

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06356

研究課題名（和文）フィタン酸の異性体別機能性評価～畜産物摂取によるヒトの健康増進を目指して～

研究課題名（英文）Functional evaluation of phytanic acid diastereomers

研究代表者

仲西 友紀（Nakanishi, Tomonori）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20717889

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、牛乳・牛肉に含まれる新規機能性脂質フィタン酸に着目し、その免疫調節作用の詳細を調べた。その結果、フィタン酸はマウスT細胞からのサイトカイン産生を抑制し、特にTh1系やTh17系サイトカインに対して強く作用することが明らかになった。またフィタン酸はB細胞の抗体産生やマクロファージのNO産生も抑制した。更にフィタン酸はデキストラン硫酸ナトリウム誘発マウス大腸炎モデルにおける体重減少や腸粘膜肥厚を抑制した。また、牛乳や牛肉中のフィタン酸には3R,7R,11R-体と3S,7R,11R-体の2つの異性体があるが、Th1系サイトカインに対する抑制効果は3S,7R,11R-体の方が強かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛乳や牛肉などの畜産物はフィタン酸の天然の摂取源であり、8つあるフィタン異性体の中で3R,7R,11R-体（3R体）と3S,7R,11R-体（3S体）の2つを含んでいる。フィタン酸は免疫調節作用などの生理活性を有する機能性脂質として注目を集めてきた。本研究では、フィタン酸が培養細胞レベルのみならず動物個体レベルでも有効性を発揮する可能性が示され、更に3R体と3S体の免疫調節作用の差異についても新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on phytanic acid, a novel functional lipid found in milk and beef, and investigated its immunomodulatory effects in detail. The results showed that phytanic acid suppressed cytokine production from mouse T cells, especially against Th1 and Th17 cytokines. Phytanic acid also suppressed antibody production by B cells and NO production by macrophages. Furthermore, phytanic acid inhibited weight loss and intestinal mucosal thickening in a dextran sulfate sodium-induced mouse colitis model. Of the two phytanic acid diastereomers, 3R,7R,11R(3R)- and 3S,7R,11R(3S)-isomers, the 3S-isomer showed stronger inhibitory effects against Th1 cytokines than the 3R-isomer.

研究分野：畜産食品科学

キーワード：フィタン酸 畜産物 免疫調節作用

1. 研究開始当初の背景

フィタン酸 (3, 7, 11, 15-tetramethylhexadecanoic acid) は、粗飼料中のクロロフィルに由来するフィトールを前駆物質として、反芻動物のルーメン内で生成する分岐鎖脂肪酸である。フィタン酸には 8 つの光学異性体が存在するが、ルーメン内で生成する天然型は 3R 体 (3R, 7R, 11R-体) と 3S 体 (3S, 7R, 11R-体) の 2 つである。そのため、牛乳・牛肉には 3R 体と 3S 体が含まれており、ヒトはこれらの畜産物からフィタン酸を日常的に摂取している。

フィタン酸は、免疫疾患の治療標的分子として注目される PPAR (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体) を強力に活性化する (Nutr J, 13:17, 2014)。そのため、我々は免疫調節作用の観点でフィタン酸の機能性を探索してきた。特に近年は、牛乳・牛肉の有用性をより明確化するため、天然型である 3R 体と 3S 体に焦点を当てた研究を展開している。その結果、「ヘルパー T (Th) 細胞からのサイトカインの過剰産生が、天然型フィタン酸によって軽減される」ことなどが、明らかとなっている (Lipids Health Dis, 17:147, 2018)。これらの結果は、自己免疫疾患・アレルギー疾患に対する天然型フィタン酸の有効性を強く示唆している。一方で、更にフィタン酸の研究を進展させるためには、以下の 3 点が課題として残されている。

- I. ウシに与える粗飼料の種類によって、牛乳・牛肉中の 3R 体と 3S 体の組成比ならびに含有量が異なることが報告されている (J Agric Food Chem, 61:225, 2013)。他方で、これまでの研究ではフィタン酸の機能性は異性体別に調べられていない。
- II. フィタン酸の作用メカニズムの詳細は未解明である。PPAR には α 、 γ 、 δ の 3 つのサブタイプがあるが、免疫調節作用がどのタイプを介して発揮されるのかは調査されていない。
- III. フィタン酸の機能性は、培養細胞レベルでの活性を中心に評価されており、動物レベルでの有効性は未解明な点が多い。

