

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04104

研究課題名（和文）食事性フラボノイドのリンパ系輸送：輸送経路の選択因子と生理的役割の解明

研究課題名（英文）Lymphatic transport of dietary flavonoids: elucidation of its driving force and physiological roles

研究代表者

室田 佳恵子（Murota, Kaeko）

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：40294681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：フラボノイドは食品由来の機能性成分として注目されている。フラボノイドの機能性の作用機序を知る上で吸収代謝性に関する情報は重要である。我々はフラボノイドの一種であるケルセチンが吸収後、門脈だけでなく一部はリンパ系へ輸送されることを報告しているが、本研究においては、フラボノイドのリンパ系と血中への輸送割合は分子構造によって異なることを見出した。さらに、ケルセチンアグリコンを実験動物に2週間摂取させると、リンパ系輸送経路上に位置する腸管膜リンパ節の免疫応答に対して抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドを含むポリフェノールの健康効果に対する期待は大きい。多種多様なポリフェノールの機能性を有効に利用するための情報は未だ十分とはいえない。本研究の成果は、フラボノイドの吸収代謝機構の解明を通じて、その生理作用発揮のメカニズムに迫るものである。フラボノイドによる免疫調節作用はすでに知られているものの、本研究成果は腸管免疫機構に対する作用の少なくとも一部が吸収経路の影響を受けている可能性を示したものであり、化合物による機能性の違いを説明する一端となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Flavonoids have attracted attention as functional food factors. The information on their absorption and metabolism is important to clarify the mechanism of action of each molecule. We previously reported that quercetin, a type of flavonoid, is transported to the lymph, at least in part, as well as the portal vein after intestinal absorption. In this study, we found that the transport ratio of flavonoids to the lymph and the blood would be changed depending on their structures. Furthermore, it was suggested that quercetin metabolites suppressively regulated the immune response in mesenteric lymph nodes, where are on the way of the lymphatic absorption pathway, when quercetin aglycone was fed to the rodents for two weeks.

研究分野：食品機能学

キーワード：フラボノイド リンパ輸送 生体利用性 腸管膜リンパ節

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは代表的な機能性食品成分であるポリフェノールの一種であり、その化学構造は多様で 8000 種以上あるとされている。フラボノイドには抗酸化性をはじめとする様々な機能が期待されているが、吸収代謝性や生理作用を発揮する標的臓器は分子種により異なる。したがって、フラボノイドの生体利用性を明らかにすることは多様な分子種それぞれの作用機序解明に重要である。フラボノイドは植物性食品中では大部分が配糖体として存在している。結合する糖鎖の数や種類によって消化管における吸収部位が異なり、グルコースが単糖として結合した *O*-モノグルコシドは小腸粘膜に局在するラクターゼ-フロリジンヒドロラーゼ (LPH) や細胞質に存在する β -グルコシダーゼ (CBG) により加水分解され吸収されることが知られている。一方、グルコース以外の単糖や二糖類、修飾された糖が結合している配糖体の場合は、小腸で加水分解できないため、腸内細菌に資化されて生じたアグリコンや異化代謝物が吸収される。このような消化酵素の基質特異性や吸収部位の違いは、生体内に吸収されるフラボノイド代謝物を変化させるため、生理機能に大きく影響するが、詳細は十分に明らかになっていない。さらに、吸収されたフラボノイドや異化代謝物として生じるポリフェノール類はそのまま体内に存在するのではなく、大部分が第二相抱合反応により生じるグルクロン酸や硫酸の抱合体に変換される。第二相反応は主に肝臓で起こるが、小腸や大腸の上皮細胞にも抱合活性が存在する。したがって、フラボノイドの生理機能は、標的臓器にこれら抱合代謝物が到達して発揮されると考える必要がある。

