

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00896

研究課題名（和文）脂肪酸組成の異なるグリセロリン脂質の消化吸収特性と機能性評価

研究課題名（英文）Analysis of digestion and absorption mechanism of glycerophospholipids and the potential activity of their digestive products in the small intestine

研究代表者

室田 佳恵子 (Kaeko, Murota)

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：40294681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、n-3系多価不飽和脂肪酸であるDHAの結合位置が異なるホスファチジルコリン（1-DHA-PC、2-DHA-PC）の消化吸収性を比較した。リンパカニキュレーションラットを用いてリンパ液中脂質の分画分析と膵酵素消化産物解析を行った結果、DHAの総吸収量とトリグリセリド画分含量に有意差は見られなかったが、1-DHA-PC投与時の方が2-DHA-PC投与時よりもリン脂質画分に分配されるDHAの割合が少ないことが示された。膵酵素消化では1-DHA-PCからの方が多くのリソPC型DHAが生成したが、さらに分解されてリン脂質合成には使われにくいものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究として、DHAを含有するトリグリセリドとリン脂質の吸収性比較実験を行ってきたが、その発展となる本研究の結果から、リン脂質であっても構成脂肪酸の種類や結合位置により吸収性や機能性が異なることが示唆された。近年クルルオイルなどn-3系多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質摂取による機能性への期待が高まっており、摂取するリン脂質の消化性、吸収性、細胞内動態の一端が明らかになったことで、リン脂質の栄養素としての役割ならびに機能性成分としての作用機序を解明する一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the absorption mechanism of docosahexaenoic acid (DHA)-containing phosphatidylcholines (PCs) was investigated. PCs that possess DHA either at sn-1 or sn-2 positions (1-DHA-PC and 2-DHA-PC, respectively) were administered into the duodenum of thoracic lymph duct-cannulated rats. Furthermore, the pattern of digestive products with pancreatic enzymes were analyzed. As a result, no significant difference in the total DHA absorption and its content ratio in the triglyceride fraction in the lymph was observed between 1-DHA-PC- and 2-DHA-PC-administered rats. On the other hand, the DHA ratio distributed in the phospholipid fraction was significantly greater with 1-DHA-PC administration than that of 2-DHA-PC. In the digestion experiment with pancreatic enzymes, DHA-bound lysoPC was produced much greater from 1-DHA-PC than from 2-DHA-PC, suggesting that 1-DHA-lysoPC would be further broken down and not be incorporated into the PC synthesis in the enterocyte.

研究分野：食品生化学、食代謝機能学

キーワード：グリセロリン脂質 DHA 吸収 消化 位置特異性 リンパ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食事性脂質の大部分は中性脂肪、すなわちトリグリセリドであるが、近年、食事性脂質の5%程度を占めるリン脂質、中でも主要なリゾホスファチジルコリン(PC)の栄養機能が再評価されている。例えばオキアミ由来のクリルオイルはn-3系脂肪酸を高含有するリン脂質に富んだ脂質としてサプリメントの原料として使用されている。n-3系多価不飽和脂肪酸の一種であるドコサヘキサエン酸(DHA)は必須脂肪酸であり、特に脳神経系の発達・機能維持に必要であるため、その効率的な吸収を可能とする分子構造の解明は関心を集めている。サプリメントや乳幼児向け粉乳などには、トリグリセリド(TG)に加えてエステル型DHAも使用されているが、中でもリン脂質結合型DHAの摂取は血漿中に出現するPC結合型DHAを増加させ、脳へのDHA供給に有効であることを示す報告が多い。さらに最近になって、血液脳関門にはDHAをリゾホスファチジルコリン(lysoPC)結合型として輸送する輸送担体Mfsd2aが存在することが報告された¹⁾ことで、リン脂質結合DHAの有効性にはさらに関心が高まっている。

我々は本研究課題にいたる先行研究として、n-3系必須脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)の吸収動態の解明に取り組んできた。その結果、DHAをTG、PC、遊離脂肪酸としてラット小腸に投与すると、リンパ液中へ出現するDHAがTG結合型とリン脂質結合型として分配される割合が異なることを見出していた(申請当時投稿準備中、発表論文)。この先行実験において、小腸におけるリン脂質の合成量や速度はリンパ液中へ輸送されるTGの量に連動していたが、TGに含まれる脂肪酸が投与サンプル中の脂肪酸組成を反映させているのに対し、リン脂質に含まれる脂肪酸の場合は、絶食時のリンパ液中でみられた脂肪酸組成とほとんど変わらなかった。しかしながらリン脂質として投与したDHAだけは吸収動態に準じてリン脂質画分へと取り込まれることが示され、DHAをリン脂質として投与すると、TGや遊離脂肪酸として投与されるよりも腸管細胞内でリン脂質の生合成に利用されやすいことが明らかとなった。

