

令和元年6月17日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15364

研究課題名(和文) 畜産物の利用拡大を目指した天然型フィタン酸の機能性の解明

研究課題名(英文) Studies on the biological function of naturally occurring phytanic acid

研究代表者

仲西 友紀(Nakanishi, Tomonori)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20717889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛乳や牛肉などの畜産物はフィタン酸の天然の摂取源であり、8つあるフィタン酸異性体のうち3S, 7R, 11R-体と3R, 7R, 11R-体の2つを含んでいる。本研究では、天然型フィタン酸の機能性を明らかにするために、3S, 7R, 11R-体と3R, 7R, 11R-体のラセミ混合物を有機合成し、その免疫調節作用を調査した。その結果、T細胞からのサイトカイン(インターフェロン など)の産生が天然型フィタン酸によって抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛乳や牛肉などの畜産物はフィタン酸の天然の摂取源であり、フィタン酸異性体のうち3RS, 7R, 11R-体を含んでいる。フィタン酸は免疫調節作用などの生理活性を有する機能性脂質として注目を集めているが、一方で、その生理活性が3RS, 7R, 11R-体によって発揮されているのかは定かではなかった。そこで本研究では、天然型フィタン酸に焦点を絞った機能性評価を行い、3RS, 7R, 11R-体自身が免疫調節作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Among the eight stereoisomers of phytanic acid (PA), 3S, 7R, 11R- and 3R, 7R, 11R-isomers are naturally occurring and are present in milk and beef. In this study, we synthesized the diastereomeric mixture of 3S, 7R, 11R- and 3R, 7R, 11R-PA, and investigated its immunomodulatory effects, in order to elucidate novel biological functions of naturally occurring PA. Results indicated that naturally occurring PA reduced in vitro production of cytokines such as interferon-. This finding suggests that naturally occurring PA is a functional fatty acid, and has the potential for amelioration of immunological diseases.

研究分野：畜産食品科学

キーワード：フィタン酸 畜産物 免疫調節作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フィタン酸 (3, 7, 11, 15-tetramethylhexadecanoic acid) は分岐鎖脂肪酸の一種であり、粗飼料中のクロロフィルに由来するフィトールを前駆物質として、反芻動物のルーメン内で生成する。そのため、牛乳や牛肉にはフィタン酸が含まれており、ヒトはこれらの畜産物からフィタン酸を日常的に摂取している。

フィタン酸は核内受容体 PPARs (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体) を強力に活性化する。PPARs は糖質・脂質代謝を制御しており、フィタン酸は PPARs を介して、2 型糖尿病などの代謝性疾患を改善すると考えられている。一方で、PPARs は免疫疾患の治療標的分子としても注目を集めている。そこで筆者は、免疫調節作用の観点でフィタン酸の機能性探索を実施し、その中で、「ヘルパー T (Th) 細胞に由来するサイトカインの過剰産生がフィタン酸によって軽減されること」などを明らかにしてきた。この結果は、代謝性疾患のみならず、自己免疫疾患やアレルギー疾患に対してもフィタン酸が有効であることを示唆している。

このように、フィタン酸は牛乳・牛肉に含まれる新規機能性脂質として注目を集めているが、更に研究を進展させるためには以下の 2 点が課題として残されている。1 点目はフィタン酸の異性体に関する課題である。フィタン酸には 3 つのキラル炭素に起因して 8 つの異性体が存在する。この中で牛乳・牛肉に含まれる天然型フィタン酸は、3*S*, 7*R*, 11*R*-体と 3*R*, 7*R*, 11*R*-体の 2 つである。一方で、これまでの研究で使用されてきた市販品のフィタン酸は、8 つの異性体混合物である。そのため、上記のような機能性が、天然型フィタン酸によって発揮されているのかは定かでない。2 点目の課題はフィタン酸の機能性評価に関する点である。フィタン酸の機能性探索は通常、培養細胞レベルの評価によって行われており、動物レベルでの有効性に関する情報は皆無である。理由として、市販品のフィタン酸が極めて高価であり、動物レベルの評価に必要な量を調達できない点が挙げられる。

