

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11582

研究課題名（和文）臓器連環を介したメタボリックシンドローム発症抑制における腸管の寄与

研究課題名（英文）Contribution of the intestinal tract to the alleviation of metabolic syndrome with organ crosstalk

研究代表者

城内 文吾（SHIROUCHI, Bungo）

長崎県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：00548018

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体内での臓器連環を介して抗MetS作用を発揮する食品因子のメカニズム解析において、腸管の寄与を調べた。ホスファチジルコリン（PC）摂取により有用菌 *Akkermansia muciniphila* の占有率が高値となることを明らかとし、このことがPCの抗MetS作用の発現に關与する可能性を示した。また、他のコリン化合物と比較して、PC摂取は動脈硬化症の危険因子TMAOの血中濃度に影響を与えないことも見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルコリン（PC）には脂質代謝改善などの生理機能が報告されてきたが、近年PCとして摂取したコリンの一部が腸内細菌代謝を介して、生体内にて動脈硬化症の危険因子TMAOの産生に繋がることが報告された。PC摂取に本当にそのリスクがあるのか、コリン化合物の全てに血中TMAO濃度上昇のリスクがあるのか不明であった。そこで、PCを含む複数のコリン化合物を等モルで摂取させる実験を行ったところ、血漿TMAO濃度はグリセロホスホコリンや塩化コリンの摂取で上昇するのに対し、PC摂取は変動させなかった。また、PC摂取により有用菌の占有率増加を認め、コリン摂取形態としてPCの有用性を明確に示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the contribution of the intestinal tract in the mechanism analysis of food factors that exert anti-metabolic syndrome effects through organ linkage in vivo. Our results suggested that the beneficial effects of dietary phosphatidylcholine (PC) are partly attributable to the resulting increase in the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* in the gut microbiota. In addition, our study clearly demonstrated that dietary PC did not affect plasma levels of TMAO, a risk factor, whereas dietary glycerophosphocholine and choline chloride significantly increased them.

研究分野：栄養化学、栄養生化学

キーワード：腸管 メタボリックシンドローム 臓器連環

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MetS) は内臓脂肪蓄積を中心病態とする動脈硬化性疾患 (脳梗塞や心筋梗塞) の危険因子 (血中脂質異常、血圧高値、高血糖) が重複した状態である。実験動物を用いた *in vivo* 実験により、MetS の発症予防・改善に資する食品因子の探索が行われ、数多くの化合物が見出されてきた。脂質代謝および糖質代謝の中心臓器・組織である肝臓、膵臓、脂肪組織および筋肉がメカニズム解析の対象となり、MetS の病態発症の理解に大きな成果を挙げた。しかしながら、先行研究の多くはアウトカムが得られた時点の解析であり、見出されたメカニズムがいつまでも「原因なのか、結果なのか」を完全に分離できないことが問題である。したがって、食品因子による抗 MetS 作用メカニズムを考える上で、未病状態での代謝変動、遺伝子発現変動を解析する必要がある。また、メカニズムに関与すると考えられる遺伝子発現の変動が、食品因子自身 (直接的) あるいはそれらの代謝物等 (間接的) が対象の臓器・組織に到達し引き起こされたのかも十分に理解されていない。

腸管は摂取した栄養素、機能性成分ならびに薬品成分の吸収輸送を司り、吸収した化合物の物理化学的特性に合わせた輸送経路として門脈系 (水溶性物質) とリンパ系 (脂溶性物質) をもつ。また、リンパ系が発達した腸管は生体における最大の免疫器官であり、常に食品成分や細菌抗原の刺激を受けており、過剰な免疫応答を起こさないよう制御している。このように腸管は外界の情報を生体内に伝達する重要な役割を担っているにも関わらず、生体内での臓器連環を介して抗 MetS 作用を発現する食品因子のメカニズム解析において腸管の寄与度を調べた研究は見受けられない。

2. 研究の目的

本研究では、食品因子による抗 MetS 作用のメカニズム解明において未病状態にある実験動物の臓器連環を詳細に解析し、臓器連環における腸管の役割を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

