

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780138

研究課題名（和文） リンパ管脂質輸送制御因子の探索と

メタボリックシンドローム予防への展開

研究課題名（英文） Research for lymphatic lipid transport regulatory genes and  
the development of the prevention of metabolic syndrome

研究代表者

城内 文吾（SHIROUCHI BUNGO）

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00548018

研究成果の概要（和文）：半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いてリンパ流量や脂質輸送量に影響を与える物質を探索し、リンパ管脂質輸送制御因子の特定を試みた。コレステロール吸収阻害剤がエステル型コレステロール及び $\beta$ -epoxycholesterolのリンパ輸送量を低下させること、また水溶性食物繊維のグアーガム、Liver X receptor リガンドの TO901317（TO）がリンパ流量及び脂質輸送量を低下させることを明らかとした。グアーガムと TO を摂食させたラットのリンパ管の DNA マイクロアレイ解析により、4 遺伝子がリンパ脂質輸送低下に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We tried to explore substances affecting lymph flow and lymphatic lipid transport in thoracic lymph duct-cannulated rats and then to identify lymphatic lipid transport regulatory-related genes in the thoracic lymph duct. As the results, we found that ezetimibe, a cholesterol absorption inhibitor, reduces lymphatic transport of esterified-cholesterol and  $\beta$ -epoxycholesterol and that guar gum and TO901317, a synthetic ligand of liver X receptor (LXR), reduces lymph flow and lymphatic lipid transport. Using a DNA microarray technique, we explored lymphatic lipid transport regulatory-related genes in the thoracic lymph duct of guar gum- or TO901317-fed rats. As the results, we identified 4 candidate genes for lymphatic lipid transport in the thoracic lymph duct.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：脂質輸送、リンパ流量、リンパ管、半永久胸管リンパカニューレーション法

## 1. 研究開始当初の背景

食事脂肪の吸収・輸送のメカニズムはトリアシルグリセロール、コレステロール及びリン脂質に大別され、腸管腔側と小腸細胞内の輸送タンパク質をターゲットとした研究が進められ、成果を挙げてきた。しかし、小腸細胞からの脂質輸送がリンパ管のシグナルによって制御されるという知見は見受けられない。本研究では半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いて

リンパ流量及び脂質輸送量に影響を与える食品成分、薬品成分を探索後、集合リンパ管のトランスクリプトーム解析を介して選抜物質によるリンパ管脂質輸送制御機構の解明を試み、メタボリックシンドローム予防におけるその制御機構利用の可能性を探る。

## 2. 研究の目的

(1) リンパ流量及び脂質輸送に影響を与え

る物質の探索：半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いてリンパ流量、脂質輸送量を変動させる食品成分、薬品成分を探索する。

(2) (1) で見出した物質を与えたラットの胸管リンパ管を摘出し、DNA マイクロアレイ解析によりリンパ管脂質輸送制御遺伝子を明らかとする。

### 3. 研究の方法

(1) 半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いたリンパ流量及び脂質輸送量を変動させる物質の探索

#### ①-1 食餌脂質のリンパ輸送に及ぼすコレステロール吸収阻害剤 Ezetimibe の影響

食餌組成：AIN-76 組成に準じラード 10% を添加した食餌を Basal diet とし、meal-feeding 期間及び回復期間の Control 群に与えた。Basal diet に Ezetimibe を 5 mg/kg body weight・day となるように添加した食餌

(Basal+Ezetimibe diet) を回復期間の Ezetimibe 群に与えた。また、リンパ液回収時に用いた Control diet は AIN-76 組成に準じラード 10%、コレステロール 0.2% を添加したものをを用いた。Ezetimibe 群には Control diet に Ezetimibe を 5 mg/kg body weight・day となるように添加した食餌 (Ezetimibe diet) を与えた。

