

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580169

研究課題名(和文)皮膚バリア機能における機能性リン脂質の役割に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Study of the role of the functional phosphatide in the skin barrier function

研究代表者

西向 めぐみ(NISHIMUKAI, MEGUMI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：40374730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプラスマローゲン(PIs)による皮膚TJバリア機能調節作用の解明とともに、体内PIs量を増加させることによりアトピー性皮膚炎を予防・改善する機能性食品成分を探索することを目的とし、細胞および実験動物を用いて、以下の検討を行なった。
細胞実験において、エタノールアミン型PIsはタイトジャンクションタンパクの結合を強固にした。アトピー性皮膚炎モデルを用いた動物試験において、体内でPIsを増加させる物質の摂取で、症状改善傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of plasmalogens on the skin barrier function in NHEK cells of normal human epidermal keratinocytes and NC/Nga mice of atopic dermatitis model.
PIsEtn enhances the skin barrier function through the assembly and the expression of the TJ proteins in NHEKs. Intake of the food material that increases plasmalogen in body has the improvement effect against the atopic dermatitis in NC/Nga mice.

研究分野：脂質生理学

キーワード：機能性リン脂質 皮膚バリア機能

1. 研究開始当初の背景

プラスマローゲンは、ラジカル感受性が高く、組織局在性（脳や心筋など酸素消費量の多い組織に多い）と合わせて考えると、酸化傷害から細胞を守る役割を持つことが考えられ、動脈硬化症など酸化ストレスが関係する病態の防御因子としての機能が示唆されてきた。我々は、脳や心筋に加え、皮膚にも高濃度のプラスマローゲンが濃縮していること、紫外線に暴露されたラットが、その酸化ストレスに抵抗するために、プラスマローゲン生合成量を高め、皮膚や血液中のプラスマローゲン量を増加させることを明らかにしていた。一方、皮膚は、生体の最も外側に位置し、酸素・紫外線などのストレスに常時曝されている。皮膚の最も重要な機能の1つは、外界と生体内を厳密に区別するバリア機能で、角質層が形成する角質バリアと顆粒層が形成するタイトジャンクション (TJ) バリアがあり、中でも TJ は細胞間経路の物質通過を制御する重要な構造である。

皮膚におけるプラスマローゲンの役割に関する研究は、国内外で全くないが、申請者が見出した成果は、プラスマローゲンの皮膚における新たな役割を強く提案していた。

2. 研究の目的

プラスマローゲンによる皮膚 TJ バリア機能調節作用の解明を目指すとともに、体内プラスマローゲン量を増加させることによりアトピー性皮膚炎を予防・改善する機能性食品成分を探索することを目的とし、本研究では、細胞および実験動物を用いて、以下の検討を行なった。

- (1) モデル細胞系を用い、皮膚バリア機能（タイトジャンクション）へのプラスマローゲンの影響を検討した。
- (2) 体内でプラスマローゲンを増加させる物質であるアルキルリン脂質をアトピー性皮膚炎モデル動物に摂取させ、皮膚バリア機能に対する影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚モデル細胞 (NHEK) を Transwell に播種し、2 日間培養後、プラスマローゲンまたは比較対照として、ジアシル型のコリン型リン脂質（卵由来コリン型リン脂質）を細胞に添加し、4 日間培養した。培養中は、毎日、経上皮電気抵抗値を測定し、4 日目に細胞を回収、TJ タンパク質を測定した。

(2) アトピー性皮膚炎モデル動物 (NC/Nga マウス) を用い、2 通りの方法で血中プラスマローゲンおよび、皮膚 TJ タンパク質の変動を検討した。

SPF の NC/Nga 雄性マウスを用い、アトピー性皮膚炎誘導の有無、オキアミ由来アルキルリン脂質摂取の有無 (AIN93G に準拠した 7% 大豆油食の基本食と 1% アルキルリン脂質食) により群分けした。アトピー性皮膚炎は、