抗 MetS 作用を発揮する食品因子の中で、両親媒性分子であり門脈系とリンパ系の両方で輸送されるグリセロリン脂質の一つである PC に注目し、PC の腸管消化産物であるグリセロホスホコリン (GPC)、塩化コリン (Choline chloride) の 3 種類のコリン化合物を等モルで摂取させる実験を行った。具体的には、正常モデルである SD 系ラットに高スクロース食 (肥満・脂質異常症などを誘導) あるいは高スクロース・コリン化合物含有食を給餌して、食餌誘発性病態の未病状態 (病態発症前あるいは軽度の病態発症状態) で解剖し、得られた生体サンプル中の親水性低分子代謝物、コリン代謝物、腸内細菌叢解析を行い、得られた多変量データを統計手法に供し、未病状態 (病態発症前あるいは軽度の病態発症状態) での代謝変動をピックアップすることを目指した。なお、本動物実験は長崎県立大学動物実験委員会による動物実験計画書の審査と長崎県立大学学長の承認 (承認番号 R02-10) を得て実施した。

4. 研究成果

実験食 (対照食および 3 種類のコリン含有食) 4 週間摂取後の終体重、摂食量、肝臓およびヒラメ筋の重量、血漿脂質濃度および血糖値に差は認められなかった (表 1)。精巣周囲白色脂肪組織重量は Control 群に比べ、Choline chloride 群で有意に低下し、腎臓周囲白色脂肪組織は Control 群に比べ、GPC 群で有意に低下した (表 1)。肝臓総リン脂質量は Control 群に比べ GPC および Choline chloride 群で有意に減少した (表 1)。

ビタミン様物質であるコリンは、神経伝達物質の合成、細胞膜のシグナル伝達、脂質輸送およびメチル基供与など生体において広範な生理機能に関与する栄養素の 1 つである。コリン供給の主

表 1. ラットの形態学および血漿生化学的パラメータに及ぼすコリン化合物摂取の影響

	Control	PC	GPC	Choline chloride
Initial body weight (g)	203 ± 5	206 ± 2	206 ± 2	205 ± 4
Final body weight (g)	420 ± 10	432 ± 4	422 ± 10	428 ± 7
Food intake (g/day)	24.4 ± 0.6	24.2 ± 0.4	24.5 ± 0.1	24.2 ± 0.5
Organ weights (g per 100 g of body weight)				
Liver	4.15 ± 0.17	4.41 ± 0.10	4.15 ± 0.27	4.23 ± 0.12
Soleus muscle	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.06	1.07 ± 0.03	1.01 ± 0.03
White adipose tissue (WAT) weights (g per 100 g of body weight)				
Epididymal	1.75 ± 0.10 ^a	1.56 ± 0.05 ^{ab}	1.45 ± 0.09 ^{ab}	1.40 ± 0.07 ^b
Perirenal	2.26 ± 0.17 ^a	1.69 ± 0.15 ^{ab}	1.52 ± 0.21 ^b	1.77 ± 0.19 ^{ab}
Mesenteric	1.32 ± 0.12	1.19 ± 0.06	1.09 ± 0.08	1.05 ± 0.10
Abdominal*	5.33 ± 0.36	4.44 ± 0.19	4.07 ± 0.35	4.21 ± 0.34
Plasma levels				
TG (mg/dL)	189 ± 36	227 ± 27	164 ± 44	211 ± 50
NEFA (mmol/L)	0.404 ± 0.032	0.384 ± 0.019	0.363 ± 0.053	0.388 ± 0.020
Total cholesterol (mg/dL)	77.3 ± 7.9	76.3 ± 7.0	93.5 ± 10.0	76.9 ± 3.4
PL (mg/dL)	138 ± 30	104 ± 11	149 ± 24	117 ± 18
Glucose (mg/dL)	259 ± 32	232 ± 9	237 ± 15	241 ± 13
Liver PL contents (mg per whole liver)				
	476 ± 33 ^a	409 ± 20 ^{ab}	358 ± 18 ^b	378 ± 13 ^b

*Abdominal WAT weights were calculated by adding the weights of epididymal, perirenal, and mesenteric WAT. Values are expressed as means ± standard error of the mean. Different superscript letters show significant differences at $P < 0.05$, as determined using Tukey-Kramer test.