これまでの報告によれば、腸管細胞は刷子縁側から取り込んだ脂肪酸はTG合成に、基底側膜側から取り込んだ脂肪酸はリン脂質合成に利用する傾向がある²⁾。我々の実験結果から、リン脂質として摂取したDHAも、大部分はTG合成に使われていたが、TGとして摂取した際に予想される消化産物であるモノグリセリド型DHA、遊離脂肪酸として投与したDHAのいずれとも異なる傾向がみられた。膵酵素としてリン脂質の消化に働く主要なものはホスホリパーゼA2であり、一般的にsn-2位に結合しているDHAのような多価不飽和脂肪酸は消化によって遊離脂肪酸に変換される。そこで、もう1つの消化産物であるリゾPCと遊離脂肪酸型DHAの同時投与実験を行ったが、リン脂質型DHAでみられた現象は再現できなかった。このことから、腸管細胞でのリン脂質生合成においては、リン脂質として投与された脂肪酸のうち、何らかの構造特異性があるものを優先的に利用する経路が存在することが推定された。

2. 研究の目的

以上の先行研究の成果を踏まえて本研究においては、摂取したグリセロリン脂質の小腸における消化吸収動態を明らかにすることを目的とした。特にリン脂質の消化性に着目し、脂肪酸の結合位置と結合している脂肪酸の種類の影響を検討し、リン脂質として摂取したDHAが吸収後に腸管細胞内でリン脂質に再合成されやすい原因の解明を目指した。合わせて、腸管細胞に取り込まれる脂質消化産物は、生理活性物質として小腸上皮細部に直接影響すると考えられるため、消化産物のパターンとリン脂質の小腸における機能性の関係を考察することとした。

3. 研究の方法

(1) リンパカニキュレーションラットを用いたリン脂質の吸収性評価

胸管リンパにカニキュレーションを留置したラットの十二指腸に、n-3系多価不飽和脂肪酸であるDHAが主としてsn-1位あるいはsn-2位のいずれかに結合したホスファチジルコリン(1-DHA-PCおよび2-DHA-PC)を、DHAの含有量とリン脂質量を揃えた乳化サンプルとして調製したものを投与した。これらのPCは、連携研究者の渡辺らによって卵黄リン脂質を原料として脂肪酸置換反応により合成した。また、2-DHA-PCについてはAvanti Polar Lipidsより購入したのもも用いた。

投与後6hまで1hごとにリンパ液を分取し、クロロホルム-メタノール混液を用いて全脂質を抽出した。さらに、TLCを用いて脂質をトリグリセリド画分とリン脂質画分に分画した。その後、ガスクロマトグラフィーを用いてリンパ液に出現する脂質中の総脂肪酸分析ならびに各画分中脂肪酸分析を行った。

本実験は、近畿大学動物実験委員会(理工学部動物実験小委員会担当)ならびに、島根大学松江キャンパス動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

(2) 膵酵素によるリン脂質の消化性評価

1-DHA-PC、2-DHA-PC を緩衝液 (pH 8.0) 中でタウロコール酸ナトリウムとともに乳化し、精製ホスホリパーゼ A2 (PLA2、ブタ由来) または膵酵素製剤であるパンクレアチン (ブタ由来) を加えて 0.5 h あるいは 1 h インキュベートした。酵素無添加で同様の操作を行ったものを非消化液とした。インキュベート後に全脂質を抽出後、TLC を用いて PC、lysoPC、遊離脂肪酸に分離した。それぞれの画分に分配された脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析した。

(3) 小腸上皮細胞を標的とした機能性の検討

ヒト小腸モデルとして汎用されている Caco-2 細胞培養株を用いて、リン脂質分解活性の検討を行った。Transwell 上で 2-3 wk 培養して分化させた Caco-2 の Apical 側 (刷子縁側) に lysoPC を添加し、一定時間後に Apical 側溶液ならびに基底側膜側溶液中に出現したグリセロホスホコリン (GPC) 量を測定した。

また、連携研究者の高橋らとの共同実験として、マウスを用いて小腸での炎症に対する脂質摂取の影響を調べた。本実験は、東京農業大学動物実験委員会の承認のもとに実施した。

