨, 西向めぐみ, 卵巣摘出ラットにおける血中プラスマローゲンの変動, 第9回機能油脂懇話会(第20回CLA懇話会), 2018

藤盛和子, 山崎裕也, 杉山 梢, 滋野浩一, 前場良太, 原 博, 西向めぐみ, 機能性リン脂質がリポ蛋白質代謝関連遺伝子に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018

西向めぐみ, バイオマーカーとしての 血中プラスマローゲンの可能性, 第29回夏期油脂・コレステロール研究会(招待講演), 2017

菊池太邦磨、西向めぐみ、閉経モデルラットにおける体内プラスマローゲンの変動、第 51 回日本栄養・食糧学会 東北支部大会、2017

菊池太邦磨、西向めぐみ、閉経モデルラットにおける体内リン脂質脂肪酸組成の変動、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017

菊池太邦磨、西向めぐみ、閉経モデルラットにおける体内プラスマローゲンの変動、第 50 回 日本栄養・食糧学会東北支部大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山崎裕也（株式会社 ADEKA）

ローマ字氏名：YAMAZAKI YUYA