ここで、臨床薬剤開発の分野では、経口投与する薬剤の効能を最大限に発揮するために、ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) が検討される。経口摂取した食品成分や薬品は小腸で吸収されると門脈系輸送とリンパ系輸送のいずれかで吸収されるが、その後の代謝運命は異なる。門脈系吸収経路においては、最初に到達する臓器は肝臓である。肝臓は様々な生体成分の貯蔵や生合成を担う臓器であるとともに、重要な解毒排泄器官でもあるため、門脈から輸送された薬剤分子は、速やかに解毒代謝を受けて不活性化され排泄されやすくなると推定されている。一方、リンパ系へ輸送されると、胸管で鎖骨下静脈へ流入し全身の循環系を巡った後に肝臓へ到達する。この際小腸上皮においても一部の解毒代謝は起こるが、肝臓に到達するのが遅れることで、解毒代謝による失活を免れた薬剤分子が活性を維持したまま標的部位へ届くのに有利になると考えられている。以上のことから、薬物と同様の代謝を受けるフラボノイドについても、ADME を考慮した機能性発現を想定することが重要である。

これまでに我々は、実験動物を用いて胃や小腸に投与したフラボノイドが一般的な吸収経路である門脈を介した吸収に加えて、脂質吸収経路であるリンパ系を介した経路でも吸収されていることを世界で初めて報告した (Murota and Terao 2005)。また興味深いことに、フラボノイドは水溶性の高い抱合代謝物としてリンパ液中に存在しており、同時に脂質を投与したことで増加したカイロミクロンを除去してもフラボノイド代謝物濃度には変化がなく (Murota *et al.* 2013)、リンパ液中のフラボノイド代謝物はカイロミクロンの構成成分ではないことが示唆された。これらの先行研究成果が得られていたものの、門脈とリンパ系の双方にフラボノイドが輸送される生理的意義は全く不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて本研究では、フラボノイドのリンパ系輸送について解明することを目的として実施した。第一に、フラボノイドがなぜ、どのようにリンパ系へと輸送されるのかを明らかにするため、構造の異なる様々なフラボノイド分子の比較実験を実施した。第二に、フラボノイドが門脈だけでなくリンパ系へも輸送されることが生理的にどのような役割を果たしているのか解明するため、リンパ管内皮細胞と腸管膜リンパ節を作用標的の候補としてフラボノイドがこれらの細胞や組織に与える影響について検討した。食事性フラボノイドの吸収経路としてのリンパ系輸送に着目した研究は世界的に見てもほとんど例がなく、フラボノイドのリンパ系輸送が機能性発揮に際してどのような生理的意義を持つのかを追求することで、新規の研究分野を開拓し食品の機能性を適切に制御するための新たな視点をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

1) フラボノイドの化学構造がリンパ系輸送に及ぼす影響の検討

フラボノイドの化学構造に着目し、どのような構造を持つフラボノイドがリンパ系に輸送されやすいのか明らかにするための比較実験を実施した。胸管リンパにカニューレを留置したラットの十二指腸に各種フラボノイドを 10 mg アグリコン当量/kg 体重の容量で経管投与

した。投与前 1 h から投与後 6 h までリンパ液を分取するとともに、尾静脈より採血を行った。得られたリンパ液および血漿を脱抱合処理し、HPLC-UV を用いて総フラボノイド濃度を求めた。なお、本実験は、島根大学松江キャンパス動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

2) フラボノイドのリンパ系輸送の生理的意義の検討

フラボノイドは血管内皮細胞と相互作用し、血管透過性制御や血流改善作用を示すことが報告されている。そこで、小腸で吸収された後リンパ液中に出現するフラボノイド代謝物がリンパ管内皮細胞に与える影響を解析するため、マウスリンパ節由来リンパ管内皮細胞である SVEC4-10 細胞株を用いた培養実験を行い、フラボノイドの培地への添加が各種遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

また、リンパ系輸送の経路上には腸間膜リンパ節 (MLN) が存在することから、MLN での免疫応答に対するフラボノイド代謝物の影響を調べた。これまでにケルセチンが樹状細胞の成熟、活性化を抑制するという報告があり、本研究においても MLN においてフラボノイド代謝物が樹状細胞の成熟、分化、抗原提示に与える影響を解析するため、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) へ各種フラボノイドを添加した時の影響を調べた。さらに、ラットあるいはマウスに標準食 (AIN-93G)、AIN-93G に 0.1% (w/w) となるようケルセチンアグリコンを添加した飼料 (ケルセチン添加食)、同様に 0.1% となるように大腸から吸収されるケルセチン配糖体であるルチンを添加した飼料 (ルチン添加食) を 2 週間自由摂取させた後、MLN を採取し組織学的解析を実施した。