4. 研究成果

(1) リンパカニキュレーションラットを用いたリン脂質の吸収性評価

はじめに酵素合成により得た 1-DHA-PC と 2-DHA-PC をそれぞれリンパカニキュレーションラットに投与する実験条件の確立を行った。初年度にはサンプル調製条件の検討を行い、予備実験を実施した結果、投与後 1 h におけるリンパ液中総脂肪酸量ならびにトリグリセリド画分中脂肪酸量が 2-DHA-PC 投与時の方が低く、1-DHA-PC は 2-DHA-PC に比べてリンパ液へ出現するのが早い傾向が示され、またリン脂質画分への分配については 2-DHA-PC 投与時に低くなる傾向を示した。その後研究代表者が 2 年目に異動したため、改めて実験条件の確立を行った。異動に伴い動物実験環境が変わった当初は実験系が再現できず、特に 2-DHA-PC を投与したラットで不具合が顕著だったことから、初年度に予備的に得られた 2-DHA-PC の吸収が遅いという傾向はラットに対して何らかの有害事象が発生したためである可能性が懸念された。そこで、2-DHA-PC については精製品を購入し、またいずれのリン脂質についても投与量を減じて再実験を行ったところ、動物の状態も含めて改善が見られたことから、この実験条件に定めて本実験を実施した。

その結果、サンプル投与のリンパ液中から検出された DHA の総吸収量は 1-DHA-PC 投与時の方がやや高かったものの有意差は見られなかった。また、最大吸収時間は 1-DHA-PC の方がやや遅い傾向を示したが有意な差ではなかった。総吸収量でみられた結果は、リンパ液中の主要な画分である TG 画分でも同様であった。一方、リン脂質としての吸収においては、1-DHA-PC 投与時の方が 2-DHA-PC 投与時よりもリン脂質画分に分配される DHA 量が少ない傾向が見られたが、個体数が少なく吸収率の個体差が大きかったため有意差は得られなかった。そこで、総吸収量に対する分配量の割合で比較したところ、リン脂質への分配は 2-DHA-PC 投与時に有意に高い結果が得られた (図 1)。また、TG 画分への分配量に対するリン脂質画分 (PL 画分) への分配量の比 (PL/TG 比) を求めたところ、1-DHA-PC 投与時 (約 0.05) に比べて 2-DHA-PC 投与時 (約 0.15) の方が有意に高い値が得られた ($p < 0.05$)。このことから、*sn*-2 位に結合した DHA の方が吸収後にリン脂質に再合成されやすいことが強く示唆された。

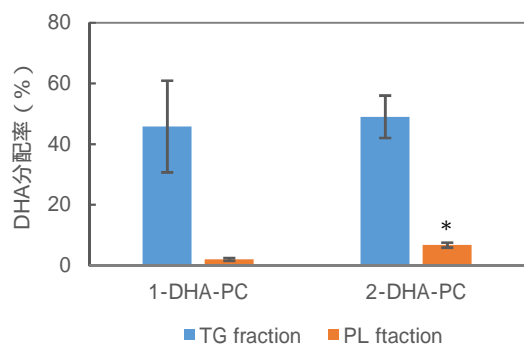


図 1 DHA の結合位置が異なる PC 投与時のリンパ液中 DHA の分子構造投与後 6 h の DHA 総吸収量に対するそれぞれの画分への分配量の割合 (%) として示した。平均値 \pm SEM (n=3) (* $p < 0.01$ 、同一画分の異なるサンプル間で有意差あり)

また、DHA 以外の脂肪酸の場合を調べるため、アラキドン酸が *sn*-2 位に結合したリン脂質の吸収実験を開始した。DHA に比べてアラキドン酸は絶食時にもリン液中 PL 画分の主要な脂肪酸として存在しており、現時点までの実施した個体数では特性を論じるには至っていない。今後引き続いて検討する予定である。

(2) 膵酵素によるリン脂質の消化性評価

吸収実験で得られた 1-DHA-PC と 2-DHA-PC の違いは、細胞内へ取り込まれる DHA の分子構造の違いによるものと考えられた。そこで、膵酵素によるこれらのリン脂質の消化実験を行い、DHA の結合位置がホスホリパーゼの基質特異性に及ぼす影響について検討した。膵酵素消化のモデルとして、膵液由来精製ホスホリパーゼ A2 (PLA2) と膵酵素の混合製剤であるパンクレアチンを用いた。これは先行研究において、DHA 高含有リン脂質の消化性がこれら 2 種の酵素サンプルで異なったためである (発表論文 参照)。胆汁酸塩としてタウロコール酸ナトリウムを添加して酵素反応時間を 0.5 h と 1 h で予備検討したところ、いずれも大きな違いはなく今回用いた酵素と基質の添加量であれば 0.5 h の反応で十分な消化が起こることがわかった。長時間のインキュベートは消化産物の異性を促進することが懸念されたため、反応時間は 0.5 h にて消化性の比較を行うことにした。