2. 研究の目的

上述のような背景の下、筆者はフィタン酸の有機合成に取り組み、クロロフィルから調整した天然のフィトールを原料とすることにより、天然型フィタン酸をグラム単位で合成することに成功した。この天然型フィタン酸を用いた機能性評価を実施すれば、上記の課題が克服できると考え、本研究の着想に至った。

本研究は「畜産物摂取によるヒトの健康増進」を目指した基礎研究であり、筆者が独自に合成した天然型フィタン酸を用いて、免疫調節作用に関する機能性を明らかにするために実施する。研究期間内に実施する具体的内容は以下の通りである。

(1) T 細胞や B 細胞の機能に与える天然型フィタン酸の影響

T 細胞や B 細胞は免疫反応の中心的な役割を担う。特に Th 細胞の過活動は自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症に深く関与する。本研究では Th 細胞が産生するサイトカイン (インターフェロン(IFN)- γ 、インターロイキン(IL)-2、IL-4、および IL-17A) を指標に、天然型フィタン酸が Th 細胞の機能に与える影響を明らかにする。また、B 細胞の抗体産生に与える天然型フィタン酸の影響についても調査する。

(2) 天然型フィタン酸の免疫調節作用のメカニズム

フィタン酸は、3 つある PPAR サブタイプの中でも PPAR α に対して強いアゴニスト活性を示すと考えられている。また、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) はサイトカインの発現を調節する転写因子であり、PPAR α によって負の制御を受けている。そこで本研究では、NF- κ B の転写活性に与える天然型フィタン酸の影響を明らかにするとともに、天然型フィタン酸の免疫調節作用における PPAR α の役割を調査する。

なお、研究開始当初は天然型フィタン酸の機能性評価を培養細胞レベルと動物レベルの両面において行う予定であった。しかしながら、研究途中の段階で、培養細胞レベルでの検討から顕著な成果が得られており、その後も培養細胞レベルでの検討に注力するために、動物レベルでの検討は見送った。

3. 研究の方法

(1) 天然型フィタン酸の有機合成

天然のフィトールを合成原料とした。アダムス触媒 (酸化白金) を用いた水素添加を行い、フィトールをフィタノールに変換した。その後、過ヨウ素酸ナトリウムを共酸化剤、塩化ルテニウムを触媒として用い、フィタノールをフィタン酸に酸化した。

(2) 細胞毒性に関する評価

マウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した後に、天然型フィタン酸の存在下で培養した。その後、Alamar Blue 試薬を用いて細胞生存率を測定することで、天然型フィタン酸が有する細胞毒性を調査した。また、対象物質としてパルミチン酸を用いた同様の検討も行った。

(3) Th 細胞の機能に与える影響

マウスの脾臓細胞を、天然型フィタン酸もしくは対象物質としてパルミチン酸の存在

下で培養し、さらに phytohaemagglutinin (PHA) や pokeweed mitogen (PWM) と
いった Th 細胞マイトジェンで刺激した。その後、脾臓細胞からトータル RNA を抽出し、
cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとして、各種サイトカイン (IFN- γ 、
IL-2、IL-4、IL-17A) の発現量を定量的 PCR 法で測定することで、これらのサイトカ
インの発現に与える天然型フィタン酸の影響を調査した。

(4) B 細胞の機能に与える影響

III. と同様にマウス脾臓細胞を天然型フィタン酸の存在下で培養し、さらに B 細胞を
活性化するために lipopolysaccharide (LPS) で刺激を与えた。培養終了後に、培養上
清中に含まれる IgM および IgG の濃度を ELISA の手法で測定することで、B 細胞の抗
体産生に与える天然型フィタン酸の影響を調べた。

