

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580191

研究課題名(和文)新規機能性脂質の創製と生活習慣病予防作用に関する研究

研究課題名(英文)Finding novel structured-lipids and prevention of life-style related diseases.

研究代表者

柳田 晃良 (YANAGITA, TERUYOSHI)

西九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：00093980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：構造の違いや構成脂肪酸の違いにより、グリセロ脂質の栄養生理機能が変化することが明らかとなってきた。脂肪酸の二重結合をオゾン化した脂質、鎖長・不飽和度の異なるn-3系多価不飽和脂肪酸、n-3系多価不飽和脂肪酸の結合位置を制御した構造脂質、親水性成分の異なる各種リン脂質を、モデル細胞または肥満モデル動物への添加・摂食実験により、栄養生理作用評価を行った。その結果、各種リン脂質や特殊構造脂質に、アディポサイトカイン産生調節を介した炎症抑制作用や脂質代謝異常改善作用が見出された。よって脂質構造異性体の構成成分の変更・付加や結合位置の制御が、病態発症の予防・改善に効果的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The concept of a “structured-lipid” implies modification of the fatty acid composition and/or their location in the glycerol backbone, and improvement of the physical and/or physiological properties of dietary lipids. Our study demonstrated that bioactive lipids (such as ozonized-olive oil and highly-unsaturated long chain fatty acids) or structured lipids (such as n-3 structured lipids, and phospholipids) displays at least two different physiological actions that alleviate obesity-induced diseases: one through the reduction of inflammatory damage by the regulation of in productions of adipocytokines and the other through the regulation of hepatic lipid synthesis. Thus, possible findings on the effects of the form, such as PL, TAG or DAG, used for the administration of bioactive fatty acids, such as ozonated-FAs and n-3 PUFAs, would be of great interest for future study.

研究分野：食品栄養化学

キーワード：脂質構造異性体 高脂血症 脂肪肝 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

長年の生活習慣が原因となって発症する生活習慣病（高脂血症、動脈硬化、糖尿病、高血圧）は日本を含め先進国における死亡原因の半数以上を占め、人口の高齢化が急速に加速する中であって、今や医学領域のみならず社会経済的にも最も重要な課題となっている。この生活習慣病の原因ならびに発生病理に関しては、過食・運動不足などの生活習慣を基盤とした肥満、特に内臓脂肪の蓄積による発症危険度の増加が最も重要視されている。その発症予防としては、日常摂取する食事への機能性成分の導入が最も有効であると考えられているが、中でも、食事脂肪の量や質が大きな影響を及ぼすことが知られている。近年、ジグリセリド (DG)・トリグリセリド (TG)・リン脂質 (PL) といった脂質構造の違いや、それらの構成脂肪酸の構造の違いにより、栄養生理機能が大きく異なることが明らかとなってきた。例えば、DG は TG に比べて、グリセロール骨格に結合した脂肪酸の数が一つ少ない脂質であるが、摂取した脂質エネルギー量が同一条件に於いても、腸管からの吸収に影響を及ぼすことにより体脂肪低下作用を示すことが報告されている。また PL は、生体膜の主要な構成成分でもあり、脂質代謝の中心的な役割を示す肝臓の機能に TG とは異なった生理作用を示すことが明らかとなってきた。その他にも炭素鎖中の二重結合配置が共役型にシフトした共役脂肪酸は、抗癌作用、抗動脈硬化作用および抗肥満作用などが報告されているが、共役二重結合の数・位置・幾何配置の違いによっても生理活性が異なることが分かってきた。これらの脂質分子種や脂肪酸異性体は、天然に存在する動植物油・海産物・植物種子から見出されている。これらのことから、脂質構造の違いや構成脂肪酸の構造異性体の組み合わせによって、新規の栄養生理機能を持つ機能性脂質（脂質構造異性体）が存在するのではないかとこの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究は脂質構造異性体を様々な天然資源中から検索し、それらの生活習慣病予防・改善機能について総合的解析を行うことを目的とする。我々はこれまでも、TG と DG、TG と PL といった分子種の違いが栄養生理機能に及ぼす影響や、脂肪酸の構造異性体による生活習慣病の改善について報告を行ってきた。しかしながら、脂質構造異性体の検索とそれらによる生活習慣病発症の予防と改善についての総合的な研究は見受けられない。本研究は、生活習慣病の発症に関する分子・細胞生物学的な知見を踏まえた上で、効率的な機能性食品素材の検索と利用を行うとするものである。

