

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02931

研究課題名（和文）吸収と代謝に着目したスフィンゴ脂質の皮膚バリア機能向上作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of skin barrier improving effect of sphingolipids focusing on absorption and metabolism

研究代表者

菅原 達也（SUGAWARA, Tatsuya）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70378818

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚バリア機能向上作用のメカニズムの解明を目指した検討を行った。スフィンゴイド塩基に結合能を有する分子を探索したところ、スフィンゴイド塩基に結合する候補分子が同定され、ミトコンドリアの膜透過性に関わるタンパク質や糖鎖修飾に関わるタンパク質が含まれていた。また、安定同位体ラベル化合物を用いて、マウスの血中動態について調べたところ、経口摂取されたセラミドの一部は構成要素まで分解されずに、直接吸収されることが示された。さらに、一部のセラミドは消化を受けて吸収された後、体内でセラミドへと再合成されていることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いわゆるセラミド素材であるスフィンゴ脂質の経口摂取によって、皮膚バリア向上作用が示されているが、その消化や吸収の詳細は不明の部分が多く残されている。本研究結果から、セラミドの一部は消化されずに直接吸収されることや、スフィンゴ脂質の分解物であるスフィンゴイド塩基が結合するタンパク質の候補分子が見出された。これらの成果は、スフィンゴ脂質の吸収機構や作用メカニズムの解明につながるものであり、スフィンゴ脂質の更なる高度利用にも寄与する知見といえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the mechanism by which oral intake of sphingolipids improves skin barrier function was investigated. A search for molecules with binding ability to sphingoid bases led to the identification of candidate molecules that bind to sphingoid bases, including a protein involved in mitochondrial membrane permeability and in glycosylation. In addition, the blood kinetics of ceramide in mice were investigated using stable isotope labeling compounds, and it was shown that some of the orally ingested ceramide was directly absorbed without being degraded to its constituent elements. Furthermore, it was found that some ceramides were re-synthesized into ceramides in the body after being digested and absorbed.

研究分野：食品機能学

キーワード：セラミド スフィンゴ脂質 安定同位体 結合タンパク質 消化管

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な生物由来のスフィンゴ脂質が「食品セラミド素材」として用いられており、とくに皮膚への効果が期待されている。スフィンゴ脂質の骨格成分でもあるセラミドは、表皮脂質の50%程度を占めており、皮膚の保水性に重要な役割を担っている。アトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患や加齢による表皮セラミドの減少は、皮膚バリア機能の低下を引き起こす。グルコシルセラミドやスフィンゴミエリンなどの様々な食品素材由来スフィンゴ脂質を経口摂取することで、皮膚バリア機能が増強または改善することが動物実験や臨床試験により示されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかになっておらず、矛盾と疑問が残されている。

ヒトを含むほ乳動物において、スフィンゴシン(d18:1)が主要なスフィンゴイド塩基であり、飽和型スフィンガニン(d18:0)と、トリヒドロキシ型フィトスフィンゴシン(t18:0)を合わせて大部分を占めている。炭素数や二重結合の数が異なるスフィンゴイド塩基の分子種も自然界に多く存在し、その組成や化学構造は生物種によって大きく異なる。高等植物では8位に不飽和結合をもつものが主要であり、真菌類には分枝鎖の9-メチル型が存在することや、海産無脊椎動物には共役二重結合をもつトリエン型などが確認されている。このように、ほ乳動物の表皮セラミドと高等植物や海産物では化学構造が異なるにもかかわらず、それらの摂取でも皮膚への効果が示されている。

経口摂取されたスフィンゴ脂質は、構成単位に消化された後、小腸上皮細胞から体内へと吸収される。一部は体内でスフィンゴ脂質に再利用されるものの、大部分は脂肪酸へと代謝される。スフィンゴ脂質は消化されにくく、吸収の詳細なメカニズムや体内動態も不明な部分が多い。これらは、主にスフィンゴシンを持つスフィンゴ脂質に関する情報であり、多彩な化学構造の違いについては比較されていなかった。申請者らは、ほ乳動物とは異なる構造のスフィンゴ脂質も消化管内でスフィンゴイド塩基にまで消化されることや、吸収率が極めて低いことを見出し、また、小腸上皮細胞に発現している薬物排出トランスポーター(P-糖タンパク質)を介したスフィンゴシンの選択的吸収機構も示されている。このように、スフィンゴ脂質は吸収されにくく、皮膚で再利用されている可能性は極めて低い。