その結果、PLA2 とパンクレアチンいずれを用いた場合も、PLA2 の基質特異性と矛盾なく、どちらの PC から優先的に *sn*-2 位に結合している脂肪酸が遊離した。PLA2 とパンクレアチンでは消化率などが少し異なったが、大きな違いはみられなかった。したがって、1-DHA-PC 消化時からは多くのリゾ PC 型 DHA (DHA-LPC) が生成し、2-DHA-PC のほとんどは遊離の DHA へと変換され、DHA-LPC としての消化産物はわずかに生じた (図 2)。

このことから、1-DHA-PC からは消化産物として *sn*-1 結合型の LPC が多量に生じるものの、腸管細胞内でリン脂質の再合成には使われておらず、さらに加水分解されて DHA は遊離している可能性が高いと考えられた。一方で、2-DHA-PC に由来する少量の *sn*-2 結合型の LPC は、DHA を含むリン脂質の再合成に優先的に使われるものと推定された。

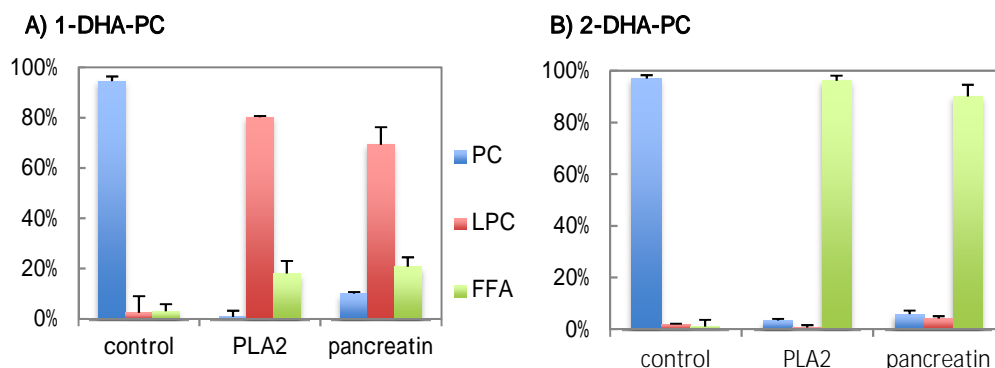


図 2 膵酵素による 1-DHA-PC および 2-DHA-PC の消化

A) 1-DHA-PC の消化、B) 2-DHA-PC の消化。酵素無添加のコントロール群、PLA2 消化群、パンクレアチン消化群において、0.5 h インキュベート後の消化産物を分画し、DHA の分配率を求めた。PC、ホスファチジルコリン；LPC、リゾホスファチジルコリン；FFA、遊離脂肪酸。平均値 ± SEM (n=3)。

そこで、ヒト小腸モデルである Caco-2 細胞を用いて lysoPC の細胞内挙動について検討した。卵黄由来 lysoPC を Caco-2 細胞の Apical 側に添加して一定時間インキュベートすると、lysoPC から脂肪酸が遊離して生じる GPC が基底側膜側溶液から検出された。しかし、Apical 膜側溶液からは遊離コリンのみが検出され GPC は検出限界以下であった。Caco-2 細胞だけでなく、ラット小腸にも lysoPC を分解する活性があることはすでに報告しており、lysoPC を添加した小腸灌流液中には GPC と遊離コリンの両方が検出されている³⁾。これらのことから、小腸上皮には lysoPC を加水分解して遊離脂肪酸と GPC に変換する活性が存在することが確認できた。しかし、今回は *sn*-1 位と *sn*-2 位の結合位置や脂肪酸種の影響まで明らかにするにはいたらず、引き続き検討する予定である。

また、Caco-2 細胞は、細胞内でのカイロミクロン形成能が不十分なため、連携研究者の高橋と共同で脂質吸収モデルとしてより利用性が高い培養条件の検討を実施しているが、今回の期間内には確立にいたらなかった。また、研究代表者が異動後の細胞実験環境の整備が間に合わず、再合成に関する実験を研究期間内には実施できなかったが、今後細胞内での挙動の詳細を明らかにする予定である。

