

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18697

研究課題名(和文) プラズマローゲンの吸収代謝および神経保護作用に関する研究

研究課題名(英文) Study on absorption and neuroprotection of Plasmalogen

研究代表者

山下 慎司 (Yamashita, Shinji)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：90531434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で対象とするプラズマローゲン(PIs)は、特徴的なビニルエーテル結合をsn-1位に有するリン脂質である。近年、アルツハイマー型認知症(AD)などの神経疾患患者の脳や血液でのPIsの低値が示唆され、注目されている。本研究ではADモデルラットなどを用い、PIs摂取が体内脂質や認知行動へ及ぼす影響を調査した。結果として、PIs摂取は体内のPIsレベルを増加させ、ADモデルの認知行動を改善した。認知行動と体内PIs、特にDHA型PIsレベルとは相関があり、AD予防にはPIsレベルの維持が有効であると示唆された。また、PIsレベルの増加には、PIsと比較しリゾ体の摂取が効果的であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Plasmalogen (PIs), a major phospholipid in neuronal membranes, is specifically decreased in brains from patients with Alzheimer's disease (AD). The present study investigated how PIs administration affects cognitive deficits and lipid composition in an animal model of AD. PIs administration improved both reference and working memory-related learning abilities. In lipid analysis, PIs administration increased levels of PIs species in the plasma, erythrocytes, and liver. In addition, PIs administration increased levels of DHA-PIs in the cerebral cortex. These levels of DHA-PIs in the cerebral cortex were correlated with working memory-related learning ability. Moreover, DHA-PIsEtn levels in the cerebral cortex showed positive correlations with those in the erythrocytes and liver. In summary, dietary PIsEtn, especially that with DHA, may ameliorate learning deficiencies in AD by altering lipid composition in the brain.

研究分野：脂質生化学

キーワード：Plasmalogen Alzheimer DHA

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とするエタノールアミンブラスマローゲン (Pls) は、特徴的なビニルエーテル結合を sn-1 位に有するリン脂質であり、脳や赤血球中などに多く含まれる。Pls には、sn-2 位に結合する構成脂肪酸の違いにより様々な分子種が存在する。これまでに、Pls には膜の流動性や抗酸化、シグナル伝達への寄与が報告されてきた。近年では、アルツハイマー型認知症 (AD) などの神経疾患患者の脳や血液での Pls の低値が示唆され、AD のバイオマーカーや予防のためのサプリメント候補として注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、Pls の吸収動態および神経保護作用の解明を目的とする。AD は脳神経の脱落を伴うため治療が困難であり、予防法の開発が求められている。これまでに申請者はエーテル型リン脂質である Pls が *in vitro* で神経細胞のアポトーシスを抑制すること、またその抑制作用が Pls 分子種によって異なることを明らかにした。本研究では、Pls の *in vivo* での吸収動態および機能性を調査する。本研究により、Pls の AD 予防食品としての可能性が明らかになると考える。

3. 研究の方法

(1) Pls 摂取による AD 改善効果の検討

AD はアミロイド β ($A\beta$) タンパク質の凝集や神経アポトーシスによる脳神経の脱落が原因であると考えられている。以前の研究により、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を側鎖に持つ Pls が *in vitro* での $A\beta$ 凝集抑制効果および神経保護作用を持つことが分かっていた^{1,2)}。そこで、DHA 型の Pls の供給源を探しホヤや牡蠣のエタノールアミンリン脂質 (PE) に高含有されることが明らかになった^{3,4)}。

本項目においては、Pls 投与が空間認知力および各臓器の脂質組成に及ぼす影響を調査した。AD モデル動物として、 $A\beta$ を脳室に注入したラットを用いた。この AD モデルラットを、Control 群、ホヤ PE 群、卵黄 PE 群に分け、それぞれ vehicle、Pls を高含有するホヤ PE 画分、Pls 含有量の少ない卵黄 PE 画分を 6 週間投与した (300 mg/kg 体重・日)。最後の 2 週間、八方向放射状迷路により、参照記憶障害および作業記憶障害を数値化した。これらはそれぞれ、長期記憶障害および短期記憶障害の指標として使用される。

