

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380075

研究課題名（和文）生体内への脂質取込を制御する腸管上皮組織の脂質代謝メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of intestinal lipid metabolism involved in the regulation for dietary lipid uptake.

## 研究代表者

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50370135

研究成果の概要（和文）：これまで空腹時高脂血症が動脈硬化性疾患のリスク因子として重要であると考えられてきたが、近年、食後高脂血症の方が動脈硬化性疾患発症とより密接に関連していることが示され、食後高脂血症を予防・改善することが重要であると考えられている。しかし、これまでに小腸上皮細胞における脂肪酸酸化活性が食後高脂血症にどのような影響を及ぼすか検討されてこなかった。そこで本研究では、小腸上皮細胞での脂肪酸酸化活性を変化させる内因性・外因性因子の食後高脂血症に対する作用を検討した。その結果、内因性因子としてレプチンが、外因性因子として PPAR- $\alpha$  活性化剤であるベザフィブレートが、小腸上皮細胞での脂肪酸酸化を亢進させることで食後高脂血症を改善することが明らかとなった。さらに PPAR- $\alpha$  を活性化する作用を有する DHA にも同様に食後高脂血症を改善する作用があることが明らかとなった。以上のことから、小腸上皮組織における脂肪酸酸化活性は、生体内への脂質輸送量を決定する上で重要であり、食品成分により食後高脂血症を改善することが可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Recently, postprandial serum lipid levels have been found to correlate more closely to cardiovascular diseases than fasting levels. However, the effect of fatty acid oxidation levels in intestinal epithelial cells on postprandial lipidemia has not been clarified. In this study, the effects of endogenous and exogenous factors involved in the regulation of lipid metabolism on postprandial lipidemia were examined. As a result, leptin (an endogenous factor) and bezafibrate, a potent PPAR- $\alpha$  agonist, (an exogenous one) suppressed postprandial lipidemia through enhancing fatty acid oxidation in intestinal epithelial cells. Particularly, the effects of PPAR- $\alpha$  activation were observed under obese and diabetic conditions as well as physiological conditions. Moreover, DHA, a food-derived factor activating PPAR- $\alpha$ , also suppressed postprandial lipidemia through the same mechanism of bezafibrate. These results suggest that the fatty acid oxidation in intestinal epithelial cells is an important factor determining dietary lipid uptake.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：食品機能、メタボリックシンドローム、腸管上皮細胞、脂肪酸酸化、脂質異常症

### 1. 研究開始当初の背景

我々は日々摂取する食品から様々な栄養素を体内に吸収している。その体内への栄養素の吸収は、食品成分に直接、さらされる腸管上皮組織において行われる。吸収上皮細胞とも呼ばれる腸管上皮細胞は、微絨毛による表面積の拡大など、栄養素の吸収を効率よく行うための機能に特化している。この腸管上皮組織での栄養素吸収は生体内の糖質・脂質代謝により制御される可能性が示唆されており、事実、生体内代謝に応じて分泌される各種ホルモンなどにより、腸管上皮組織での栄養素吸収や代謝が調節されている。さらに腸管上皮組織は、常に感染の危険にさらされているため、様々な免疫系細胞が腸管上皮組織に存在し、サイトカインなどを介して腸管上皮細胞の機能が変化することが明らかにされている。以上のことから、腸管上皮組織は、生体内のエネルギーバランスなどに応じて、必要とされる栄養素を効率よく吸収するために、様々な制御を受けていると考えられ、機能性食品などの開発の観点からも、こうした腸管上皮組織機能の制御機構の解明は重要である。

### 2. 研究の目的

腸管上皮組織における管腔側からリンパ管への脂質輸送は血中脂質量を決定する重要な過程である。この脂質輸送を抑えることが出来れば、メタボリックシンドローム発症に深く関与している食後高脂血症を効果的に抑制可能と考えられる。腸管上皮組織での脂質輸送は、腸管上皮細胞内の利用可能な脂質量に依存していると考えられており、そのため、腸管上皮細胞内での脂質代謝を亢進させることで脂質輸送を抑えることができる可能性がある。そこで、腸管上皮細胞での脂質代謝が脂質輸送にどのような作用を及ぼすかを検討するとともに、を亢進させる内因性因子（ホルモンなど）や外因性因子（食品由来成分など）の腸管上皮組織での脂質輸送に対する影響を、培養細胞系ならびに遺伝子改変マウスなどを用いて明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