半永久胸管リンパカニューレーション法：7 週齢雄 Sprague-Dawley (SD) ラットを用い、室温 21~23°C、12 時間のライトサイクルで飼育した。給餌方法は meal-feeding 法を用い、朝夕 (10:00~、16:00~) それぞれ 1 時間の計 2 時間摂食させ、自由飲水とした。Basal diet で 1 週間飼育後に、半永久胸管リンパカニューレーション手術を施し、術後は飲水として 139 mM グルコースおよび 85 mM 塩化ナトリウムを含む等張水溶液を与えた。回復期間を手術後 2 日間設け、Basal diet あるいは Basal+Ezetimibe diet を meal-feeding させ、術後 3 日目に Control diet あるいは Ezetimibe diet を 30 分間摂食させた。摂食前に 20 分間、摂食開始から 1 時間ずつ計 7 時間リンパ液を回収した。リンパ回収後、ラットはソムノペンチル麻酔後、腹部大動脈採血により屠殺を行った。回収したリンパ液は 4°C で over night 静置した後、フィブリンを除去し、酵素法により総コレステロール (Total chol)、遊離型コレステロール (Free chol)、トリアシルグリセロール (TAG) およびリン脂質 (PL) 量を測定した。エステル型コレステロール

(Esterified chol) は、Total chol と Free chol の値より算出した。なお、値の計算法については、摂食前に回収したリンパ液中の脂質を 1 時間あたりに換算した値を 0 時間の値とし、

摂食開始から 1 時間までの脂質量を 1 時間目の値とした。以下、同様に 7 時間目まで計算した。

#### ①-2 食餌酸化コレステロール (OC) のリンパ輸送に及ぼす Ezetimibe の影響

食餌組成：meal-feeding 期間及び回復期間までの食餌は①-1 と同様のものを用いた。リンパ液回収時に用いた OC diet (OC 群) は AIN 組成に準じラード 10%、OC 0.075% を添加したものをを用いた。OC+Ezetimibe 群には OC diet に Ezetimibe を 5 mg/kg body weight・day となるように添加した食餌を与えた。なお、OC はコレステロールを 150°C で 12 時間加熱し、熱エタノールで抽出後、アセトンで溶出溶媒としたシリカゲルのオープンクロマトグラフィーによって分取した。得られた OC の組成は GC により分析した。

半永久胸管リンパカニューレーション法：①-1 と同様の方法及びスケジュールで実施し、リンパ液を回収した。OC 分析は SPB-1 fused silica capillary column を接続した GC-MS (EI 法) を用いて行い、既知の OC 分子種から得られた特徴的なフラグメントイオンを選択する SIM (選択的イオン検出) 法で定量した。得られた結果より、見かけの OC 吸収率を算出した。

#### ②食餌脂質のリンパ輸送に及ぼすグアーガムの影響

食餌組成：AIN 組成に準じた食餌を Control diet とし、Control diet 中の Cellulose 5% を Guar gum で置換した Guar gum diet とした。Control 群には実験期間中の Control diet を与えた。一方、Guar gum 群には meal-feeding 期間及び回復期間中は Control diet を、リンパ回収時には Guar gum diet を与えた。

半永久胸管リンパカニューレーション法：①-1 と同様の方法及びスケジュールで実施し、酵素法により各脂質量を測定した。

また *in vitro* 試験により、Guar gum と Cellulose の抱水能、膨潤度および粘度を測定し、比較を行った。

(2) リンパ流量及び脂質輸送量を低下させる物質を摂取させたラットの胸管リンパ管 DNA マイクロアレイ解析

本研究により、Guar gum 摂取がリンパ流量低下を介して脂質輸送量を低下させることを見出した。また申請者所属研究室において、LXR 合成リガンドである TO901317 (TO) 摂取がリンパ流量ならびに脂質輸送量 (TAG、Total chol) を低下させることを報告 (*Lipids* 43:125-131, 2008) しているが、そのメカニズムについては不明であった。そこで、上述の 2 物質を与えたラットの胸管リンパ管の DNA マイクロアレイ解析を行い、リンパ管脂質輸

送制御因子の特定を試みた。AIN 組成に準じオリーブ油 10%、コレステロール 0.2%を添加した食餌を Control diet とし、Control diet に TO を 0.01% 添加した食餌 (TO diet)、Control diet の Cellulose を Guar gum で置換した食餌 (Guar gum diet) を調製した。これらの食餌を 8 週齢雄 SD ラットに 5 日間 meal-feeding 法にて給餌した。6 日目朝の摂食後 3 時間目に屠殺を行い、胸管リンパ管を摘出した。胸管リンパ管 Total RNA より Cyanine3 ラベル化 cRNA を合成後、SurePrint G3 Rat GE (8×60K) Microarray (Agilent Technologies) にハイブリダイスさせ、Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いて蛍光強度を検出、数値化した。