な形態はPCであり、PCの栄養生理機能として脂質代謝異常改善を介した抗動脈硬化作用が報告されてきた。近年、摂取したコリンの一部が腸内細菌代謝によりトリメチルアミン（TMA）に変換され、宿主の体内に吸収後、肝臓にてフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）にトリメチルアミン-N-オキシド（TMAO）へと代謝され、このTMAOの血中濃度上昇が動脈硬化症の危険因子となることが報告された（Wang Z et al. *Nature* 472, 57–63, 2011）。この報告を受け、PC摂取自体が有害であるかのような論調が散見されるようになってきている。しかしながら、PCとして摂取したコリンは遊離型コリンよりもTMAへ変換されにくい（PCの大部分が小腸で吸収される）という報告（Smolders L et al. *Nutrients* 11, 2758, 2019）もあり、動脈硬化症というアウトカムに対するPC摂取の影響は両義的な状態にあった。また、摂取するコリン化合物の全てに血中TMAO濃度上昇をもたらすリスクがあるのかも明確となっていなかった。そこで、LC-MS/MSを用いて血漿TMAO濃度を測定したところ、血漿TMAO濃度はControl群と比較して、GPCおよびCholine chloride群で有意に高値を示し、PC摂取は変動させなかった（図1）。すなわち、血漿TMAO濃度に及ぼす影響はコリン含有化合物間で異なることを明らかとした。この結果は、先行研究報告「PCとして摂取したコリンは遊離型コリンよりもTMAへ変換されにくい」を支持するものであった。

FMOは食品由来および医薬品由来などの窒素、硫黄およびリン化合物の酸化反応を触媒し、第相薬物酸化酵素の1つとして知られている。ヒトにおいて、FMOは5つのアイソフォームが認められており、ヒト肝臓においてFMO3が主要なアイソフォームであり、その代表的な基質はTMAであることに加え（Shimizu M. *Yakugaku Zasshi* 129, 1351–1356, 2009）、ラット肝臓ではFMO3だけでなくFMO1も発現していることが報告されている（Novick RM et al. *Pharmacol Exp Ther* 329, 1148–1155, 2009）。そこで、本研究では肝臓におけるFmo1およびFmo3のmRNAレベルを評価したが、いずれも4群間で有意な差は認められなかった（図2）。Shimizuの報告では、ヒト肝臓におけるFMO3タンパク質発現量とmRNAレベルとの間には正の相関関係が認められることから、ラット肝臓における挙動も同様であることが推察された。以上を鑑みると、血漿TMAO濃度の変動はその基質であるTMA量に依存、すなわち腸内細菌叢の変動に起因していることが示唆された。

次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによりラット糞便中の腸内細菌叢の測定を行い、得られた各腸内細菌の占有率と血漿TMAO濃度との相関関係を算出したところ、血漿TMAO濃度と有意な負の相関が認められたのは*Anaerotruncus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Dialister*, *Clostridium XIVa*, *Granulicatella*の6つの菌、有意な正の相関が認められたのは*Coprobacter*であった（次頁図3）。

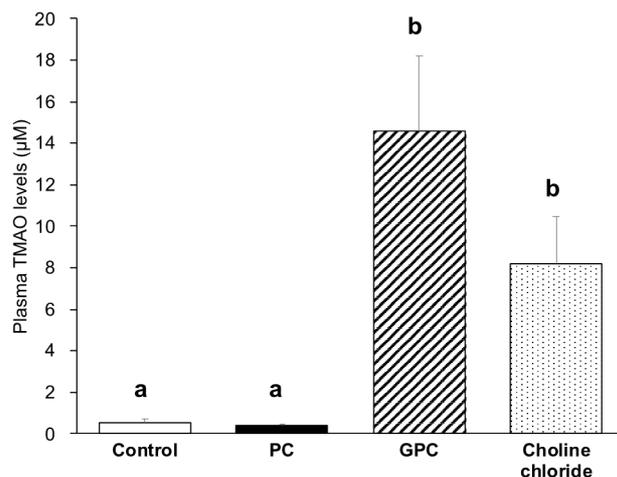


図1. 血漿TMAO濃度に及ぼすコリン化合物摂取の影響

Different letters show significant difference at $P < 0.001$, as determined using Tukey-Kramer test.