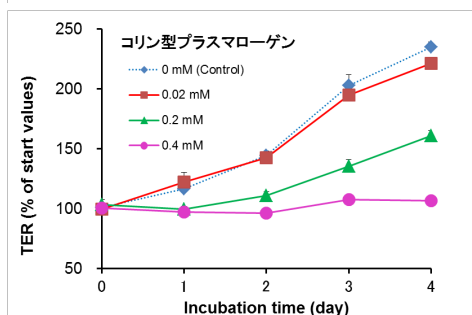
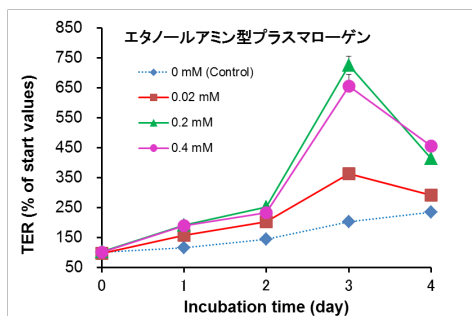
頸背部にダニ抗原を塗布することにより発症させた。1 週間ごとに症状スコアをチェックし、3 週間目に解剖を行い、腹部大動脈血および皮膚を採取した。分析は血中・皮膚中のプラスマローゲン濃度および皮膚の TJ タンパク質を測定した。

アトピー性皮膚炎自然発症 NC/Nga 雄性マウスを用いて検討した。（との違いは、すべての群が皮膚炎を発症している点である。）リン脂質としてオキアミ由来アルキルリン脂質を含む試験食（アルキルリン脂質食）、比較対照としてアルキルリン脂質食と同じ量の DHA とリン脂質を含むように魚油と大豆リン脂質で調整した試験食（魚油食）および基本食 (AIN93G 準拠、7%大豆油食) で 3 週間飼育した。と同様、3 週間目に解剖を行い、サンプルを採取し、分析を行なった。

4. 研究成果

(1) エタノールアミン型プラスマローゲンの添加はリン脂質無添加（コントロール）に対し、濃度依存的に経上皮電気抵抗値 (TER) を上昇させたが、コリン型プラスマローゲンまたはジアシル型のコリン型リン脂質の添加では TER の上昇は見られなく、むしろ低下させていた（下図）。この時の TJ タンパク質をウェスタンブロット法にて測定したところ、エタノールアミン型プラスマローゲンの添加で、ZO-2、Claudin-4 の増加が見られた。また、ZO-2 および Claudin-4 は mRNA レベルも上昇しており、転写レベルでの影響が起きていることが分かった。

これらより、エタノールアミン型プラスマローゲンは TJ タンパクの結合を強固にし、コリンが結合しているリン脂質はむしろ結合を緩めることが分かった。この特徴を利用して、皮膚からの物質の透過を調節できる可能性がある。



(2) アレルギー発症の目安になる血中 IgE レベルは、抗原を塗布した群で有意に高値を示し、発症が確認されたが、症状スコアにはアルキルリン脂質投与の影響は無かった。血中プラスマローゲン濃度は皮膚炎発症で有意に低下した。アルキルリン脂質の摂取で、プラスマローゲン総量は有意ではないものの増加した。この時、sn-2 位にアラキドン酸 (C20:4) が結合した分子種は有意に減少し、オキアミ由来アルキルリン脂質に多く含まれる n-3 系脂肪酸の DHA (C22:6) と EPA (C20:5) が結合した分子種は有意に増加した。一方、皮膚中のプラスマローゲンは、皮膚炎の発症により増加し、アルキルリン脂質の摂取で sn-2 位の脂肪酸はアラキドン酸と n-3 系脂肪酸の比率が入れ替わり、総量としてはアルキルリン脂質の摂取で減少した。皮膚中の TJ タンパク質は、皮膚炎発症で基本食群において Occludin が有意に減少、皮膚炎発症した 2 群ではアルキルリン脂質の摂取で Occludin-1 が増加傾向にあった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kita, K., Ito, R.K., Sugahara, M., Kobayashi, M., Makino, R., Takahashi, N., Nakahara, H., Takahashi, K. and Nishimukai, M. 2015, Effect of in ovo administration of branched-chain amino acids on embryo growth and hatching time of chickens, *Journal of Poultry Science*, 52 : 34-36、[査読有](#)

Nishimukai, M., Maeba, R., Ikuta, A., Asakawa, N., Kamiya, K., Yamada, S., Yokota, T., Sakakibara, M., Tsutsui, H., Sakurai, T., Takahashi, Y., Hui, SP., Chiba, H., Okazaki, T. and Hara, H.、2014, Serum choline plasmalogens-those with oleic acid in sn-2-are biomarkers for coronary artery disease, *Clinica Chimica Acta*, 437 : 147-154、[査読有](#)

Yamazaki, Y., Kondo, K., Maeba, R., Nishimukai, M., Nezu, T. and Hara, H.、2014, The proportion of nervonic acid in serum lipids is associated with serum plasmalogen levels and metabolic syndrome, *Journal of Oleo Science*, 63(5) : 527-537、[査読有](#)