2. 研究の目的

前述のような背景の下、我々はフィタン酸の選択的有機合成に取り組み、3R 体と 3S 体のみを含むジアステレオ混合物を取得することに成功した (Lipids Health Dis, 17:147, 2018)。本研究では、これを更に 3R 体と 3S 体に分離し、それぞれの精製物を用いた機能性評価によって、上記 3 つの課題克服を試みる。本研究は「畜産物摂取によるヒトの健康増進」を目指した基礎研究であり、具体的な目標として以下の 3 点を定める。

- I. 3R 体と 3S 体の免疫調節作用を培養細胞レベルで調査する。標的の細胞種は T 細胞、B 細胞、マクロファージとし、それぞれの細胞が産生するサイトカイン、抗体ならびに一酸化窒素に対するフィタン酸の影響を調べる。
- II. フィタン酸の作用メカニズムにおける各種 PPAR サブタイプの関与を調査する。
- III. フィタン酸の有用性を動物レベルで検証する。まずは正常マウスを用いてフィタン酸の組織移行性を調べる。その後、免疫疾患の病態モデルマウスを用いてフィタン酸の病態改善効果の評価する。

3. 研究の方法

培養細胞レベルの検討：

雌性 C57BL/6 マウスから脾臓を摘出し、細胞懸濁液を調製した後に 10% ウシ胎児血清、100 ユニット/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地で培養した。T 細胞系サイトカインの産生に対するフィタン酸の影響を調べるために、脾臓細胞を 10 μ g/mL の pokeweed mitogen (PWM) や phytohemagglutinin (PHA) で刺激し、30 μ M の 3R 体、3S 体もしくは両者のジアステレオ混合物の存在下で 37 $^{\circ}$ C、24 時間培養した。培養後、脾臓細胞から total RNA を抽出し定量的 RT-PCR 法にて interleukin (IL)-2、IL-4、IL-10、IL-17A および interferon (IFN)- γ のサイトカイン発現量を調査した。また磁器細胞分離にて単離した T 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomycin で刺激し、同様の実験を行った。更に、脾臓細胞を 72 時間培養した後の培養上清を回収し、市販の ELISA キットを用いて同様のサイトカインの濃度を測定した。加えて、B 細胞の機能に与える影響を調査するため、磁器細胞分離によって調製した B 細胞を Lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、30 μ M のフィタン酸の存在下で培養した。その後、培養上清を回収し ELISA にて IgM と IgG の濃度を測定した。また、マクロファージの機能に対する影響を調べるために、J774.1 細胞を IFN- γ と LPS で刺激し、30 μ M のフィタン酸の存在下で培養した。その後、培養上清中の一酸化窒素 (NO) 濃度を Griess 反応により測定した。また siRNA の技術で各種 PPAR をノックダウンした細胞を用いて同様の試験を行った。

動物個体レベルの検討：

雌性 C57BL/6 マウスを 2 群に分け、対照群には AIN-93M 組成の飼料を、実験群には 0.05% の

大豆油を 3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物に置換した飼料を与え 4 週間飼育した。その後、マウスから脳、肝臓、脂肪組織を摘出し、総脂質を抽出した後に、ガスクロマトグラフィー分析にて各組織の脂肪酸組成を解析した。

動物個体レベルの検討：

雌性 C57BL/6 マウスを 3 群に分け、対照群には AIN-93M 組成の飼料を、実験群には 0.05% もしくは 0.1% の大豆油を 3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物に置換した飼料を与え 4 週間飼育した。最後の 1 週間は 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水溶液を自由飲水させ大腸炎を惹起した。なお対照群の一部は陰性対照群の扱いとし DSS の代わりに水を自由飲水させた。飼育期間後は大腸や脾臓を摘出し、病理組織学的解析や定量的 RT-PCR によるサイトカイン発現量解析に供した。

4. 研究成果

培養細胞レベルの検討：

脾臓細胞を PWM や PHA で刺激した際の IFN- γ mRNA の発現は 3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物によって強力に抑制された。またジアステレオ混合物は IL-2 および IL-17A の mRNA 発現も抑制した。一方で、ジアステレオ混合物は IL-4 の mRNA 発現には有意な影響を受けなかった。ジアステレオ混合物は PWM 刺激による IL-10 の発現を抑制したが、PHA で刺激し際には同様の効果は見られなかった。PMA と ionomycin で刺激した精製 T 細胞を用いた際にも、3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物は Th1 系サイトカインの IFN- γ と IL-2、Th17 系サイトカインの IL-17A の mRNA 発現を抑制した。一方、ジアステレオ混合物は、Th2 系サイトカインである IL-4 と IL-10 の発現には明らかな影響を与えなかった。培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定したが、ジアステレオ混合物による IFN- γ や IL-17A の産生抑制効果は遺伝子レベルのみならずタンパク質レベルでも確認された。