腸管上皮組織での脂質代謝を亢進させる因子として、内因性のものと外因性のものの2つを検討する。内因性因子としては、脂肪

組織から分泌されるアディポネクチン及びレプチンを、外因性因子としてはペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（PPAR）を活性化作用を持つ食品由来成分を検討する。実験方法は、ヒト腸管上皮細胞モデルとして広く用いられている Caco-2 細胞をトランスウェルシステムで培養した細胞レベルの実験系を使って、管腔側から基底膜側へ輸送される脂質量を指標として、各因子の作用を検討する。また動物レベルの実験系として、肥満・糖尿病モデルマウスや新たに作製する、内因性・外因性因子受容体を腸管上皮組織特異的にノックアウトしたマウスを使い、腸管に脂質を投与した際のリンパ管へ輸送される脂質量を指標として、内因性・外因性因子の脂質輸送に対する作用を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 内因性因子による食後高脂血症の改善

まず内因性因子として脂肪細胞から分泌され、中枢神経系では食欲抑制作用を、抹消組織では脂肪酸酸化亢進作用を有するレプチンに着目し、食後高脂血症に対する作用を検討した。

Caco-2 細胞にレプチンを添加し、基底膜側への脂質輸送量ならびにキロミクロン構成タンパク質である ApoB の定量を行ったところ、レプチン添加によって有意に抑制された。このとき、Caco-2 細胞における脂肪酸酸化を放射性同位体ラベルされたパルミチン酸の分解（二酸化炭素産生）で定量すると、レプチン添加によって有意に上昇していた。さらに動物個体レベルでのレプチンの作用を検討するため、レプチン欠損 ob/ob マウスにおけるオリーブオイル経口投与後の血中脂質量を経時的に測定すると、レプチン欠損によりオリーブオイル経口投与後の血中脂質量が有意に上昇した。以上のことから、レプチンは、内因性因子として、小腸上皮細胞での脂肪酸酸化を亢進させ、食後高脂血症を抑える作用を有することが示唆された（論文投稿準備中）。

#### (2) 外因性因子による食後高脂血症の改善

##### ①PPAR $\alpha$ 活性化の作用（生理的条件下）

肝臓や骨格筋において脂肪酸酸化の亢進をもたらす PPAR $\alpha$  活性化が食後高脂血症に対して影響を及ぼしうるかどうかが検討するため、PPAR $\alpha$  合成アゴニストであるベザフィブレートに Caco-2 細胞に添加し、基底膜側

への脂質輸送量を定量したところ、ベザフィブレート添加によって有意に抑制された。同様に ApoB タンパク質分泌量も有意に抑制された。このとき、PPAR $\alpha$ の標的遺伝子である脂肪酸酸化関連遺伝子 (ACS、AOX、CPT1A) の mRNA 発現レベルは有意に上昇し、放射性同位体ラベルのパルミチン酸の酸化も同様に上昇した。これらの結果は、PPAR $\alpha$ 活性化により小腸上皮細胞における脂肪酸酸化が亢進され、食後高脂血症が改善される可能性を示唆するものである。

そこで次に PPAR $\alpha$ 活性化の食後高脂血症改善作用が動物レベルでも認められるかどうか検討するため、C57/BL マウスに1週間、高脂肪食条件下で投与し、オリーブオイル経口投与後の血中脂質量を定量した。その結果、ベザフィブレート投与により、オリーブオイル経口投与後の血中脂質量上昇が有意に抑制された。このとき、小腸上皮組織における脂肪酸酸化関連遺伝子の mRNA 発現レベル、ならびに脂肪酸酸化活性は、いずれも有意に上昇していた。血中の脂質量は、小腸上皮からの食事性脂質の輸送と肝臓などの末梢組織への取り込みによって増減するため、末梢組織への取り込みをリポプロテインリパーゼ (LPL) 阻害剤を用いて阻害し、血中の脂質量の変動が小腸上皮からの食事性脂質の輸送のみに影響を受ける条件下で検討したところ、ベザフィブレート投与により、オリーブオイル経口投与後の血中脂質量上昇が抑制された。以上のことから、小腸上皮細胞における PPAR $\alpha$ 活性化は、脂肪酸酸化を亢進させることで血中への食事性脂質の輸送を阻害し、食後高脂血症を改善することが示唆された。以上の結果は論文として報告済みである (Kimura et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 410, 1-6)。

さらにこのベザフィブレート投与の食後高脂血症改善作用において PPAR $\alpha$ の直接的関与を示すため、PPAR $\alpha$ ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行ったところ、PPAR $\alpha$ ノックアウトマウスでは、ベザフィブレート投与による食後高脂血症の改善が観察されなかった。同様に小腸上皮組織における脂肪酸酸化関連遺伝子の誘導ならびに脂肪酸酸化活性についても、ベザフィブレート投与により変化しなかった。したがって、ベザフィブレート投与による食後高脂血症の改善は、小腸上皮細胞における PPAR $\alpha$ の活性が必要であることが示された。

