

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05892

研究課題名(和文) プラズマローゲン摂取における大腸での機能性および代謝動態に関する研究

研究課題名(英文) Study on food functions and metabolism of plasmalogen in colon

研究代表者

山下 慎司 (YAMASHITA, Shinji)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：90531434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エーテルリン脂質プラズマローゲンの食品機能性として、大腸疾患に対する効果を検証した。大腸疾患モデルとして、大腸炎症および大腸異常腺窩巢形成マウス、そしてリポポリサッカライド処理により炎症を惹起した腸管モデル細胞を用い試験を行った。本研究により、EPAやDHAを高含有するプラズマローゲンの継続摂取は、大腸炎症や大腸ガンをはじめとする大腸疾患を予防する可能性が示唆された。プラズマローゲンの大腸疾患予防効果機構の一つとして、腸管上皮に取り込まれプラズマローゲンが炎症反応の初期反応を抑制することにより、その後の腸管傷害への発展を防ぐことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、プラズマローゲン摂取による新しい機能性知見として、大腸疾患予防効果が明らかとなった。近年、生活習慣の変化が原因と考えられる大腸疾患罹患者が増加しており、それら疾患の予防法あるいは症状改善法に対する社会的ニーズは高い。また、腸は栄養吸収だけではなく、免疫および神経行動とのかかわりも深い。したがって、本研究による腸管保護作用に関する知見は、社会的意義に加え、プラズマローゲンのさらなる可能性を示した点で学術的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of plasmalogen intake on colon impairments. Their evaluation were applied to in vivo the mouse models of colon inflammation and the formation of aberrant crypt foci, and in vitro the intestinal inflammation. As result, continuous administration of plasmalogen bearing EPA and DHA may prevent colon impairments including inflammatory bowel disease and colon cancer. It is hypothesized that plasmalogen absorbed into the intestinal epithelium suppresses the first step of inflammatory reactions to alleviate the development of the impairments.

研究分野：食品科学

キーワード：プラズマローゲン 大腸腺腫 腸炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とするエタノールアミンプラズマローゲン (Pls) は、特徴的なビニルエーテル結合をグリセロール骨格 sn-1 位に有するリン脂質であり、脳や赤血球、大腸粘膜などに多く含まれる。Pls は、sn-2 位にドコサヘキサエン酸 (DHA) やイコサペンタエン酸 (EPA) など高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が優先的に結合する。これまでに、内因性 Pls は抗酸化、抗炎症作用に寄与することが報告されてきた。近年では、アルツハイマー型認知症などの神経疾患患者の脳や血液での Pls の低値が示唆され、脳機能改善を目的としたサプリメントが流通している。

2. 研究の目的

本研究では、吸収代謝を経る食事性 Pls の特性、すなわち腸における代謝動態と機能性、とくに抗炎症作用に関し、培養腸細胞およびモデル動物を用い、その作用およびメカニズムを解明する。本研究により、Pls の機能性食品としての発展性、特に腸における疾患予防の可能性を示すことができると考える。

3. 研究の方法

(1) プラズマローゲン摂取が大腸異常腺窩巢形成に及ぼす影響

本項目においては、大腸ガンの初期モデルである大腸異常腺窩巢 (ACF) 形成モデルマウスを用い、Pls 摂取が大腸における ACF 形成、炎症、アポトーシスに及ぼす影響を調査した。Pls を 87.3% 含有するエタノールアミンリン脂質 (PE) および 7.2% 含有する PE をそれぞれホヤ筋肉および豚肝臓から精製した。基本食は AIN93G を用い、餌間の PUFA 量の違いを少なくするために大豆油の一部を魚油に置換した。高 Pls 食、低 Pls 食はそれぞれ基本食に対して 0.1% のホヤ PE および豚肝臓 PE を加えた。コントロール群、ジメチルヒドラジン塩酸塩 (DMH) 群、DMH+高 Pls 食群、DMH+低 Pls 食群に分け、1 週間試験食を与えた後、DMH を腹腔内に投与することにより ACF の形成を誘導した。十週間の試験食および DMH 処理後、麻酔下で、心臓採血および大腸の採取を行った。大腸は半分をホルマリン固定後、ACF 数のカウントに用いた。また、残りの半分は粘膜をかきとり、プロテナーゼインヒビターを添加しホモジナイズ後、ELISA および Proteome Profiler により炎症性サイトカインである TNF- α およびアポトーシス関連タンパク質の発現を測定した。