なお、本実験は、島根大学松江キャンパス動物実験専門委員会あるいは近畿大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

1) フラボノイドの化学構造がリンパ系輸送に及ぼす影響

我々が実施したこれまでの先行研究において、ケルセチン (図 1) およびケルセチン-3-O-グルコシド (Q3G) は、ラット小腸から吸収されると代謝物の一部がリンパ液中に輸送されることを示した (Nakamura *et al.* 2018)。このとき、リンパ液と末梢血漿での濃度はアグリコンと配糖体で大きな差は見られず、さらにリンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は、アグリコンと配糖体のいずれでも約 1:4 であった。

本研究では、C3 位に水酸基を持たないフラボンであるアピゲニンとルテオリン (図 1) を対象とし、それぞれのアグリコン及び 7-O-モノグルコシド配糖体を用いて、化学構造の違いがリンパ輸送性に及ぼす影響を検討した。

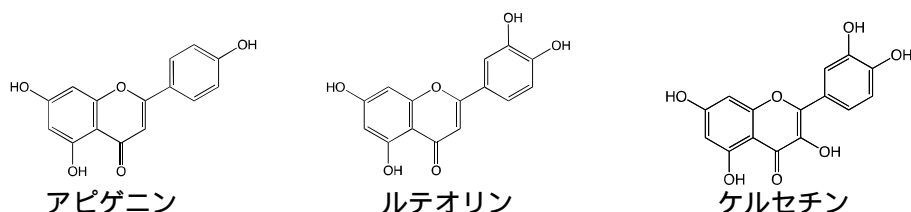


図 1 本研究で用いたアピゲニン、ルテオリン、およびケルセチンの構造

その結果、アピゲニン及びルテオリンのアグリコンと O-配糖体いずれを投与した場合でも、リンパ液を脱抱合処理することでアグリコンが検出されたことから、アピゲニンとルテオリンはケルセチンと同様に抱合体としてリンパ液中へと輸送されることが示された。またケルセチンと同様にカテコール構造を有するルテオリンでは、標準物質であるジオスメチン (4'-メチルルテオリン) のピークと推定されるピークが検出された。

アピゲニンにおいては、アグリコンと 7-O-グルコシド (A7G) を比較すると、A7G はアグリコンの 4.5 倍程度リンパ液および末梢血漿における濃度が高く、配糖体の方が吸収性が高いことが示された。一方、リンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は約 1:10 となり、アグリコンと A7G に違いは見られなかった。一方、ルテオリンではアピゲニンと異なり、アグリコンと 7-O-グルコシド (L7G) で吸収性に大きな違いは見られなかった。また、リンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は、アグリコンと A7G で同程度の約 1:3 となり、ルテオリンはアピゲニンよりもリンパ系へと輸送されやすいことが示唆された。

さらに、ケルセチン-3,4'-O-ジグルコシド (Q3,4'diG)、ルテオリン-3',7'-ジグルコシド (L3',7'diG) という単糖グルコースが 2 箇所結合した配糖体についても同様の投与実験を行ったところ、モノグルコシド配糖体と同様に小腸から吸収され、代謝物がリンパ液中へも出現することを確認した。リンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は Q3,4'diG では約 1:5、L3',7'diG では約 1:4 となり、アグリコン投与時よりはリンパ系輸送の割合がやや低いものの、ほぼ同様な輸送経路の分配が起こることが示唆された。

また小腸粘膜酵素により分解されない C-配糖体の場合、アグリコンの抱合体は出現しないが、低濃度ながらも C-配糖体のままリンパ液に輸送され数時間検出され続けることが見出された。