Nishimukai, M., Maeba, R., Yamazaki, Y., Nezu, T., Sakurai, T., Takahashi, Y., Hui, SP., Chiba, H., Okazaki, T. and Hara, H.、2014、Serum choline plasmalogens, particularly those with oleic acid in sn-2, are associated with proatherogenic state *Journal of Lipid Research*, 55 : 956-965、[査読有](#)

Mizuno, Y., Ninomiya, Y., Nakachi, Y.,

Iseki M, Iwasa, H., Akita, M., Tsukui, T., Shimozawa, N., Ito, C., Toshimori, K., Nishimukai, M., Hara, H., Maeba, R., Okazaki, T., Alodaib, A.N., Al Amoudi, M., Jacob, M., Alkuraya, F.S., Horai, Y., Watanabe, M., Motegi, H., Wakana, S., Noda, T., Kurochkin, I.V., Mizuno, Y., Schönbach, C. and Okazaki, Y.、2013、Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility, *PLoS Genetics*, 9(2) : e1003286. doi: 10.1371/journal.pgen. [査読有](#)

〔学会発表〕(計 13 件)

伊藤謙、田口亮、西向めぐみ、横山次郎、喜多一美、飼料へのヨウ素添加がニワトリの血中および鶏卵中の脂質組成へ及ぼす効果、第 17 回ヨウ素学会シンポジウム、2014.9.19、千葉大学(千葉県)

Megumi Nishimukai, Takuya Suzuki, Ethanolamine plasmalogen enhances barrier function in human epidermal keratinocytes, 1st Asian Conference on Oleo Science、2014.9.10、ロイトン札幌(北海道)

原博、山元貴之、西向めぐみ、山崎裕也、小池誠治、腸におけるエーテル型リン脂質の代謝特性 sn - 2 位脂肪酸による特異性、第 26 回油脂・コレステロール研究会、2014.7.19、九州大学(福岡県)

西向めぐみ、食事性リン脂質の吸収 - 機能性リン脂質プラスマローゲンに関して -、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014.5.31、酪農学園大学(北海道)

千葉俊、西向めぐみ、原博、食事中的トランス脂肪酸は小腸においてジアシル型リン脂質の sn-1 位へ大量に組み込まれる、2013 年度第 19 回 Hindgut Club Japan シンポジウム、2013.12.7、専修大学(東京都)

千葉俊、西向めぐみ、原博、食事中的トランス脂肪酸は細胞膜やリポタンパク質中のリン脂質へ大量に組み込まれる、第 11 回日本栄養改善学会北海道支部学術総会、2013.12.1、北海道大学(北海道)

水野由美、二宮裕一、西向めぐみ(他 20 名 11 番目)、Tysnd1 欠損によるペルオキシソーム脂質代謝異常の病態と分子メカニズムの解析、第 86 回生化学会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

西向めぐみ、山崎裕也、小池誠治、前場良太、原博、ラットにおける血漿プラスマローゲン濃度上昇にはアルキル型リン脂質濃縮物摂取が有効である、第 67 回日本栄養・食糧学会、2013.5.25、名古屋大学(愛知県)

千葉俊、西向めぐみ、原博、長期トランス脂肪酸食摂取ラットにおける抗動脈硬化リン脂質プラスマローゲンの変動、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.25、東北大学(宮城県)

西向めぐみ、LC-MS/MS を用いた健常人の血清リン脂質の網羅的解析 - 血清プラスマローゲンの血中バイオマーカーとしての臨床的意義の検討、日本食品科学工学会第 59 回大会、2012.8.30、藤女子大学(北海道)

西向めぐみ、山崎裕也、小池誠治、前場良太、原博、アルキル型リン脂質の腸管吸収とクラス変換、第 54 回日本脂質生化学会、2012.6.8、九州大学(福岡県)

山元貴之、西向めぐみ、山崎裕也、小池誠治、前場良太、原博、トランス脂肪酸はオキアミ由来アルキルリン脂質の吸収とプラスマローゲンへの変換を阻害する、第 66 回日本栄養・食糧学会、2012.5.19、東北大学(宮城県)

西向めぐみ、榊原守、横田卓、山田史郎、櫻井俊宏、高橋祐司、生田知子、古牧宏啓、山木志展、前場良太、千葉仁志、筒井裕之、原博、冠動脈硬化性疾患の病態の把握及び早期診断のための血漿プラスマローゲンの有用性に関する検討、第 66 回日本栄養・食糧学会、2012.5.19、東北大学(宮城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西向 めぐみ (NISHIMUKAI, Megumi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：40374730

(2) 研究分担者

鈴木 卓弥 (SUZUKI, Takuya)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30526695