アメリカ人のスフィンゴ脂質摂取量は、1日あたり300~400mgと算出されており、食品全体の0.01~0.02%程度に相当する。日本人の場合には、1日当たりスフィンゴミエリン50~110mg、グルコシルセラミド60~80mg程度と見積もられている。このように、日常的に一定量のスフィンゴ脂質が摂取されているにもかかわらず、ごくわずかのサプリメント(およそ1mg/日)で効果が示されている。

2. 研究の目的

本研究では、経口摂取されたスフィンゴ脂質の体内動態と代謝変換に注目して、皮膚バリア機能への作用メカニズムの謎を切り開くことを目的とした。

これまでの知見から、経口摂取されたセラミド骨格が皮膚で利用されて機能を発揮する可能性は極めて低いと予想されるため、本研究では摂取されたスフィンゴ脂質の体内動態と代謝変換に注目することとした。これまでにスフィンゴ脂質の経口摂取によって表皮セラミド代謝が変動することが申請者らによって見出されている。さらにその効果は、スフィンゴイド塩基骨格の構造には依存しないことから、経口摂取されたスフィンゴ脂質やその代謝物が直接もしくは間接的に内因性セラミド代謝に影響を与える可能性が推測される。そこで、培養細胞やモデル動物を用いた評価を行い、質量分析法による解析を活用した解析を進めることとした。

このように本研究では、様々な化学構造の食品由来スフィンゴ脂質が経口摂取されたときの吸収機構の詳細を解明し、体内での代謝変換と動態を明らかにすることや、代謝物が表皮セラミド合成や皮膚バリア機能に与える影響を評価することで、「スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚バリア機能向上作用」の詳細なメカニズムを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) スフィンゴイド塩基結合タンパク質の探索

申請者のこれまでの検討から、スフィンゴイド塩基の吸収の選択性にP-糖タンパク質が寄与することが示されているが、その詳細な機構は不明である。その中で、特異的な結合分子の関与によってスフィンゴシンが選択的に吸収されることが推測された。そこで、スフィンゴシンに結合能を有する分子の探索と機能解析を進めることとした。

3種のスフィンゴイド塩基(スフィンゴシン、フィトスフィンゴシン、スフィンガジエニン)を磁性ナノビーズに固定化し、小腸上皮モデルに分化培養させたCaco-2細胞の破砕液と結合させることでスフィンゴイド塩基結合タンパク質の候補分子を精製した。精製した分子については、SDS-PAGEにより分離したのちに銀染色を行い、ゲル消化を経てMALDI-MSによるタンパク質同定を行った。さらに市販の抗体が入手可能なものについて、ウエスタンブロット法により、同定の確認を行った。

(2) 菌体由来安定同位体ラベル化スフィンゴ脂質を用いた体内動態の解析

申請者らは、スフィンゴ脂質の吸収率をリンパカニューレーション試験によって明らかにしてきた。しかしながら、これまでに得られた情報は消化管を介して体内に取り込まれた量であり、吸収後の代謝的变化や血中動態、さらに組織への分布についてはほとんどわかっていない。これらは、皮膚への作用メカニズムを解明する上では、極めて重要かつ必須の情報となる。そこで、安定同位体ラベル化スフィンゴ脂質を用いた解析を行った。

¹³C グルコースを炭素源として培養した真菌 *M. alpina* より得られた総脂質から調製したアルカリ安定画分を小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に添加した。一定時間培養した後、細胞内に取り込まれたラベル化スフィンゴ脂質を LC-MS を用いて解析した。また、LC-MS/MS や GC-MS を用いて、¹³C ラベル化物を指標に、予想される代謝産物の探索と同定を試みた。さらに ICR マウスに経口投与し、血漿中の ¹³C ラベル化スフィンゴ脂質を解析した。

(3) マウスにおけるセラミドおよびグルコシルセラミドの吸収動態

食品に含まれるスフィンゴ脂質は多様な分子種を含んでおり微量にしか吸収されないため、詳細な吸収動態については不明である。そこで本研究では、トリプル四重極リニアイオントラップ質量分析計を用いてマウスにおける遊離セラミドおよびグルコシルセラミドの消化管吸収を評価した。

ICR マウスに醤油粕から調製した遊離セラミドまたはコメ由来グルコシルセラミドを単回経口投与し、1 から 6 時間後の血漿に含まれるセラミドおよびグルコシルセラミドを測定した。