#### 4. 研究成果

(1) 半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いたリンパ流量及び脂質輸送量を変動させる物質の探索

##### ①-1 食餌脂質のリンパ輸送に及ぼすコレステロール吸収阻害剤 Ezetimibe の影響

実験期間中の摂食量に群間で差はなかった。Ezetimibe 摂取は、リンパ流量、リンパ中の TAG、PL 及び Free chol 輸送量に影響を与えなかったが、リンパ中の Total chol 輸送量を有意に低下させ、この低下には Esterified chol 輸送量低下が寄与していた (図 1)。

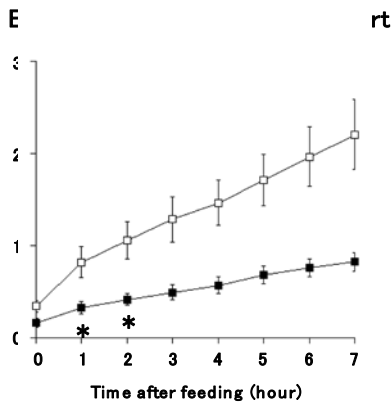


図1 リンパ中のエステル型コレステロール輸送量に及ぼす Ezetimibe の影響

##### ①-2 食餌酸化コレステロール (OC) のリンパ輸送に及ぼす Ezetimibe の影響

実験期間中の摂食量に群間で差はなかった。Ezetimibe 摂取はリンパ流量に影響を与えなかったが、見かけの  $\beta$ -epoxycholesterol 吸収率を有意に低下させた (図 2)。

##### Apparent lymphatic recovery rate of $\beta$ -epoxycholesterol (%)

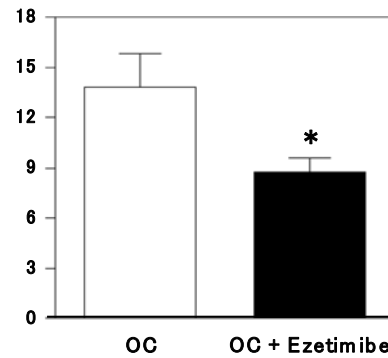


図2 見かけの  $\beta$ -epoxycholesterol 吸収率に及ぼす Ezetimibe の影響

##### ②食餌脂質のリンパ輸送に及ぼすグアーガムの影響

実験期間中の摂食量に群間で差はなかった。Guar gum 摂取はリンパ流量ならびに脂質輸送量 (TAG、Total chol) を低下させた (図 3 Lymph flow, TAG のみ表記)。

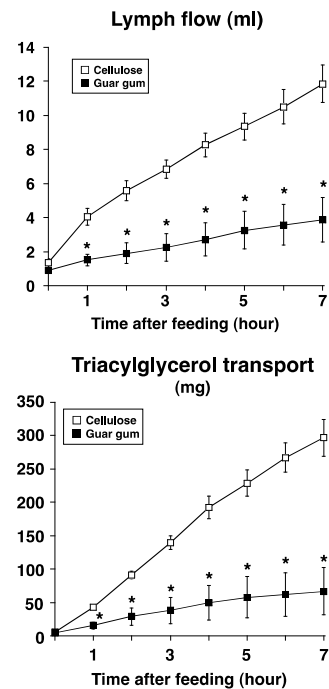


図3 リンパ流量、リンパ中のトリアシルグリセロール輸送量に対する Guar gum の影響

また、Guar gum の抱水能、膨潤度及び粘度は、Cellulose と比較して有意に高い値を示したことから (表 1)、Guar gum は小腸での水の挙動に関連した物理化学的特性によりリンパ流量を低下させ、ひいては脂質輸送を低下させることが示された。

表1 抱水能、膨潤度及び粘度におけるCelluloseとGuar gumの比較

	Cellulose	Guar gum
Water-holding capacity (g wet fiber per g dry fiber)	3.33 ± 0.13	44.5 ± 1.9*
Settling volume in water (ml per g fiber)	3.37 ± 0.03	72.3 ± 4.3*
Viscosity	1.00 ± 0.00	3.33 ± 0.00*