3. 研究の方法

具体的には、培養細胞（脂肪細胞モデル

3T3L1、肝臓細胞モデル HepG2 など）を用いた個体からスケールダウンした形式における機能性構造脂質異性体のスクリーニングと病態モデル動物（OLETF ラット、Zucker ラット、db/db マウスなど）における各生活習慣病発症時の遺伝子発現プロファイリングや食環境の相互作用の解析などにより効率的に有用な知見を得る。

4. 研究成果

まず、機能性構造脂質の疎水性成分である脂肪酸の機能性改変や新規機能性の発見を試みた。

先の研究により、脂肪酸の二重結合をオゾン化させたオゾン化脂質が肥満モデルラットにおいて抗炎症作用などの生理活性を発揮することが示唆されてきたことから、生体内の糖・脂質代謝に及ぼす影響についてさらなる検討を行った。オゾン化脂質摂取に対する動物種による応答性の違いおよび健康な動物に対する影響に関して、オゾン化オリーブ油を正常モデル C57BL/6J マウスおよび肥満モデル db/db マウスに摂取させ、安全性と栄養生理作用について追加検討を行った。その結果、オゾン化脂質摂取は、正常マウスに対して顕著な影響を引き起こさず、安全性が示唆された（図 1）。

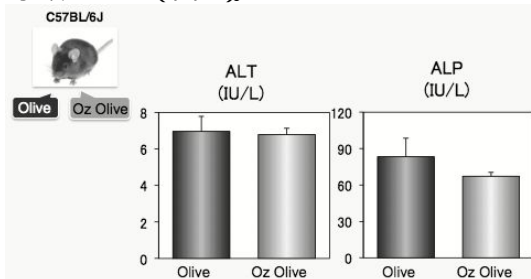


図 1 オゾン化オリーブ油が通常マウスの肝機能マーカーレベルに及ぼす影響

また肥満マウスにおいては、肝肥大・脂肪肝・肝障害・高インスリン血症を改善することが示され、その作用機序の一端として肝臓における脂肪酸合成系および炎症性因子の遺伝子発現抑制が示唆された（図 2）。今後、より詳細な作用機序解明のために、生体におけるオゾン化脂質の吸収動態および体内分布等の検討が望まれる

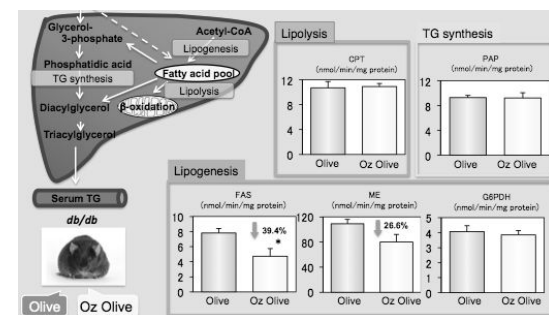


図 2 オゾン化オリーブ油が肥満マウスの肝臓内脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響

次に、ヒト肝臓モデル HepG2 細胞を用い、各種極長鎖 n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が細胞内新規脂質合成に及ぼす影響について検討を行った。オレイン酸前培養により上昇した細胞内脂質合成が、各種極長鎖 n-3 系 PUFA 添加により有意に抑制されることが確認され、炭素数と不飽和度の程度に比例して作用が強いことが示された (表 1)。

