

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：23603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K02391

研究課題名（和文）望ましい脂質摂取バランスのあり方の探究～胆石モデルマウスを用いた検討～

研究課題名（英文）Exploring the desirable balance of lipid intake - a study using a mouse model of gallstones.

研究代表者

横山 英子（杉山英子）（Yokoyama, Eiko）

長野県立大学・健康発達学部・教授

研究者番号：40242680

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）：4群のうち、血清及び肝臓のコレステロール量は、野生型、PPAR<sup>-/-</sup>欠損マウスのコレステロール食投与群では有意に増加し、特に、PPAR<sup>-/-</sup>欠損マウスのコレステロール投与群では、血清で約2倍、肝臓で約4倍に増加していることがわかった。スフィンゴ脂質のガングリオシドGM2とスフィンゴミエリンについて、PPAR<sup>-/-</sup>欠損マウスのコレステロール食投与群だけに、他群には見られないTLC上で移動度の低いバンドが観察された。GM2の質量分析結果から、PPAR<sup>-/-</sup>欠損マウスのコレステロール食投与群の分子イオンは、m/z1497付近に検出されたが、他の3群のマウスからのGM2の分子イオンはm/z1455付近に検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的条件とは異なるが、脂質代謝の主要制御因子とされる遺伝子を欠損したマウスに、食事中的コレステロールを多く負荷したことにより、肝臓へのコレステロール蓄積が見られ、胆石症を発症した。このマウスの肝臓の脂質を分析した結果、一見すると、コレステロール代謝とは無関係に見える糖脂質の代謝に、遺伝子欠損とコレステロール負荷に伴う差を認めた。このことが、胆石症の発症要因と関わるのか、疾病の結果なのかはわからないものの、食事や薬剤で特定の代謝に負荷をかけることは、予想もしない代謝経路に影響を及ぼすことが起こりうることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Of the four groups, serum and liver cholesterol levels were found to be significantly increased in wild-type and PPAR<sup>-/-</sup> mice on a cholesterol diet, particularly in PPAR<sup>-/-</sup> mice on a cholesterol diet, with a two-fold increase in serum and a four-fold increase in liver. For the sphingolipids ganglioside GM2 and sphingomyelin, we found that only in the cholesterol diet-treated group of PPAR<sup>-/-</sup> mice, a band with low mobility appeared on TLC, which was not found in the other groups. [M-H]<sup>-</sup> from the cholesterol diet group was detected at around m/z 1497, while [M-H]<sup>-</sup> of GM2 from the other three groups of mice was detected at around m/z 1455, showing a difference of 42.

研究分野：食生活学

キーワード：コレステロール摂取 核内受容体 マウス 肝臓 ガングリオシドGM2 リン脂質 トリグリセリド 質量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過剰なコレステロール摂取は、胆石の原因になるとされている。申請者は、6ヶ月間高コレステロール食を投与することで、PPAR 欠損マウスに、ほぼ100%の確率で胆石が発症し、肝臓の炎症や肝臓への脂質の蓄積、肝肥大等ヒトの病態と似た症状を呈することを見出した。動脈硬化性の病変は認められなかった。PPAR と同類の転写調節たんぱくを欠損させた2種類のマウスに、同様に高コレステロール食を投与した先行研究があるが、上記の3つの症状が揃ってはいない。したがって、PPAR 欠損マウスには、独自の分子機構があると考えられ、その分子機構を解明することで、ヒトにおいても、食事からの脂質摂取の上で、何に気をつけるべきかがわかってくるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、モデルマウスの肝臓を主な標的として、胆石発症機構を明らかにし、食事からの脂質摂取について考察することを目的とした。その目的を達成するために、