一般的にリンパ系輸送は、脂溶性が高く食事の油脂と共存してカイロミクロンに組み込まれる成分の吸収経路として利用される。そこで疎水性の指標である LogP 値を求めたところ、アグリコンにおいてはフラボンであるアピゲニンとルテオリンが近似しており、ケルセチンはこれらより疎水性が低かった。前述の通り、先行研究においてはリンパ系に輸送されたケルセチンはカイロミクロンと共存してはいなかったことから、フラボノイドのリンパ系輸送は摂取したアグリコン分子の疎水性の強さと相関はしないことが示唆された。

表1 ケルセチン、アピゲニン、ルテオリンの LogP 値とリンパ系輸送割合

フラボノイド アグリコン	LogP	輸送比 (リンパ/血漿)	フラボノイド 配糖体	LogP	輸送比 (リンパ/血漿)
アピゲニン	3.2	1/10	A7G	1.1	1/10
ルテオリン	3.2	1/3	L7G	0.60	1/3
ケルセチン	1.8	1/4	Q3G	0.76	1/4

二糖類であるルチノースが結合したルチン(ケルセチン-3-O-ルチノシド)は、小腸では吸収されず、大腸から吸収される。本研究で用いた胸管リンパカニューレーションラットを用いた実験においても、アグリコン投与時よりも血中濃度上昇が遅れることが確認できている。この時のリンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は約 1:10 であり、小腸での吸収時よりもリンパ系への輸送割合は大きく減少した。本研究ではアピゲニンの配糖体であるアピニン(アピゲニン-7-O-アピオグルコシド)の吸収性を調べたところ、ルチンと同様に大腸からの吸収を示すパターンを示した。さらに、リンパ液中濃度と末梢血漿濃度との比は約 1:20 であり、アグリコン投与時よりもリンパ系への輸送割合が減少する点でも共通点が見られた。

以上のことから、フラボノイドのリンパ系輸送は小腸で吸収されるフラボノイドにおいて起こりやすいこと、リンパ系へと輸送されやすいフラボノイドの構造としてはケルセチンとルテオリンのようにフラボノイドの B 環にカテコール構造を有することが考えられた。

なお、フラボノイド以外のポリフェノールについてもリンパ系輸送について検討したところ、ある種の桂皮酸誘導体においても一部がリンパ液へと輸送されることを見出した。小腸で吸収されるポリフェノールのリンパ系輸送が普遍的な現象である可能性が示されたことから、今後はフラボノイドに限らず様々なポリフェノールの吸収経路について検討していきたい。

2) フラボノイドのリンパ系輸送の生理的意義の検討

リンパ系へ輸送されたフラボノイドが関与し得るフラボノイドの生理機能や作用機序の 1 つとして、リンパ系への余剰体液や老廃物の流入を促進し「むくみ」を改善することが挙げられる。そこでリンパ系輸送されたフラボノイドの機能性を検討するため、はじめにリンパ管内皮細胞における炎症時の応答に対する抑制効果を検討した。マウスリンパ管内皮細胞 SVEC4 を TNF- α で刺激した時に誘導される炎症応答遺伝子の発現変動を、ケルセチンやその他のフラボノイドが抑制することが示唆された。この結果から、ケルセチンが血管内皮細胞だけでなく、リンパ管内皮細胞に対しても作用することが明らかになった。またフラボノイドの基本骨格の違いにより、遺伝子発現変動への影響に差異が見られた。しかし、リンパ液中に存在するケルセチンの抱合代謝物の 1 つであるケルセチン-3-グルクロニド(Q3GA)では、ケルセチンアグリコンと同レベルの抑制効果は確認できなかった。先行研究において、炎症部位において Q3GA は脱抱合酵素である β -グルクロニダーゼの作用によりアグリコンへ変換されて活性が増強される可能性が報告されている(Kawai *et al.* 2008 他)ことを考慮すると、リンパ管においても同様の活性化機構が働く可能性がある。