表 1 極長鎖 n-3 系 PUFA が HepG2 細胞内新規脂質合成に及ぼす影響

	LA 18:2n-6	EPA 20:5n-3	DPA 22:5n-3	DHA 22:6n-3	THA 24:6n-3
	([¹⁴ C]cpm x 10 ⁻⁷ /mg protein)				
Phospholipids	82.0 ± 4.6	63.7 ± 4.6	66.8 ± 6.4	73.7 ± 8.0	84.3 ± 20.8
Diacylglycerol	1.27 ± 0.04	1.24 ± 0.12	1.54 ± 0.25	2.95 ± 1.52	3.55 ± 1.74
Free cholesterol	98.2 ± 3.9	91.3 ± 3.7	92.0 ± 7.9	99.7 ± 6.5	80.3 ± 6.5
Free fatty acid	5.05 ± 0.51	4.49 ± 0.58	4.26 ± 0.58	4.19 ± 0.28	3.46 ± 0.52
Triacylglycerol	85.2 ± 1.4 ^a	86.4 ± 1.6 ^a	80.5 ± 4.5 ^a	66.7 ± 1.0 ^b	65.1 ± 2.5 ^b
Cholesteryl ester	58.6 ± 0.8 ^a	51.8 ± 1.6 ^{ab}	51.3 ± 5.3 ^{ab}	45.1 ± 3.4 ^{ab}	39.7 ± 2.5 ^b
	(arbitrary unit)				
Phospholipids	100 ± 6	77.7 ± 5.6	81.4 ± 7.8	89.9 ± 9.8	103 ± 25
Diacylglycerol	100 ± 3	97.8 ± 9.3	122 ± 19	232 ± 111	279 ± 137
Free cholesterol	100 ± 4	93.0 ± 3.8	93.7 ± 8.1	102 ± 7	81.7 ± 6.7
Free fatty acid	100 ± 10	88.8 ± 11.5	84.3 ± 11.4	83.0 ± 5.6	68.4 ± 10.2
Triacylglycerol	100 ± 2 ^a	101 ± 2 ^a	94.4 ± 5.2 ^a	78.3 ± 1.2 ^b	76.4 ± 2.9 ^b
Cholesteryl ester	100 ± 1 ^a	88.4 ± 2.8 ^{ab}	87.5 ± 9.0 ^{ab}	77.0 ± 5.9 ^{ab}	67.8 ± 4.3 ^b

Different superscript letters show significant difference at $p < 0.05$.

細胞内脂質合成関連遺伝子の発現に対する影響も同様な傾向が認められたことから (表 2)、今後はより鎖長が長く不飽和度の高い極長鎖 n-3 系 PUFA の合成が望まれる。

表 2 極長鎖 n-3 系 PUFA が HepG2 細胞内脂質合成系遺伝子発現に及ぼす影響

	LA 18:2n-6	EPA 20:5n-3	DPA 22:5n-3	DHA 22:6n-3	THA 24:6n-3
	(arbitrary unit)				
SREBP1	100 ± 7	117 ± 7	97.5 ± 4.1	87.3 ± 10.3	109 ± 9
FAS	100 ± 7 ^a	83.0 ± 8.0 ^{ab}	77.2 ± 6.2 ^{ab}	75.0 ± 4.8 ^{ab}	67.0 ± 5.9 ^b
SCD1	100 ± 3 ^a	87.7 ± 7.9 ^{ab}	64.9 ± 5.0 ^b	67.9 ± 7.8 ^b	78.0 ± 3.4 ^{ab}
ACAT1	100 ± 7	113 ± 2	93.8 ± 5.6	93.6 ± 7.0	94.4 ± 5.0

Different superscript letters show significant difference at $p < 0.05$.

続いて、機能性構造脂質としてのグリセロ脂質における疎水性成分と親水性成分の組み合わせについて検討を行った。

天然物中の新規機能性脂質の検索において、海藻由来脂質成分は、n-3 系 PUFA の一種である EPA がリン脂質または糖脂質の構成脂肪酸として含まれる、特徴的な構造脂質を持つことが示唆された。EPA 含有複合脂質摂取が肥満・糖尿病モデル db/db マウスの病態発症に及ぼす影響について検討した結果、肝臓脂質濃度および血清脂質濃度低下が認められた (図 3)。

	C57Bl/6J		db/db	
	正常	対照	ノリ脂質	ノリ糖脂質
Initial B.W. (g)	20.9 ± 0.2	30.4 ± 0.4 ^a	30.4 ± 0.2	30.4 ± 0.2
Final B.W. (g)	24.3 ± 0.4	41.5 ± 0.4 ^a	40.4 ± 1.0	40.4 ± 1.0
Food intake (g)	77.0 ± 1.2	153 ± 6 ^a	153 ± 1	153 ± 1
Total WAT (g)	0.850 ± 0.071	4.70 ± 0.05 ^a	4.77 ± 0.10	4.77 ± 0.10