(2) 体内 Pls レベル増加法の検討

AD 罹患者の血液 Pls レベルの解析や前項の結果から血液の DHA 型 Pls レベルの維持が AD 予防に有効であると示唆された^{2,5)}。そこで、既報の Pls 吸収代謝機構を確認するとともに、Pls の吸収増大法についてマウスへの単回投与により検討した。Pls 分子種の定量はアルカリ条件下での LC - MS/MS により行

った。

また、長期摂取時における体内 Pls レベルの増加を目的に、Pls そのものと、細胞レベルで Pls 増加の報告のある DHA をマウスに 8 週間摂取させた後、血液及び各臓器の脂質組成を比較した。

4. 研究成果

(1) Pls 摂取による AD 改善効果の検討

ホヤおよび卵黄 PE 画分の脂質組成

ホヤ PE 画分中の 87% が PE であり、さらに PE 中の 80% が Pls であった。また、その脂肪酸組成はエイコサペンタエン酸 (EPA) と DHA が主要であった。一方、卵黄 PE 画分中の PE は 86% であり、PE 中の Pls は 4% であった。その脂肪酸組成はパルミチン酸とステアリン酸であった。

LC-MS/MS を用いた分子種分析により、ホヤ PE 画分には EPA と DHA を側鎖に持つ Pls が豊富に含まれていることが確認された。

ホヤ PE 画分投与による AD モデルラットの認知行動改善作用

Control 群と比較して、ホヤ PE 群は参照、作業記憶エラー数が少なく、特に短期記憶障害と関連付けられる後者では顕著であった。一方、卵黄 PE 群は Control 群と比較して、両記憶エラー数の有意な低値は示さなかった。

ホヤ PE 画分投与による AD モデルラットの血液および臓器の脂肪酸組成変化

Control 群と比較して、ホヤ PE 群の血漿、肝臓において、ホヤ PE 画分に多く含まれる EPA および DHA レベルの増加がみられた。また、ホヤ PE 群の血漿、赤血球、肝臓、海馬において、DHA/アラキドン酸比の増加がみられた。卵黄 PE 群では EPA および DHA レベルの増減は確認できなかった。

ホヤ PE 画分投与による AD モデルラットの血液および臓器の Pls 分子種組成の変化

Control 群と比較して、ホヤ PE 群の大脳皮質、血漿、赤血球、肝臓において、DHA を側鎖に持つ Pls の増加がみられた。また、ホヤ PE 群の血漿、赤血球、肝臓においては、DHA 型に加え、EPA 型 Pls レベルの増加がみられた。一方、卵黄 PE 群では、測定した Pls 分子種の増減は確認できなかった。

AD モデルラットの DHA 型 Pls レベルと記憶障害との相関

AD モデルラットの血液・臓器中の脂質レベルと記憶障害との相関を調査した。参照記憶障害とは血漿 DHA 型 Pls レベル、作業記憶障害とは大脳皮質 DHA 型 Pls レベルと有意な負の相関があることがわかった。

AD モデルラットの血液および臓器 DHA 型 Pls レベルの相関

AD モデルラットの血液および臓器中の DHA 型 Pls レベルの相関を調査した。大脳皮質中の DHA 型 Pls レベルは赤血球と肝臓のレベルと正の相関があった。赤血球のレベルは肝臓のレベルと相関があった。また、血漿レベルは肝臓レベルと相関があった。

以上から、血漿や脳 DHA 型 Pls レベルを増加・維持することが、AD 予防に有効であり、Pls、特に DHA 型 Pls の摂取が体内の DHA 型 Pls レベルを増加させる可能性が示唆された。