(2) プラズマローゲン摂取が大腸炎症に及ぼす影響

本項目においては、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 飲水により大腸炎症を誘導したモデルマウスを用い、Pls 摂取が大腸における炎症傷害、炎症、アポトーシスに及ぼす影響を調査した。Pls の精製及び餌の作製は前項に従った。コントロール群、DSS 群、DSS+高 Pls 食群、DSS+低 Pls 食群に分け、10 日間試験食を与えた後、DSS を飲み水に混ぜることにより大腸炎症を誘導した。DSS 飲水開始後の体重をプロットし、コントロール群と比較し、DSS 投与により平均値が 2 回連続で低値を示した 16 日目を炎症初期、有意な低値が 3 回連続で観察された 38 日目を炎症後期と判断し、麻酔下で、心臓採血および腸の採取を行った。腸は半分をホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、大腸のクリプト形状を観察した。また、残りの半分は前項に従い、炎症性サイトカインである TNF- α 、インターフェロン- γ (IFN- γ)、アポトーシス関連タンパク質の発現を測定した。

(3) プラズマローゲンが in vitro 腸管炎症に及ぼす影響

本項目においては、in vitro 系にて Pls による腸管炎症抑制効果の詳細なメカニズム解析を行った。腸管炎症モデルは、分化型 Caco-2 細胞に対しリポサッカライド (LPS) 添加し炎症惹起することにより作成した。生細胞数は血球計算盤によりカウントした。アポトーシス細胞は DAPI および TUNEL 染色により検出・カウントした。また細胞への Pls の取り込みは高濃度の塩化ナトリウム溶液で細胞表面を洗浄後、細胞から脂質抽出、固相抽出を行った後、LC-MS/MS により分析した。炎症関連タンパク質およびアポトーシス関連タンパク質の発現は Proteome Profiler、TNF- α レベルは ELISA により測定した。

(4) 腸管におけるプラズマローゲン代謝

本項目においては、Pls とグリセロール骨格 sn-2 位の脂肪酸を酵素的に切断したリゾ Pls の腸管における吸収特性を in vivo マウスと ex vivo 摘出腸管において比較した。ホヤ PE、リゾ化ホヤ PE、およびそれらの混合物の mol 数を合わせ、タウロコール酸水溶液で乳化後、マウスに胃内投与した。投与 1, 2, 4, 8 時間後に血液を採取し、その血漿中の Pls 分子種を LC-MS/MS を用い分析した。また、マウス空腸の反転腸管を作成し、KRB 緩衝液 95% 酸素-5% 二酸化炭素通気下における、ホヤ PE、リゾ化ホヤ PE、リゾ化ホヤ PE + 遊離脂肪酸の腸管内部への吸収を調査した。

4. 研究成果

(1) プラズマローゲン摂取が大腸異常腺窩巢形成に及ぼす影響

DMH 処理により大腸 ACF の形成が確認された。ACF の構成は 1 つの異常腺窩から成る AC1 が最も多く、2 つからなる AC2、3 つ以上からなる AC3 と続いた。一方、PIs 摂取により DMH 誘導性 ACF 形成は抑制され、内訳では低 PIs 食により AC1 形成のみが有意に抑制されたのに対し、高 PIs 食摂取は AC1、AC2、AC3 すべての形成を有意に抑制した。また、DMH 処理は大腸粘膜での活性型カスパーゼ 3、カタラーゼ、Bcl-x の発現レベルを増加したが、高 PIs 食摂取は、それらの増加を有意に抑制した。さらに、DMH 処理は大腸粘膜中の DHA を持つ PIs レベルを低下させたが、高 PIs 食摂取によりそのレベルはコントロール群と同程度に保たれた。本研究内容の詳細は Nguma, E., Yamashita, S. *et al.*, *Lipids*, 56(2); 167-180 (2021)において報告した。