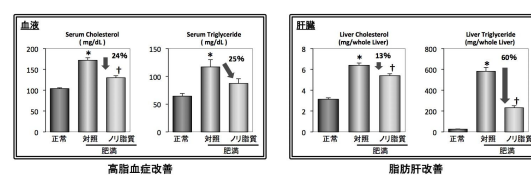


図 3 海藻由来 EPA 含有複合脂質が肥満モデルマウスの病態発症に及ぼす影響

次に、EPA 含有複合脂質摂取により肝障害

マーカーレベルが低下していたことから、肝障害改善作用が示唆され、その作用機序として、肝臓保護作用を持つアディポネクチンの血中濃度上昇と、肝臓における炎症性因子の遺伝子発現抑制が示唆された (図 4)。

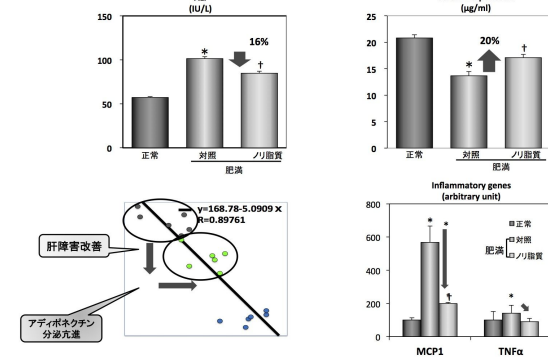
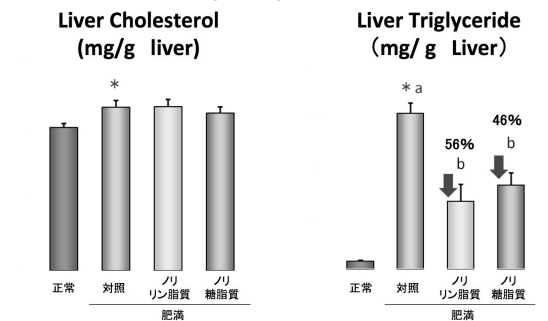


図 4 海藻由来 EPA 含有複合脂質が肥満モデルマウスのアディポサイトカイン産生に及ぼす影響

更に、海藻由来複合脂質から EPA リン脂質及び EPA 糖脂質を分画し、それぞれが肥満・糖尿病モデルマウスの病態発症に及ぼす影響について検討を行った。その結果、EPA リン脂質及び EPA 糖脂質のどちらの摂取群にも肝臓脂質濃度低下が認められ、脂肪肝の改善作用が示された (図 5)。

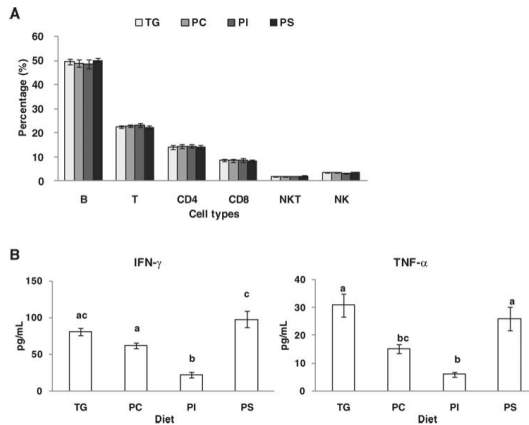


* $p < 0.05$ (正常 vs 対照) ab: Different superscript letters show significant difference at $p < 0.05$.

図 5 海藻由来 EPA 含有リン脂質および糖脂質が肥満モデルマウスのアディポサイトカイン産生に及ぼす影響

先の研究において、各種リン脂質 (ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン) は、メタボリックシンドロームにおける脂質代謝異常に対してそれぞれ異なった作用を及ぼすことを報告してきた。今回は、コンカナバリン A (ConA) 投与により自己免疫性肝炎を惹起させたマウスモデルを用い、各種リン脂質が免疫動態に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ConA 投与により上昇した血中炎症性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、MCP-1) や血中肝臓障害マーカーレベルが、ホスファチジルイノシトール摂取により有意に抑制されることが確認され、自己免疫性肝炎に対する進展抑制作用を持つことが初めて示唆された。(図 6)

図 6 各種リン脂質が ConA 誘発自己免疫肝炎発症に及



ばす影響

以上のことから、新規機能性脂質の創製において、脂質構造異性体の脂質種、構成脂肪酸種や構成塩基種の組み合わせの検討が、機能性付与・強化に重要であることが示された。

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)

K. Yoshinaga, K. Sasaki, H. Watanabe, K. Nagao, N. Inoue, B. Shirouchi, T. Yanagita, T. Nagai, H. Mizobe, K. Kojima, F. Beppu, N. Gotoh: Differential effects of triacylglycerol positional isomers containing n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Biochem.*, 26, 57-63, 2015.