T 細胞以外の免疫細胞種に対するフィタン酸の効果を検討するため、精製 B 細胞やマクロファージ様細胞 J774.1 を用いた検討も行った。その結果、3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物によって B 細胞からの IgM および IgG の産生が抑制されることが明らかとなった。また、ジアステレオ混合物は J774.1 細胞からの NO 産生も抑制した。

ジアステレオ混合物による免疫調節作用は T 細胞系サイトカインの中でも Th1 系サイトカインに強く現れていたため、IFN- γ と IL-2 の mRNA 発現に対するフィタン酸の効果を 3R 体と 3S 体で個別に評価した。その結果、両遺伝子発現に対する抑制効果は 3R 体より 3S 体の方が強いことが示された。

siRNA で各種免疫細胞の PPAR をノックダウンし、フィタン酸の効果が減弱するか否かを見極めることでフィタン酸の免疫調節作用における PPAR の関与を明らかにしようとした。しかしながら、研究期間内に得られた結果はバラツキが大きく一定の結論を導くことができなかった。

動物個体レベルの検討：

正常マウスに 3R 体と 3S 体のジアステレオ混合物を 4 週間摂取させた結果、フィタン酸とその代謝物であるプリスタン酸が脂肪組織に蓄積していた。またジアステレオ混合物を摂取したマウスの肝臓では、パルミチン酸等の飽和脂肪酸の組成比が減少する一方で、リノール酸などの多価不飽和脂肪酸の組成比が増加していた。しかしながら、脳においてはフィタン酸やプリスタン酸の蓄積が見られず、ジアステレオ混合物の摂取による脂肪酸組成の変化も軽微なものであった。

動物個体レベルの検討：

対照群では DSS の摂取開始後に顕著な体重減少が観察されたが、0.05% や 0.1% のフィタン酸を摂取したマウスでは体重減少の度合いが軽度であった。また病理組織学的解析により DSS 摂取群では腸粘膜の肥厚が認められたが、この変化もフィタン酸摂取群では軽減されていた。また、大腸や脾臓におけるサイトカイン発現もフィタン酸摂取により抑制される傾向にあり、特に IL-1 β や IL-18 などのマクロファージ系サイトカインの発現がフィタン酸摂取群では低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakanishi Tomonori, Kagamizono Kazuhiro, Yokoyama Sayaka, Suzuki Ryoji, Sakakibara Hiroyuki, Sugamoto Kazuhiro, Erickson Laurie, Kawahara Satoshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Dietary phytanic acid-induced changes in tissue fatty acid profiles in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Research	6. 最初と最後の頁 498～500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0022029920001089	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 Nakanishi Tomonori, Kagamizono Kazuhiro, Yokoyama Sayaka, Suzuki Ryoji, Sakakibara Hiroyuki, Erickson Laurie, Kawahara Satoshi	4. 巻 91
2. 論文標題 Effects of dietary phytol on tissue accumulation of phytanic acid and pristanic acid and on the tissue lipid profiles in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13424	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 Nakanishi Tomonori, Izumi Mikiyoshi, Suzuki Ryoji, Yamaguchi Kohta, Sugamoto Kazuhiro, Erickson Laurie, Kawahara Satoshi	4. 巻 90
2. 論文標題 In vitro characterization of anti-inflammatory activities of 3RS, 7R, 11R-phytanic acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Research	6. 最初と最後の頁 92～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0022029923000146	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 十亀侑矢、菅本和寛、仲西友紀
2. 発表標題 減炭反応を用いた光学活性なプリスタン酸の合成
3. 学会等名 第21回分析講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 十亀侑矢、菅本和寛、仲西友紀
2. 発表標題 減炭素反応を鍵反応とする光学活性なプリスタン酸の合成
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲西友紀・鈴木遼司・榊原啓之・菅本和寛・河原聡
2. 発表標題 フィタン酸の給与がマウスの組織脂肪酸組成に与える影響
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomonori Nakanishi, Keisuke Suga, Ryoji Suzuki, Satoshi Kawahara
2. 発表標題 Novel anti-inflammatory effects of 3RS, 7R, 11R-phytanic acid
3. 学会等名 The 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分担者	菅本 和寛 (Sugamoto Kazuhiro) (10274771)	宮崎大学・工学部・准教授 (17601)	

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
---------	---------