- (1) 標的とした肝臓の脂質分析によって、トリグリセリド、リン脂質、コレステロール、糖脂質の組成や量比において、コレステロール負荷との間に相関関係があるかどうかを調べること
- (2) コレステロール負荷に伴い、コレステロール代謝やトリグリセリド代謝に変化が生じているかどうかを調べること
- (3) 最終的に、代謝に関連する分子の挙動を整理し、脂質摂取との関係を解析することを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) **動物**：PPAR 欠損マウスを用いた動物実験は、信州大学医学部代謝制御学教室の青山俊文教授との共同研究として実施した。SV/129 遺伝的背景を持つ雄の野生型マウスおよび PPAR 欠損マウス (12-16 週齢、体重 24-30g) を用いた (1)。解剖時に、血液、胆汁は採取し、速やかに解析に供してある。本研究では肝臓についての解析を実施した。

(2) **食事と処置**：野生型マウスおよび PPAR 欠損マウスを 2 群 (コントロール群およびコレステロール食投与群) に分け (合計 4 群) コレステロール飼料は、AIN-93 (オリエンタル酵母工業、東京、日本) にコレステロール 1.5% (w/w) およびコラーゲンナトリウム 0.15% を添加したものをを用いた。

(3) **生化学的分析**：血清および肝臓の総脂質量の定量には、Folch の方法 (2) に従って抽出した試料を用いた。血清および肝コレステロールは、コレステロール E-テストワコーキット (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を用いて測定した。肝臓のトリグリセリドは、トリグリセリド G-テストワコーキット (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いた。

(4) **肝臓の複合脂質組成の分析**：リン脂質および糖脂質の解析のために、肝臓からクロロホルム：メタノール 1:1 (v/v) で抽出した後、DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーにより、中性脂質と酸性脂質とに分画した。主なリン脂質が存在する中性脂質画分を Rouser らの方法で定量した (3)。また糖脂質のガングリオシドについては、シアル酸を測定することで定量した。それぞれの画分において、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって 4 群に差があるかどうかを検討し、差のある脂質についてさらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化型質量分析法 (MALDI-TOF MS) を実施した (4)。TLC のために用いた展開溶媒は、次の溶媒系である。リン

脂質解析用 1 次元 TLC : クロロホルム : メタノール : 水 ( 65 : 25 : 4 )、2 次元 TLC : 1 次元目クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水(65:35:5)、2 次元目クロロホルム : アセトン : メタノール : 酢酸 : 水(10:4:2:2:1)、ガングリオシド解析用 1 次元 TLC : クロロホルム : メタノール : 0.2%塩化カルシウム ( 60 : 35 : 8 )

#### 4 . 研究成果

(1)血清および肝臓のコレステロール量 : 血清、肝臓ともに、野生型、PPAR 欠損マウスのコレステロール投与群で有意に増加していたことは当初の予想通りであった。PPAR 欠損マウスのコレステロール投与群では、血清で約 2 倍、肝臓で約 4 倍に増加しており、肝臓における顕著な増加は予想以上であった。

(2)肝臓のトリグリセリド量 : 肝臓トリグリセリド量は、野生型マウスのコレステロール投与群で約 5 倍程度と有意に高かったが、PPAR 欠損マウスにおいては、コレステロール負荷の影響は見られなかったことは予想外であった。今後、コレステロールやトリグリセリド代謝を考える上で興味深い。

(3)肝臓の複合脂質分析 : 肝臓の総リン脂質量は、コレステロール負荷した群ではコントロール群に比べて低い傾向であった。2 次元 TLC の結果、主なリン脂質はホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンであった。糖脂質については、1 次元 TLC の結果、中性脂質画分にはオルシノール陽性の目ぼしいスポットは存在せず、酸性脂質画分にガングリオシド GM2 に相当するバンドを確認した。4 群のうち、PPAR 欠損マウスにコレステロール食を負荷した群において、スフィンゴミエリンとガングリオシド GM2 と思われるバンドに他と違って移動度の低いバンドが出現している現象を見出した。スフィンゴ脂質に差が認められたことは予想外であり、コレステロール研究に携わる者には、この点に着目する者はほとんどいないと思われる。