(2) プラズマローゲン摂取が大腸炎症に及ぼす影響

DSS 飲水により体重の低下、大腸長の短縮、脾臓重の増加など大腸炎症に起因すると考えられる傷害が観察された。一方、PIs 摂取によりそれらの傷害は緩和され、餌中の PIs 量が多いほどコントロール群に近い値を示した。また、DSS 飲水は大腸クリプトの損傷、大腸粘膜中のミエロペルオキシダーゼ活性の増加、チオバルピツール反応基質レベルの増加、IFN- γ レベルの増加、活性型カスパーゼ 3 レベルの増加を示したが、PIs 摂取はそれらの増加を抑制した。DSS 飲水は大腸粘膜のアラキドン酸を持つ PIs レベルを減少させたが、PIs 摂取はそれをコントロール群と同レベルに保った。以上から、PIs 摂取は大腸炎症における酸化ストレスおよび炎症ストレスを抑制することにより、大腸傷害を防ぐことが示唆された。本研究内容の詳細は Nguma, E., Yamashita, S. *et al.*, *J Agric Food Chem*, 69(44); 13034-13044 (2021)において報告した。

(3) プラズマローゲンが in vitro 腸管炎症に及ぼす影響

腸管モデル細胞に対する LPS 処理は細胞数を減少させた。一方、PIs の添加は濃度依存的に LPS による細胞数減少を抑制した。また、LPS 処理は、DAPI および TUNEL 染色により確認されるアポトーシス様細胞の数を増加させたのに対し、PIs の添加はその増加を抑制した。さらに、LPS 処理は炎症関連タンパク質の発現を増加させたが、PIs の添加はその増加を抑制した。PIs の添加は細胞内の EPA および DHA を有する PIs レベルを増加させ、添加後 16 時間でそれらのレベルは最大となった。16 時間の PIs 前処理後、PIs を含まない培地に交換し、LPS 処理を行ったが、その場合においても TNF- α レベルの増加が抑制された。以上から、PIs の大腸保護作用の一つとして、腸細胞に吸収された PIs が炎症ストレスおよびそれに続く傷害を緩和することにより、腸細胞を保護することが示唆された。本研究内容の詳細は Nguma, E., Yamashita, S. *et al.*, *ACS Omega*, 6(4); 3140-3148 (2021)において報告した。

(4) 腸管におけるプラズマローゲン代謝

PIs、リゾ PIs、それらの混合物をマウスに胃内投与し、PIs 分子種の血漿レベルを経時的に分析した。その結果、リゾ PIs、混合物、PIs の順で血漿中の PIs 分子種のピーク時間が早くなった。投与後の血漿で高レベルを示した分子種は投与サンプルに多く含まれる DHA と EPA に加え、アラキドン酸タイプの PIs であった。また反転腸管を用いた試験では、サンプルとのインキュベーション時間 30 分において、腸管への取り込みが確認され、PIs と比較し、リゾ PIs とのインキュベーションにおいて高い PIs レベルを示した。本研究内容の詳細は Yamashita, S. *et al.*, *J Oleo Sci*, 70(2); 263-273 (2021)において報告した。