(2) リンパ流量及び脂質輸送量を低下させる物質を摂取させたラットの胸管リンパ管DNAマイクロアレイ解析

Control 群と比較して、Guar gum 摂取により有意に変動した遺伝子は 59 個、TO 摂取により有意に変動した遺伝子は 708 個、グアーガムと TO で共通して有意に変動した遺伝子は 14 個であった。これらの中よりリンパ流量低下に関与する可能性が高い 4 遺伝子を見出した (図 4 論文未発表データ)。

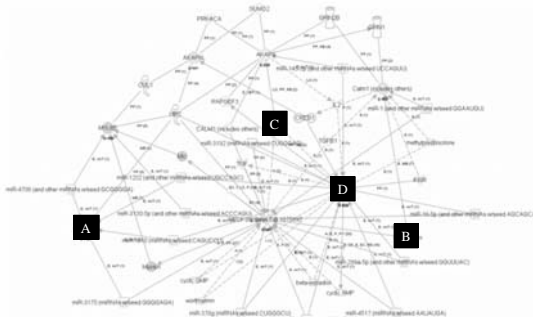


図4 DNAマイクロアレイ解析により、リンパ管脂質輸送低下に4遺伝子関与する可能性が示された

Control 群と比較して、遺伝子 A は TO 群だけでなく、Guar gum 群においても有意に増加していたことから、小腸からの水の流入量低下を受けて変動している可能性が考えられた。また、遺伝子 B、C 及び D は TO 群でのみ有意に変動したことから、TO 群によるリンパ脂質輸送低下にこれら 3 遺伝子が関与する可能性が考えられた。これらをまとめると、リンパ脂質輸送低下に 4 遺伝子 (A~D) が関与する可能性が示された。

小腸からリンパ管への脂質輸送速度の低下は低インスリン時に血液中へ脂質を遅らせて輸送することとなり、インスリンによる脂肪組織への脂肪酸取り込みを遅らせるため、メタボリックシンドローム (MetS) の予防・改善に繋がる。今後、本研究で見出した 4 遺伝子の発現変動と MetS 発症との詳細な関係を調べていく必要がある。

## 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)

①城内文吾, 中村有理, 古川裕美子, 友寄博

子, 今泉勝己, 佐藤匡央. 食事脂質のリンパ輸送に及ぼすコレステロール吸収阻害剤の影響. 脂質生化学研究, 54, 173-175, 2012, 査読無.

② Shirouchi B, Nakamura Y, Furukawa Y, Shiraishi A, Tomoyori H, Imaizumi K, Sato M. Ezetimibe inhibits lymphatic transport of esterified cholesterol but not free cholesterol in thoracic lymph duct-cannulated rats. Cardiovascular Drugs and Therapy. 26, 427-431, 2012, 査読有.

③佐藤匡央, 城内文吾. 酸化コレステロールの生理的意義. オレオサイエンス (Oleosience), 12, 115-123, 2012, 査読有.

④Shirouchi B, Kawamura S, Matsuoka R, Baba S, Nagata K, Shiratake S, Tomoyori H, Imaizumi K, Sato M. Dietary guar gum reduces lymph flow and diminishes lipid transport in thoracic duct-cannulated rats. Lipids, 46, 789-793, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

①城内文吾, 中村有理, 古川裕美子, 友寄博子, 今泉勝己, 佐藤匡央. エゼチミブが食事脂質吸収に及ぼす影響～半永久胸管リンパカニューレーション法による評価. 第 24 回夏期油脂・コレステロール研究会, 2012 年 7 月 21 日, 和歌山.

②古川裕美子, 中村有理, 城内文吾, 佐藤匡央. コレステロール阻害剤がラット生体内の酸化コレステロール蓄積へ与える影響. 第 49 回化学関連支部合同九州大会, 2012 年 6 月 30 日, 北九州.

③城内文吾, 中村有理, 古川裕美子, 友寄博子, 今泉勝己, 佐藤匡央. 食事脂質のリンパ輸送に及ぼすコレステロール吸収阻害剤の影響. 第 54 回日本脂質生化学会, 2012 年 6 月 8 日, 福岡.

④城内文吾, 川村沙也佳, 松岡亮輔, 馬場さなえ, 永田和子, 白武佐和子, 友寄博子, 今泉勝己, 佐藤匡央. グアーガム摂取はリンパ流量低下を介して脂質輸送を低下させる. 第 23 回夏期油脂・コレステロール研究会, 2011 年 7 月 23 日, 北海道.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

城内 文吾 (SHIROUCHI BUNGO)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号: 00548018