(3) 小腸上皮細胞を標的とした機能性の検討

本研究にいたる準備段階での実験において、Caco-2 細胞に lysoPC を高濃度で添加すると、上皮細胞の透過性が促進されることが示された。(論文投稿準備中)。lysoPC は脂質代謝に関わる転写因子である PPAR のリガンドとなることが報告されている。そこで、リン脂質の消化産物が小腸上皮における炎症や脂質代謝に影響を及ぼすことが推定される。連携研究者の高橋との共同研究として、脂肪酸種が小腸における炎症に及ぼす影響を比較したところ、ラードやパーム油など飽和脂肪酸が構成脂肪酸の種となる油脂に比べ、オリーブ油やヒマワリ油など不飽和脂肪酸を豊富に含む油脂の摂取は腸管における炎症を抑制することが示唆された。脂質を構成する脂肪酸の種類の違いは腸管細胞に異なる影響を与えることから、今後同様の実験系を用いて DHA を含む油脂やリン脂質の摂取の影響を明らかにすることが期待される。

< 引用文献 >

- 1) Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L., Silver, D.L., 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506. DOI: 10.1038/nature13241.
- 2) Storch, J., Zhou, Y.X., Lagakos, W.S., 2008. Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *J. Lipid Res.* 49, 1762–1769. DOI: 10.1194/jlr.M800116-JLR200.
- 3) Inaba, M., Murota, K., Nikawadori, M., Kishino, E., Matusda, R., Takagi, M., Ohkubo, T., Tanaka, T., Terao, J., Tokumura, A., 2014. Extracellular metabolism-dependent uptake of lysolipids through cultured monolayer of differentiated Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 121–131. DOI: 10.1016/j.bbali.2013.10.007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murota Kaeko, Takagi Mika, Watanabe Yomi, Tokumura Akira, Ohkubo Takeshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Roe-derived phospholipid administration enhances lymphatic docosahexaenoic acid-containing phospholipid absorption in unanesthetized rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids	6. 最初と最後の頁 40~48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plefa.2017.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 室田佳恵子	4. 巻 18
2. 論文標題 脂溶性食品成分の腸管吸収機構と生体利用性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 393-399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murota Kaeko, Takagi Mika, Watanabe Yomi, Tokumura Akira, Ohkubo Takeshi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Roe-derived phospholipid administration enhances lymphatic docosahexaenoic acid-containing phospholipid absorption in unanesthetized rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plefa.2017.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroyuki Tsuyama, Mayu Kikuchi, Manae Matuda, Miori Morikawa, Rie Katumata-Tsuboi, Miori Tanaka, Hirofumi Inoue, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada, Kaeko Murota, Mariko Uehara, Nobuyuki Takahashi
2. 発表標題 Analysis of high-fat-diet-induced aggravation in postprandial lipidemia through saturated fatty acid-induced inflammation in the intestine
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaeko Murota
2. 発表標題 Comparison of docosahexaenoic acid absorption among different chemical forms in rat small intestine.
3. 学会等名 The 15th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaeko Murota, Shun Kumamoto, Akane Hirano, Nobuyuki Fukushima, Takeshi Okubo, Akira Tokumura
2. 発表標題 Digestion of dietary phospholipids and the physiological role of the digestive products in the intestine
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山浦凜子、渡辺嘉、室田佳恵子
2. 発表標題 リン脂質結合型DHAの結合位置の違いが消化吸収性に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会 (支部会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室田佳恵子、平野明伽音、渡辺嘉、大久保剛
2. 発表標題 食事性リン脂質の構成脂肪酸が腸管吸収過程における消化性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野明伽音、高木美佳、渡辺嘉、大久保剛、室田佳恵子
2. 発表標題 酵素による食事性リン脂質の消化性に及ぼす構成脂肪酸の影響
3. 学会等名 第22回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津山 博之、勝間田(坪井) 理恵、室田 佳恵子、井上 博文、上原 万里子、高橋 信之
2. 発表標題 炎症による腸管脂質代謝異常の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	渡辺 嘉 (Watanabe Yomi) (60416310)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所森之宮センター・生物・生活材料研究部・研究主任 (84421)	
連携研究者	高橋 信之 (Takahashi Nobuyuki) (50370135)	東京農業大学・応用生物科学部・教授 (32658)	
連携研究者	大久保 剛 (Okubo Takeshi) (40513172)	仙台白百合女子大学・人間学部・准教授 (31309)	