本研究により、EPA や DHA を高含有する PIs の継続摂取は、大腸炎症や大腸ガンなどの大腸疾患を予防する可能性が示唆された。PIs の大腸疾患予防効果機構の一つとして、摂取された PIs がリゾ化し腸管上皮に取り込まれた後 PIs に再構成され、炎症反応の初期反応を抑制することにより、その後の腸管傷害への発展を防ぐことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita Shinji, Fujiwara Kazufumi, Tominaga Yuki, Nguma Ephantus, Takahashi Takumi, Otoki Yurika, Yamamoto Ayaka, Higuchi Ohki, Nakagawa Kiyotaka, Kinoshita Mikio, Miyazawa Teruo	4. 巻 70
2. 論文標題 Absorption Kinetics of Ethanolamine Plasmalogen and Its Hydrolysate in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 263 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess20223	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 -
1. 著者名 Nguma Ephantus, Yamashita Shinji, Kumagai Kei, Otoki Yurika, Yamamoto Ayaka, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka, Miyazawa Teruo, Kinoshita Mikio	4. 巻 6
2. 論文標題 Ethanolamine Plasmalogen Suppresses Apoptosis in Human Intestinal Tract Cells in Vitro by Attenuating Induced Inflammatory Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 3140 ~ 3148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c05545	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 -
1. 著者名 Nguma Ephantus, Tominaga Yuki, Yamashita Shinji, Otoki Yurika, Yamamoto Ayaka, Nakagawa Kiyotaka, Miyazawa Teruo, Kinoshita Mikio	4. 巻 56
2. 論文標題 Dietary PlsEtn Ameliorates Colon Mucosa Inflammatory Stress and ACF in DMH Induced Colon Carcinogenesis Mice: Protective Role of Vinyl Ether Linkage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 167 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12283	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 Nguma Ephantus, Yamashita Shinji, Han Kyu-Ho, Otoki Yurika, Yamamoto Ayaka, Nakagawa Kiyotaka, Fukushima Michihiro, Miyazawa Teruo, Kinoshita Mikio	4. 巻 69
2. 論文標題 Dietary Ethanolamine Plasmalogen Alleviates DSS-Induced Colitis by Enhancing Colon Mucosa Integrity, Antioxidative Stress, and Anti-inflammatory Responses via Increased Ethanolamine Plasmalogen Molecular Species: Protective Role of Vinyl Ether Linkages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 13034 ~ 13044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.1c04420	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富永祐基, 菅野紘平, 山下慎司, 山本采佳, 仲川清隆, 宮澤陽夫, 木下幹朗
2. 発表標題 薬剤誘発性急性肝炎モデル系への食餌性エタノールアミングリセロリン脂質の効果
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ephantus Nguma, Yuki Tominaga, Shinji Yamashita, Yurika Otoki, Ayaka Yamamoto, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa, Mikio Kinoshita
2. 発表標題 Ethanolamine plasmalogen suppresses DMH induce colon carcinogenesis in vivo and ameliorates inflammatory stressed human intestinal tract cells in vitro
3. 学会等名 日本油化学会第59回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富永祐基, 菅野紘平, 山下慎司, 山本采佳, 仲川清隆, 宮澤陽夫, 木下幹朗
2. 発表標題 薬剤誘発性急性肝炎モデル系への食餌性エタノールアミングリセロリン脂質の効果
3. 学会等名 2020年度 日本農芸化学会北海道支部 / 第50回 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ephantus Nguma, Shinji Yamashita, Kei Kumagai, Yurika Otoki, Ayaka Yamamoto, Takahiro Eitsuka, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa, Mikio Kinoshita
2. 発表標題 Ethanolamine plasmalogen attenuates DSS-induced colitis in vivo and ameliorates inflammatory stressed human intestinal tract cells in vitro by suppressing apoptosis
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ephantus Nguma
2. 発表標題 Dietary ethanolamine plasmalogen suppresses 1,2-DMH-induced colon ACF formation in mice: protective role against ACF development
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富永祐基
2. 発表標題 食餌性プラズマローゲンが1,2-dimethylhydrazine投与大腸腺腫発症モデルマウスに与える影響
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会北海道支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ephantus Nguma
2. 発表標題 Effects of extrinsic PlsEtn on Caco-2 and differentiated Caco-2: PlsEtn in human intestinal cancer cells and impaired intestinal lining
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富永祐基
2. 発表標題 薬剤誘発性急性肝炎モデル系への食餌性エタノールアミングリセロリン脂質の効果
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------