吸収されたフラボノイドがリンパ系に至る経路には腸間膜リンパ節(MLN)が存在する(図 2A)。樹状細胞(DC)の活性化をケルセチンが抑制するという報告があることをふまえ、リンパに輸送されるフラボノイドの生理作用として、MLN での免疫応答における抗原提示に影響を与える可能性を検討した。ケルセチンあるいはアピゲニンを *in vitro* で分化誘導したマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に添加し、LPS 有無の条件下で培養した。ケルセチン添加では非添加と比較して成熟 DC の出現頻度が有意に低下した。一方、成熟 DC 中の活性化 DC 割合には有意な違いはみられなかった。アピゲニン添加においても、LPS 存在下ではケルセチン添加と同様の効果がみられた。以上のことから、ケルセチンとアピゲニンは骨髄細胞から成熟 DC への分化を抑制することが示唆された。さらに、代謝物である Q3GA では DC の活性化抑制作用を示したことから、小腸で吸収されリンパ液へと輸送されるケルセチン抱合体は MLN の免疫応答を抑

制する可能性がある。

そこで、ケルセチンによる MLN への影響を *in vivo* で検討した。ラットあるいはマウスに標準食、ケルセチン添加食、ルチン添加食のいずれかを 2 週間自由摂取させた。その結果、ルチンはケルセチンよりも高分子量のため、同じ 0.1% 添加食を摂取しても、ルチン添加食群のケルセチン総摂取量はケルセチン添加食の 6 割程度であった。しかし、血漿中ケルセチン代謝物濃度は、ルチン添加食群に比べてケルセチン添加食群で 10 倍以上高くなり、小腸で効率的に摂取されたことが示唆された。また、MLN を採取し、免疫応答の組織学的指標である胚中心 (GC) 形成 (図 2C) を解析したところ、ケルセチン添加食群では、標準食群、ルチン添加食群に比べて GC 形成の減少傾向がみられた (表 2)。

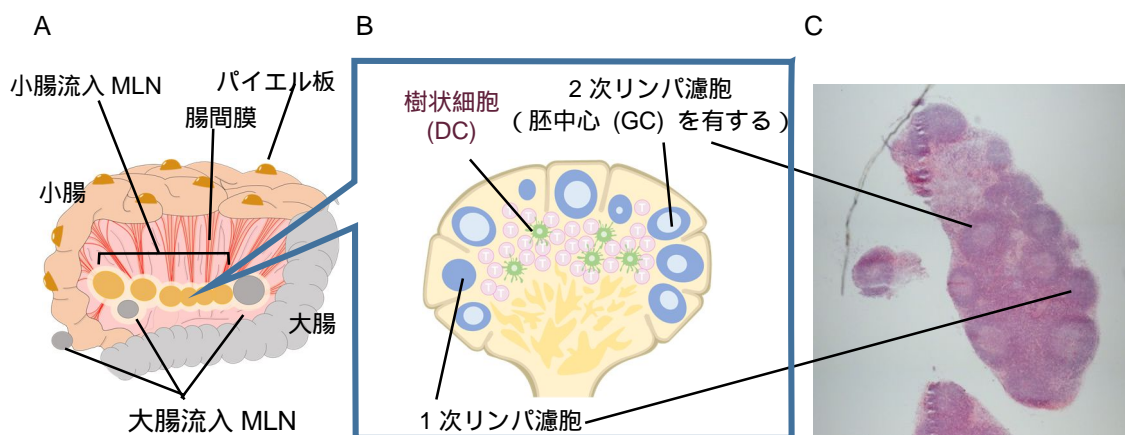


図 2 腸間膜リンパ節 (MLN) と胚中心

A: 腹腔における MLN の配置 (模式図)、B: MLN (拡大図)、C: ラット MLN の H&E 染色

表 2 ラット小腸腸間膜リンパ節 (MLN) における二次リンパ濾胞形成割合

(n=4)	ケルセチン摂取量 (mmol/2-wk)	血中総ケルセチン 濃度 (μM)	GC 形成 (%)
標準食群	—	—	50
ケルセチン添加食群	0.68	10.2	36
ルチン添加食群	0.38	0.81	72