K. Nagao, K. Nakamitsu, H. Ishida, K. Yoshinaga, T. Nagai, H. Mizobe, K. Kojima, T. Yanagita, F. Beppu, N. Goto: A comparison of the lipid-lowering effects of four different n-3 highly unsaturated fatty acids in HepG2 cells. *J. Oleo Sci.*, 63, 979-985, 2014.

K. Koba, T. Yanagita: Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA)., *Obes. Res. Clin. Exp.*, 8, 525-532, 2014.

M. Inafuku, K. Nagao, A. Inafuku, T. Yanagita, N. Taira, T. Toda, H. Oku: Dietary phosphatidylinositol prevents the concanavalin A-induced hepatitis via the suppression of immune-mediated liver injury. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57, 1671-1679, 2013.

[学会発表](計 12件)

永尾晃治: 食事脂質とアディポネクチン. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム、2014.6.1、北海道.

K. Nagao, T. Yanagita "Omega3-PUFA containing lipids in metabolic syndrome." 105th American oil chemist' society annual meeting & expo, 2014.5.7, San Antonio (USA).

仲光和佐、柘植圭介、鶴田裕美、吉村臣史、柳田晃良、永尾晃治: n-3 PUFA 含有複合脂質摂取が肥満マウスの病態および体脂肪酸組成に及ぼす影響. 平成 25 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学西日本支部合同大会、2013.10.19、福岡.

T. Yanagita, B. Shirouchi, K. Nagao, "Beneficial effects of dietary phospholipids on metabolic syndrome." 20th International congress of nutrition, 2013.9.16, Granada (Spain).

永尾晃治、仲光和佐、小島浩一、永井利治、柳田晃良: オゾン化脂質の肥満誘発性脂肪肝改善作用. 第 52 回日本油化学会、2013.9.4、仙台.

稲福征志、永尾晃治、柳田晃良、屋宏典: 食餌性リン脂質がコンカナバリン A 誘導性肝炎の進展に及ぼす影響. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013.5.25、名古屋.

T. Yanagita, K. Nagao, "Functional lipids and risk of metabolic syndrome." 104th American oil chemist' society annual meeting & expo, 2013.5.1, Montreal (Canada).

K. Nagao, M. Sakoh, S. Kai, K. Kojima, T. Nagai, T. Yanagita "Physiological functions of dietary ozonated-olive oil in mice." 104th American oil chemist' society annual meeting & expo, 2013.4.29, Montreal (Canada).

古賀美里、柘植圭介、鶴田裕美、吉村臣史、川内怜、柳田晃良、永尾晃治: ノリ由来複合脂質摂取が肥満マウスの病態発症に及ぼす影響、平成 24 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本農芸化学会西日本支部合同大会、2012.9.29、鹿児島.

迫尾昌美、小島浩一、永井利治、柳田晃良、永尾晃治: オゾン化脂質摂取がマウスの脂質代謝に及ぼす影響、平成 24 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本農芸化学会西日本支部合同大会、2012.9.29、鹿児島.

迫尾昌美、甲斐俊一、永尾晃治、小島浩一、永井利治、柳田晃良: オゾン化脂質の脂肪肝改善作用に関する研究、第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012.6.12、北九州.

古賀美里、柘植圭介、鶴田裕美、吉村臣史、犬塚伸幸、永尾晃治、柳田晃良: ノリ由来脂質成分の抽出と組成分析、第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012.6.12、北九州.

[図書](計 1件)

柳田晃良、永尾晃治: 油脂と健康. 人と食と自然シリーズ 3・脂肪の功罪と健康、建帛社、京都健康フォーラム監修・河田照雄編、29-47、2013.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田晃良 (YANAGITA TERUYOSHI)

西九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：00093980

(2) 研究分担者

永尾 晃治 (NAGAO KOJI)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：10336109

(3) 研究分担者

四元博晃 (YOTSUMOTO HIROAKI)

西九州大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：50321310

(4) 研究連携者

なし