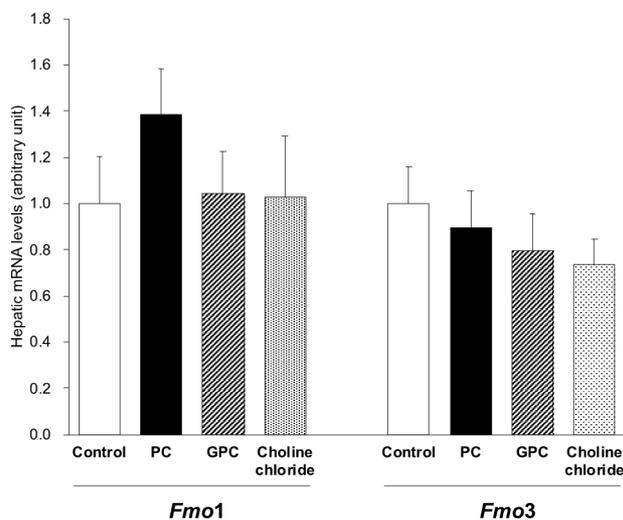


図2. 肝臓Fmo1, Fmo3 mRNAレベルに及ぼすコリン化合物摂取の影響

相関関係が認められた 7 つの菌の血漿 TMAO 濃度の変動における影響度合いを比較するため、重回帰分析を行ったところ、*Anaerotruncus*、*Coprobacter* の 2 つが投入された良好な重回帰式が得られた (data not shown)。米国には、既に血中 TMAO 濃度を動脈硬化症のバイオマーカーとして測定しているクリニックがあり、その血中濃度が $6.2 \mu\text{M}$ 未満において動脈硬化症の低リスクとしている。そこで、このカットオフ値 ($6.2 \mu\text{M}$) を用いて、4 つの群を Low TMAO 群 (Control および PC 群) と High TMAO 群 (GPC および Choline chloride 群) に再定義し、Genes レベルの菌叢組成比 (占有率) を用いた直交部分最小二乗判別分析 (OPLS-DA) に供したところ、明確に 2 つに分かれ、その判別には重回帰分析での結果同様、*Anaerotruncus* および *Coprobacter* が寄与していた。これらの結果より、血漿 TMAO 濃度の変動は *Anaerotruncus* および *Coprobacter* の占有率の影響を強く受けることが示唆された (図 4)。

Akkermansia の占有率は GPC 群と比べ、PC 群で高値を示した (図 5)。先行研究において糞便中の *Akkermansia muciphila* が減少するマウスに対し、*Akkermansia muciphila* を経口投与することで動脈硬化病変が有意に低下することが明らかにされている (Li J, et al. *Circulation* 133, 2434–2446, 2016)。PC の栄養生理機能として報告されている脂質異常症の改善作用および動脈硬化の発症リスク低減には、PC 摂取による *Akkermansia* の占有率の増加が関与している可能性が示された。

本研究より、PC 摂取による有用腸内細菌 *Akkermansia* の占有率増加が抗 MetS 作用の発現に寄与する可能性を示し、腸管の重要性を改めて提示した。また、コリンの生物学的利用能・栄養生理機能発現を考える上で、コリンの摂取形態は重要であること、すなわち水溶性コリン (グリセロホスホコリンおよび塩化コリン) 摂取がもたらすリスクと脂溶性コリン (PC) 摂取の有用性を示した。

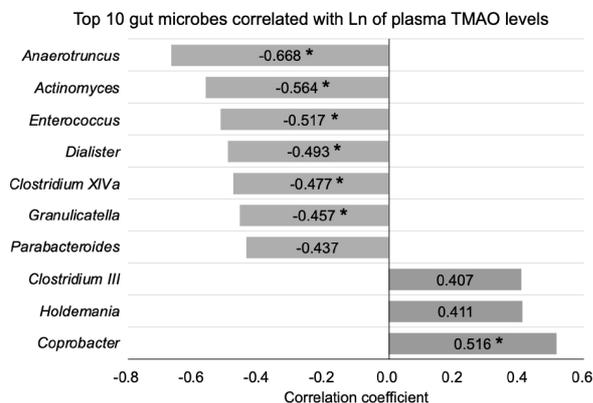


図3. 血漿TMAO濃度と各腸内細菌の占有率との関係

Asterisk shows significant difference at $P < 0.05$, as determined using Spearman correlation coefficients.