(4)GM2 ガングリオシドの MALDI-TOF MS 分析 : PPAR 欠損マウスにコレステロール食を負荷した群における移動度の低いバンドの出現が何によるものかを特定するために、調製 TLC を行い、GM2 に相当する脂質を単離して、MALDI-TOF MS を実施した。その結果、ガングリオシド GM2 のシアル酸は N-グリコリル型であることを確認でき、 $m/z$  1455 付近と  $m/z$  1497 付近に  $[M-H]^-$  が検出された ( 図 1 )。図 1 に示すように、PPAR 欠損マウスにコレステロール食を投与した群においては、 $[M-H]^-$  が 42 大きい位置に検出された。これが移動度の低いバンドの出現と関連があると考えられた。今後、スフィンゴミエリンについても同様の解析をしていくつもりである。

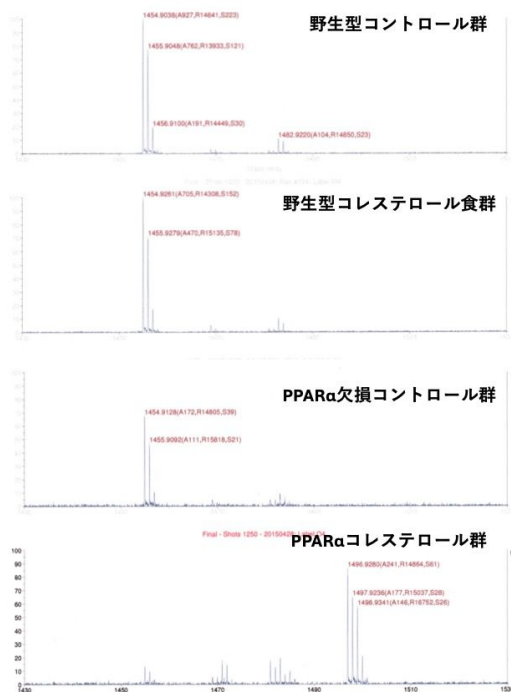


図1 マウス肝臓GM2のMALDI-TOFMS スペクトル

(5)脂肪酸の GC-MS 分析 :  $m/z$  42 はメチル基 3 つ分に相当する。この差はおそらく GM2 のセラミド部分、脂肪酸が長鎖塩基に起因するのではないかと考えられたので、まず脂肪酸の GC MS 分析を実施した。その結果、脂肪酸の組成は、C16:0 パルミチン酸、C18:0 ステアリン酸が主成

分で、他に、C14:0 ミリスチン酸、C18:1 オレイン酸、C22:0 ペヘン酸、C24:0 リグノセリン酸が検出されたが、4群の間の差は見出せなかった。残る可能性は、セラミドを構成する長鎖塩基である。今後、長鎖塩基の分析を GC-MS あるいは、脂肪酸を除いたリゾスフィンゴ脂質という形に調製して MALDI-TOF MS 分析(5)をするかどちらかの方法で解析していく予定である。スフィンゴ脂質のセラミド構造が疾患と関連して変化するという知見は散見される(6)ため、この発見は胆石症につながるコレステロール代謝の変化と密接に関連している可能性があり、ひいては、食事からの望ましい脂質摂取のあり方に関する知見を得られると期待している。

#### <引用文献>

- (1) Lee, S.S., et al. 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15: 3012-3022.
- (2) Folch J et al. 1951. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191:833-841.
- (3) Rouser G et al. 1966. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1:85-86.
- (4) Sugiyama E et al. 1997. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction to ganglioside analyses. *Glycobiology* 7:719-724.
- (5) Sugiyama E et al. 1999. A quantitative analysis of serum sulfatide by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction. *Anal Biochem* 274:90-97.
- (6) Watanabe T et al. 2022. The urinary bladder is rich in glycosphingolipids composed of phytoceramides. *J Lipid Res* 63:100303

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------