(4) スフィンゴ脂質の皮膚への影響の評価

畜産物や農作物に含まれるスフィンゴ脂質の経口摂取によって、皮膚バリア機能が改善することが報告されており、食品機能成分として注目されている。一方、海産物には特徴的な構造を有するスフィンゴ脂質の存在が知られている。なかでも、C-P 結合を有するスフィンゴホスホノ脂質(セラミド 2-アミノエチルホスホン酸、CAEP)は、海産軟体動物などに含まれており、日常的に摂取されているにもかかわらず、食品成分としてほとんど評価されていない。そこで、食事誘発によるアトピー性皮膚炎様モデルマウス(HR-AD マウス)を用い、CAEP 経口摂取による皮膚バリア機能への効果をグルコシルセラミドと比較し、遺伝子発現を調べることで作用メカニズムを検証した。ヘアレスマウスにマグネシウム欠乏飼料である HR-AD 飼料を 11 週間自由摂取させ、アトピー性皮膚炎様の症状を引き起こした。その後、0.1%の CAEP もしくはグルコシルセラミドを含む AIN93G 飼料(試験飼料)を自由摂取させ、皮膚の回復を調べた。

また、新規素材として食品分野での有効活用が期待される遊離セラミド(醤油粕由来セラミド)と、これまでに皮膚バリア機能改善効果が報告されているトウモロコシ由来グルコシルセラミドを用いて、正常なヘアレスマウスの皮膚への影響を評価した。0.1% 醤油粕由来セラミドまたはトウモロコシ由来グルコシルセラミド配合食をヘアレスマウスに 2 週間自由摂食させ、経皮水分蒸散量、角層水分量、粘弾性などの皮膚性状を測定した。試験終了後、皮膚の遺伝子発現や表皮に含まれるセラミドについて解析した。

4. 研究成果

(1) スフィンゴイド塩基結合タンパク質の探索

銀染色の結果、スフィンゴイド塩基結合タンパク質の候補分子として、複数のバンドが検出されたが、スフィンゴイド塩基分子種による違いは確認されなかった。MALDI-MS によるタンパク質同定の結果、各スフィンゴイド塩基分子種から同一のタンパク質が検出されたことを確認し、特定の化学構造のスフィンゴイド塩基のみに結合するタンパク質分子が存在する可能性は低いと考えられた。一方、同定されたタンパク質から P-糖タンパク質の糖鎖修飾を担うオリゴ糖転移酵素複合体サブユニットやミトコンドリア膜電位を制御するミトコンドリア膜タンパク質を含む複数の候補分子が見出された。さらにウエスタンブロッティング法によって、得られたタンパク質の同定結果が正しいことを確認した。また、分子ドッキングシミュレーションにより、スフィンゴイド塩基が構造に関係なく同じ部位に結合することが示された。

(2) 菌体由来安定同位体ラベル化スフィンゴ脂質を用いた体内動態の解析

¹³C ラベル化物を添加した Caco-2 細胞から、¹³C ラベル化セラミドおよびグルコシルセラミドが検出され、その組成は添加試料と類似していた。加えて、脂肪酸などの構成成分の一部が未標識のものに置換したセラミドやグルコシルセラミドも確認された。さらに、試料添加後 24 時間以上の培養によって、奇数鎖脂肪酸やリン酸エタノールアミンの ¹³C ラベル化物が検出された。

¹³C ラベル化物を経口投与したマウスの血漿からも、Caco-2 細胞と同様に、添加試料と一致する ¹³C ラベル化セラミドとグルコシルセラミドの分子種が検出され、一部が非標識の成分によって構成されるセラミドとグルコシルセラミドも確認された。これらの結果より、スフィンゴ脂質の一部は、分解されずに直接吸収されることが示唆された。また、構成成分に分解されて吸収された後、セラミドやグルコシルセラミドへの再合成と、脂肪酸や低分子への代謝が確認された。

(3) マウスにおけるセラミドおよびグルコシルセラミドの吸収動態

経口投与後の血漿から、投与試料に含まれるセラミドおよびグルコシルセラミド分子種が検

出された。これらの分子種は未投与血漿からはほとんど検出されなかった。さらに、グルコシルセラミド投与後の血漿から分解物と考えられるセラミド分子種が検出された。以上の結果から、経口摂取されたセラミドおよびグルコシルセラミドの少なくとも一部は直接吸収される可能性が示された

(4) スフィンゴ脂質の皮膚への影響の評価

HR-AD 食によって誘導されたアトピー性皮膚炎様マウスでは、経皮水分蒸散量 (TEWL) が高値を示し、皮膚バリア機能の破たんが認められた。HR-AD 食からコントロール食 (AIN-93G) に切り替えたところ、TEWL は速やかに回復した。このとき、CAEP またはグルコシルセラミドを 0.1% 含有する食餌によって、その回復は促進された。皮膚の解析の結果、タンパク質結合型セラミドの増加と、その合成関連遺伝子の発現促進が認められたことから、表皮のタンパク質結合型セラミド合成の亢進が効果に寄与していると考えられた。