(2) 体内 Pls レベル増加法の検討

Pls 吸収機構からの Pls 吸収増大法の検討
摂取されたリン脂質はグリセロール骨格の 2 位の脂肪酸が切断された後、吸収・再合成されることが報告されている。そこで、Pls の 2 位をあらかじめ切断したリゾ Pls を投与することにより、吸収率の増大を図った。

リゾ Pls の作製法の検討

リゾ Pls の作製のため、牡蠣 PE 画分をアルカリ条件下での分解および PLA2 による酵素的分解に供した。前者においては、ジアシル型リン脂質に対しては 1 位、2 位の両方が切断され、収率は低いものの高純度なリゾ Pls を得ることができた。また、切り出された脂肪酸は反応液を反映した誘導体、すなわち、メタノールではメチルエステル、エタノールではエチルエステルを得ることができた。後者では、リゾ Pls に加え、ジアシル型のリゾ体と遊離の脂肪酸が得られた。その回収率は 90% 以上と高かった。

また、牡蠣 PE 画分の 66% が Pls であり、主な脂肪酸は DHA と EPA であった。牡蠣 PE 酵素分解物においても分解前と脂肪酸組成は変化なかった。

マウスにおける PE とリゾ PE の単回投与

Vehicle、PE、PE 酵素分解物 (リゾ PE + 遊離脂肪酸) を胃内投与し、経時的に血漿のリン脂質分子種レベルを測定した。Vehicle と比較し、PE の投与により、血漿中の DHA 型 Pls およびアラキドン酸型 Pls レベルが上昇し、投与後 4 時間で最大となった。酵素分解物の投与では、同じく DHA、アラキドン酸型 Pls レベルが上昇した。最大値は投与後 2 時間後であり、とくにアラキドン酸型 Pls は PE 投与最大値の約 2 倍のレベルを示した。

リゾ PE 投与による吸収効率の増大が示唆されたことから、さらに DHA 型 Pls レベル増加法の開発を目指した。吸収時の再合成における DHA への組み換え率を上昇させるために、PE 酵素分解物の遊離脂肪酸を除き、DHA エチルエステルを添加したサン

プルを作製し、吸収試験を行った。結果、通常の酵素分解物投与と比較し、脂肪酸代替物投与では血漿 DHA 型 Pls は増加傾向を示した。また、投与サンプルには含まれないアラキドン酸型 Pls の増加がみられたことから、過去の Pls 吸収の報告と同じく、リゾ Pls においても腸内もしくは細胞に残存するアラキドン酸が優先的に Pls へと組み込まれると考えられた。

長期投与による体内 DHA 型 Pls レベル増加法の検討

培養細胞において DHA の添加が細胞内における Pls の合成を促進すると報告されている。そこで、Pls 並びに DHA の長期投与が体内の Pls、特に DHA 型 Pls レベルを増加させるかを検討した。

群分けおよび食餌組成

マウスを Control 群、Fish 群、Pls 群に分けた。食餌は AIN93G を基本とし、Fish 群は大豆油の 4 分の 1 をイワシ油に代替し、Pls 群はそれに 0.1% のホヤ Pls を添加した。食餌は毎日新しいものに交換した。それぞれの食餌を室温放置し、12 時間後、24 時間後の酸化の指標である過酸化脂質価および TBARS を測定した。各食餌とも経時的に酸化指標の増加がみられたが、食餌間で有意な差はみられなかった。

食餌の脂肪酸組成は基本食では炭素鎖長 20 以上の脂肪酸は検出されなかった。一方、Fish および Pls 食ではアラキドン酸、EPA、DHA がそれぞれ 0.5、11.1、4.0% 含まれていた。食事の脂肪酸の評価に使用される n-6/n-3 比は基本食と魚油代替食でそれぞれ、9.4 と 2.2 であった。前者の比は欧米食、後者の比は昔の日本食と近い値である。