## ②PPAR $\alpha$ 活性化の作用 (肥満・糖尿病条件下)

肥満や糖尿病といった病態下では、末梢組織における脂質代謝が変化することが知られている。そこで、ベザフィブレート投与による食後高脂血症の改善が、肥満・糖尿病条件下においても観察されるか検討するた

め、肥満・糖尿病モデル KK-Ay マウスにベザフィブレートを1週間、高脂肪食条件下で投与し、オリーブオイル経口投与後の血中脂質量の変動を調べた。その結果、肥満症および糖尿病を発症しているマウスにおいても、生理的条件下の場合と同様に、ベザフィブレート投与により、食後高脂血症が改善されることが示された。またこのとき、小腸上部と下部を比較したところ、PPAR $\alpha$ 標的遺伝子である脂肪酸酸化関連遺伝子の発現上昇および小腸上皮細胞の脂肪酸酸化活性の亢進は、小腸上部のみで起こることも明らかとした。以上の結果は、論文として報告済みである (Kimura et al., *Obes. Res. Clin. Pract.* 2013, in press)。

## (3) 食品成分による食後高脂血症の改善

これまで観察された PPAR $\alpha$ 活性化による食後高脂血症の改善作用は、PPAR $\alpha$ を強力に活性化する薬剤を用いていた。そこで、一般的に薬剤よりも PPAR $\alpha$ 活性化能が弱い食品由来成分によっても同様の食後高脂血症改善作用が認められるか検討した。まず Caco-2 細胞を用いて、PPAR $\alpha$ 活性化能を有することが明らかとなっている、様々な食品成分について、小腸上皮細胞内での PPAR $\alpha$ 活性化能を評価したところ、ドコサヘキサエン酸 (DHA) に強い活性が認められた。そこで DHA を用いて食品成分による食後高脂血症改善作用を検討することとした。

ベザフィブレート投与の実験と同様に、C57/BL マウスに高脂肪食条件下で1週間、DHA を摂取させると、小腸上皮細胞での脂肪酸酸化関連遺伝子の mRNA 発現レベルならびに小腸上皮組織の脂肪酸酸化活性が上昇した。この条件下でオリーブオイルを経口投与し、その後の血中脂質量を定量すると、DHA 摂取群において、血中脂質量上昇が有意に抑制された。以上の結果は、ベザフィブレートなどの薬剤だけでなく、PPAR $\alpha$ を活性化することができる食品成分によっても、小腸上皮組織における脂肪酸酸化亢進を介して、食後高脂血症が改善することを示唆している (論文投稿中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

以下の論文はすべて査読有

①Kimura R, Takahashi N, Goto T, Murota K, Kawada T. Activation of PPAR-alpha in intestinal epithelial cells improves postprandial hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay mice. *Obes. Res. Clin. Pract.*

2013, in press.  
DOI: 10.1016/j.orcp.2013.05.005

② Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in lumen and leads to death from malnutrition. *Gastroenterol.* 2013, 144, 369-380  
DOI: 10.1053/j.gastro.2012.10.035.

③ Goto T, Teraminami A, Lee JY, Hirai S, Uemura T, Kim YI, Takahashi N, Kawada T. Activation of PPAR-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J. Lipid Res.*, 2011, 52, 873-884  
DOI: 10.1194/jlr.M011320.

④ Kimura R, Takahashi N, Murota K, Yamada Y, Kanzaki N, Murakami Y, Goto T, Kawada T. Activation of PPAR-alpha suppresses postprandial lipidemia through fatty acid oxidation in enterocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 410, 1-6  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.057.

[学会発表] (計3件)

①木村梨乃、高橋信之、河田照雄、「小腸上皮組織における脂肪酸酸化が、食後高脂血症の予防・改善に及ぼす影響」2012.10.12、日本肥満学会、京都府京都市

②新谷紗織、高橋信之、木村梨乃、室田佳恵子、山田優子、森山達哉、後藤剛、河田照雄、「小腸上皮組織における PPAR $\alpha$  活性化を介した食後高脂血症の抑制」2011.10.15、日本栄養・食糧学会近畿支部大会、奈良市

③Kimura R, Murota K, Takahashi N, Kawada T. Up-regulation of fatty acid oxidation decreases triacylglycerol secretion in intestinal epithelial cells. 2010.07.13, ICO2010, stockholm, Sweden

[図書] (計1件)

①後藤剛、李周容、高橋信之、河田照雄、「メタボリックシンドローム発症基盤としての脂肪細胞機能異常：脂肪細胞のライフサイクルとその制御因子」メタボリックシンドローム—基礎・臨床の最新知見— 第2版、日本臨牀 2011、201-205

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：50370135

### (2) 研究分担者

河田 照雄 (KAWADA TERUO)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10177701