また、遊離セラミド添加食で 2 週間飼育したヘアレスマウスの経皮水分蒸散量は、コントロール群に比べて有意に低下し、皮膚バリア機能が向上することが確認された。この効果は、グルコシルセラミド摂取群と比較して同等かそれ以上であった。一方、セラミド摂取によって、セラミド合成酵素 *Cers4* や皮膚バリアの形成に関わるインボルクリンの mRNA 発現量が有意に減少した。表皮に含まれるセラミド量については、一部の分子種で有意な増加が認められたが、摂取したスフィンゴ脂質に由来するセラミド分子種は検出されなかった。

以上の結果から、バリア機能を低下させた皮膚と正常な皮膚では食餌性スフィンゴ脂質による遺伝子発現や表皮のセラミド量への影響が異なっており、摂取したスフィンゴ脂質が間接的に表皮組織に作用する未知のメカニズムが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Sugawara Tatsuya	4. 巻 70
2. 論文標題 Sphingolipids as Functional Food Components: Benefits in Skin Improvement and Disease Prevention	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 9597 ~ 9609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.2c01731	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 Ohta Kazushi, Hiraki Shinobu, Miyanabe Masakatsu, Ueki Tatsuro, Aida Kazuhiko, Manabe Yuki, Sugawara Tatsuya	4. 巻 69
2. 論文標題 Appearance of Intact Molecules of Dietary Ceramides Prepared from Soy Sauce Lees and Rice Glucosylceramides in Mouse Plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 9188 ~ 9198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c07259	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 Ohta Kazushi, Hiraki Shinobu, Miyanabe Masakatsu, Ueki Tatsuro, Manabe Yuki, Sugawara Tatsuya	4. 巻 70
2. 論文標題 Dietary Ceramide Prepared from Soy Sauce Lees Improves Skin Barrier Function in Hairless Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1325 ~ 1334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess21128	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 Tomonaga Nami, Manabe Yuki, Aida Kazuhiko, Sugawara Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Dietary ceramide 2-aminoethylphosphonate, a marine sphingophosphonolipid, improves skin barrier function in hairless mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70888-0	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 菅原達也	4. 巻 92
2. 論文標題 食事性スフィンゴ脂質の機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 649-657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 皮膚の保全を目指した食品機能の研究 -カロテノイドとスフィンゴ脂質について-
3. 学会等名 令和4年度第1回日本栄養・食糧学会近畿支部参与会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 皮膚の健康維持に寄与する食品脂質 -スフィンゴ脂質とカロテノイド
3. 学会等名 食の健康科学 (ニッポン) 寄付講座 開設シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 食品機能成分としてのスフィンゴ脂質
3. 学会等名 2022年度生物機能研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田 知志、飯泉 陽介、真鍋 祐樹、菅原 達也
2. 発表標題 磁気ナノビーズ法を用いたスフィンゴイド塩基結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 スフィンゴ脂質の食理学的研究
3. 学会等名 第14回セラミド研究会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田知志、飯泉陽介、来見田遥一、亀田倫史、真鍋祐樹、菅原達也
2. 発表標題 Caco-2 細胞におけるスフィンゴイド塩基結合タンパク質の同定
3. 学会等名 第14回セラミド研究会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Sugawara
2. 発表標題 Protective effect of seafood ingredients on the skin
3. 学会等名 Blue Foods and Health International Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 皮膚の健康維持を目指した機能性脂質の評価
3. 学会等名 さがフード&コスメラボセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 スフィンゴ脂質の食品機能性 ～消化と吸収に注目して～
3. 学会等名 一般社団法人先端バイオ工学推進機構「機能性食品分科会」第10回会合（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原達也
2. 発表標題 食品脂質の皮膚保護作用～カロテノイドとセラミドについて～
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第513回講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 知志、開 忍、宮鍋 征克、植木 達朗、真鍋 祐樹、菅原 達也
2. 発表標題 マウスにおけるセラミドおよびグルコシルセラミドの吸収動態
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 川上祥子、太田和志、安藤晃規、小川 順、真鍋祐樹、菅原達也
2. 発表標題 菌体由来安定同位体ラベル化スフィンゴ脂質の腸管吸収評価
3. 学会等名 第13回セラミド研究会 学術集会
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
研究分担者	安藤 晃規 (ANDO Akinori) (10537765)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	真鍋 祐樹 (MANABE Yuki) (20730104)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

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