食餌摂取による生体パラメータの変化

群分けしたマウスにそれぞれの食餌を 8 週間与えた。体重は Control 群と比較して、Fish 群、Pls 群ともに有意な差はなかったが、Fish 群で低下傾向、Pls 群で増加傾向にあった。肝臓重量は Fish 群で有意な低値を示し、脾臓重量では群間に有意な差はなかった。また、肝臓の酸化指標 TBARS において、群間に有意な差はなかった。脾臓重量および肝臓 TBARS の変化がなかったことから Fish 群における体重や肝臓重量の低値は健康障害によるものではないと判断した。

食餌摂取による血漿脂質組成の変化

Control 群と比較して、Fish、Pls 群において血漿のリン脂質画分において DHA およびアラキドン酸レベルがそれぞれ増加、減少した。分子種分析では、Fish、Pls 群においてジアシル PE 中のアラキドン酸レベルの低下および DHA の増加を示した。一方、DHA 型 Pls は Pls 群のみで増加を示し

た。

以上から、少なくとも血漿においては DHA と比較し、Pls の摂取が DHA 型 Pls レベルに有効であると考えられた。

本研究により、AD 予防には体内の Pls、特に DHA 型 Pls レベルを増加させることが有用であり、Pls 摂取により体内 Pls レベルを増加させることが可能であることが示唆された。また、Pls をリゾ体として摂取することにより、体内 Pls レベルのさらなる増大が期待された。

<引用文献>

Yamashita, S. *et al.*, *RSC Adv*, 5(75); 61012-61020 (2015)

Yamashita, S. *et al.*, *J Alzheimers Dis*, 50(2); 527-537 (2016)

Yamashita, S. *et al.*, *Lipids*, 51(2); 199-210 (2016)

Yamashita, S. *et al.*, *Lipids*, 49(12); 1261-1273 (2014)

Yamashita, S. *et al.*, *Lipids*, 52(7); 575-585 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yamashita, S., Hashimoto, M., Haque, A.M., Nakagawa, K., Kinoshita, M., Shido, O., Miyazawa, T., “Oral Administration of Ethanolamine Glycerophospholipid Containing a High Level of Plasmalogen Improves Memory Impairment in Amyloid β -Infused Rats” *Lipids*, 52(7); 575-585 (2017) 査読有
DOI: 10.1007/s11745-017-4260-3

山下慎司、木下幹朗、仲川清隆 “アルツハイマー型認知症におけるプラズマローゲンの意義—プラズマローゲン分子種のバイオマーカーとしての可能性—” *化学と生物*, 54(10); 701-703 (2016) 査読有
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.701

〔学会発表〕(計6件)

櫻井梨帆、藤原和史、山下慎司、乙木百合香、仲川清隆、宮澤陽夫、木下幹朗 “マウス経口投与におけるプラズマローゲンの吸収動態” 日本油化学会 (2017.9)

山本真寛、櫻井梨帆、山下慎司、木下幹朗 “長期プラズマローゲン投与が肝炎モデルマウスに与える影響” 日本農芸化学会北海道支部会 (2017.7)

上吉原玲奈、乙木百合香、伊藤隼哉、加藤俊治、山下慎司、池田郁男、宮澤陽夫、仲川清隆 “エタノールアミン型プラズマローゲンの吸収評価：とくにコリン型への変換につ

いて” 日本農芸化学会 (2017.3)

山下慎司 “アルツハイマー型認知症におけるプラズマローゲンの意義” 認知症予防・治療・介護の最前線シンポジウム (2016.11)

山下慎司、櫻井梨帆、及川奈代子、安田野原、上吉原玲奈、島田健一郎、仲川清隆、木下幹朗、宮澤陽夫 “畜肉の熟成によるリン脂質レベル変化に関する研究” 日本油化学会 (2016.9)

山下慎司、橋本道男、仲川清隆、木下幹朗、紫藤治、宮澤陽夫 “ホヤ内臓由来エタノールアミングリセロリン脂質投与によるアルツハイマーモデルラットの認知行動改善” 日本栄養食糧学会 (2016.5)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 慎司 (YAMASHITA, Shinji)
帯広畜産大学・畜産学部・助教
研究者番号：90531434