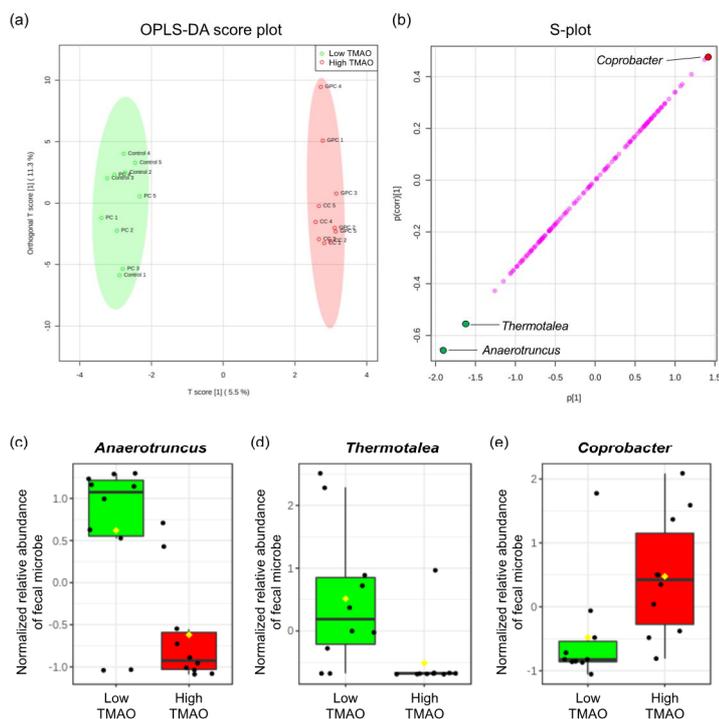


図4. Low TMAO群とHigh TMAO群のOPLS-DA結果

(a) OPLS-DA score plot, (b) its corresponding S-plot, (c-e) characteristic gut microbes that can discriminate between the Low and High TMAO groups.

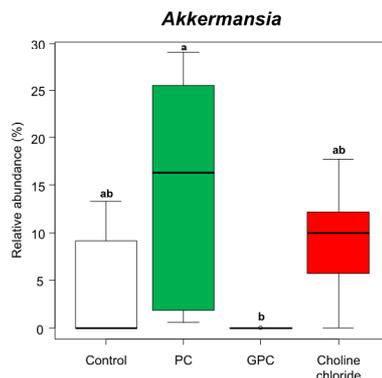


図5. GPCと比較し、PC摂取により占有率が有意に増加した*Akkermansia*

Different letters show significant difference at $P < 0.05$, as determined using Steel-Dwass test.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shirouchi Bungo, Fukuda Ayano, Akasaka Taiki	4. 巻 12
2. 論文標題 Unlike Glycerophosphocholine or Choline Chloride, Dietary Phosphatidylcholine Does Not Increase Plasma Trimethylamine-N-Oxide Levels in Sprague-Dawley Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 64 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12010064	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋口未菜、城内文吾
2. 発表標題 4-コレステロン摂取が肥満・糖尿病モデルマウスの病態発症に与える影響
3. 学会等名 2022年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城内文吾、福田彩乃、赤坂泰輝
2. 発表標題 コリンの摂取形態と血中TMAO濃度との関係
3. 学会等名 第12回機能油脂懇話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城内文吾
2. 発表標題 グリセロリン脂質の栄養生理機能と安全性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城内文吾、福田彩乃、赤坂泰輝
2. 発表標題 グリセロホスホコリンや塩化コリンとは異なり、ホスファチジルコリン摂取は血漿TMAO濃度を上昇させない
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大坪友樹、武山藍、中山恵理子、城内文吾、田中愛健、佐藤匡央
2. 発表標題 6-Ketocholestanolの腹腔内投与がラットの脂質・糖代謝に与える影響
3. 学会等名 2021年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shirouchi Bungo
2. 発表標題 Absorption of dietary cholesterol oxidation products in rats
3. 学会等名 Blue Foods and Health International Forum (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武山藍、中山 恵理子、加藤綾華、柳本賢一、田中愛健、佐藤匡央、城内文吾
2. 発表標題 魚油の事前乳化はn-3系多価不飽和脂肪酸の吸収速度を高める
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 城内文吾
2. 発表標題 日本人のリン脂質クラスの摂取量
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第29回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 細川雅史、城内文吾、三浦進司、青木淳賢、菅原達也、西向めぐみ	4. 発行年 2020年
2. 出版社 建帛社	5. 総ページ数 152
3. 書名 生体におけるリン脂質の性状と機能性	

1. 著者名 三浦進司、進藤英雄、青木淳賢、妹尾奈波、井上菜穂子、城内文吾	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 102
3. 書名 アグリバイオ2021年2月号 リン脂質の新たな代謝機構	

〔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
---------	---------