これらのことから、食事由来ケルセチン代謝物は MLN における免疫応答を抑制的に調節することが示唆され、その作用は吸収経路に依存する可能性が考えられた。ケルセチンは摂取後小腸で吸収された後に生じる代謝物の一部が門脈だけでなくリンパ系にも輸送されるのに対し、ルチンは腸内細菌による糖鎖加水分解を経た後に大腸から吸収され、ケルセチン代謝物のリンパ系輸送効率がケルセチン投与時よりも低いことと関連していることが推察された。

以上のように、本研究においては、フラボノイドのリンパ系輸送と化学構造の関係の一端を明らかにするとともに、リンパ系へフラボノイド代謝物が流入することには何らかの生理的役割があることを示唆することができた。今後ケルセチン以外のフラボノイドやその他のポリフェノールについても研究を進め、腸管免疫とポリフェノールの関係についてリンパ系輸送との関連をさらに明らかにしていきたい。

<参考文献>

- Murota K, Terao J. (2005) Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. **FEBS Lett.** 579(24):5343-6.
- Murota K et al. (2013) Influence of fatty acid patterns on the intestinal absorption pathway of quercetin in thoracic lymph duct-cannulated rats. **Br. J. Nutr.** 109(12):2147-53.
- Nakamura T et al. (2018) Lymphatic metabolites of quercetin after intestinal administration of quercetin-3-glucoside and its aglycone in rats. **Arch. Biochem. Biophys.** 645:126-136.
- Kawai Y et al. (2008) Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. **J. Biol. Chem.** 283(14):9424-34.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳 利咲、四之宮紗菜、室田 佳恵子、早坂 晴子
2. 発表標題 フラボノイド代謝物による腸間膜リンパ節の免疫応答抑制
3. 学会等名 第28回日本フードファクター学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳利咲、四之宮紗菜、室田佳恵子、早坂晴子
2. 発表標題 腸間膜リンパ節内免疫応答に対するフラボノイド代謝物の影響
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山家雅之、谷 央子、室田佳恵子
2. 発表標題 ブラジル産グリーンプロポリス由来経皮酸誘導体の門脈系 / リンパ系輸送比の検証と代謝物の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 室田佳恵子、四之宮紗菜、柳利咲、早坂晴子
2. 発表標題 吸収経路の異なるケルセチン関連化合物の摂取が腸間膜リンパ節の免疫応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川本実佳, 室田佳恵子
2. 発表標題 アピゲニンとルテオリンの腸管吸収性におけるアグリコンと配糖体の比較
3. 学会等名 第27回 日本フードファクター学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本実佳, 室田佳恵子
2. 発表標題 フラボノイドのリンパ輸送性に対する基本骨格の影響
3. 学会等名 第 55 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mika Kawamoto, Kaeko Murota
2. 発表標題 Comparison of intestinal absorption profiles of various apigenin glycosides in rats
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (22nd IUNS-ICN) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本実佳, 室田佳恵子
2. 発表標題 フラボンの腸管吸収性に対する基本骨格と糖鎖構造の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川本実佳、室田佳恵子
2. 発表標題 糖鎖構造の異なるアピゲニン配糖体の腸管吸収性の比較
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川本実佳、室田佳恵子
2. 発表標題 ラットを用いた多様なアピゲニン配糖体の腸管吸収性比較
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本実佳、室田佳恵子
2. 発表標題 アピゲニンアグリコンおよび配糖体の腸管吸収における輸送経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 下位 香代子、寺尾 純二、越阪部 奈緒美、榊原 啓之、中村 宜督、室田 佳恵子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 224
3. 書名 ポリフェノールの科学：基礎化学から健康機能まで	

〔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	高橋 信之 (Nobuyuki Takahashi) (50370135)	東京農業大学・応用生物科学部・教授 (32658)	
研究分担者	早坂 晴子 (Haruko Hayasaka) (70379246)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	
研究分担者	中村 俊之 (Toshiyuki Nakamura) (90706988)	岡山大学・環境生命自然科学学域・准教授 (15301)	

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