(5) 作用メカニズムに関する検討

NF- κ B-Luciferase 遺伝子を安定発現する A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞) を
試験に用い、この細胞を天然型フィタン酸の存在下、もしくはパルミチン酸の存在下で
培養した。その後、腫瘍壊死因子 (TNF) - α によって誘導されるルシフェラーゼ活性を
測定することで、天然型フィタン酸やパルミチン酸が NF- κ B の転写活性に与える影響を
調べた。また、同様の試験を PPAR α のアンタゴニストである GW6471 の存在下で行い、
天然型フィタン酸の免疫調節作用の作用メカニズムにおける PPAR α の関与を調査した。

4. 研究成果

(1) 細胞毒性に関する評価

マウス脾臓細胞を用いて、天然型フィタン酸とパルミチン酸の細胞毒性を評価した。30
 μ M と 100 μ M の 2 濃度で試験を行ったが、天然型フィタン酸、パルミチン酸ともに 100 μ M
まで明確な細胞毒性は観察されなかった。一方で、健康人の血液に含まれるフィタン酸
の濃度は 30 μ M 以下であるとの報告もあり (*Biochem Soc Trans.* 2007;35:881-6) 以降
の試験では、天然型フィタン酸、パルミチン酸ともに 30 μ M を用いることとした。

(2) Th 細胞の機能に与える影響

マウス脾臓細胞を PWM で刺激することで、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-17A の全ての遺
伝子発現が上昇していた。しかしながら、天然型フィタン酸の存在下では、IFN- γ 、IL-2
および IL-17A の発現上昇が抑制されていた。一方で、IL-4 の発現については天然型フィ
タン酸による明確な作用は認められなかった。また、このような天然型フィタン酸の効果
は、マウス脾臓細胞を PHA で刺激した際にも同様に観察された。対象物質であるパルミ
チン酸には、天然型フィタン酸のようなサイトカインの発現抑制作用は認められず、むしろ
IL-2 や IL-17A の発現を増強する傾向にあった。

(3) B 細胞の機能に与える影響

マウス脾臓細胞を LPS で刺激することで、IgM や IgG の産生誘導を確認できた。同条
件で、天然型フィタン酸の効果を検討したが、天然型フィタン酸は IgM および IgG の産
生に対して明確な作用を示さなかった。

(4) 作用メカニズムに関する検討

A549 細胞を用いて、TNF- α 誘発 NF- κ B 転写活性に与える天然型フィタン酸もしくはパ
ルミチン酸の効果を検討した。その結果、天然型フィタン酸は NF- κ B の転写活性を抑制
することが明らかになった。一方で、パルミチン酸は NF- κ B の転写活性を抑制せず、むしろ
その活性を増強することが示された。また、GW6471 の存在下では、天然型フィタン
酸の NF- κ B 転写活性抑制作用が消失することも明らかとなった。

以上の結果から、Th 細胞からの IFN- γ 、IL-2、IL-17A のようなサイトカインの産生が天然
型フィタン酸によって抑制されることが明らかとなった。また、天然型フィタン酸の免疫調節
作用のメカニズムに PPAR α を介した NF- κ B の転写活性抑制が関与している可能性が示された。
一方で、天然型フィタン酸は B 細胞からの抗体産生には影響を与えず、免疫細胞の細胞種によ
って天然型フィタン酸の作用は異なるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Nakanishi T, Motoba I, Anraku M, Suzuki R, Yamaguchi Y, Erickson L, Eto N, Sugamoto K, Matsushita Y, Kawahara S. Naturally occurring 3RS, 7R, 11R-phytanic acid suppresses in vitro T-cell production of interferon-gamma. *Lipids in Health and Disease.* 2018 Jun 23;17(1):147. doi: 10.1186/s12944-018-0793-6. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 仲西友紀, 鈴木遼司, 江藤望, 松下洋一, 河原聡、天然型フィタン酸がインターフェロン
- 産生に与える影響、日本畜産学会第 123 回大会、2017 年 9 月 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 河原 聡, 松下 洋一, 菅本 和寛

ローマ字氏名： Satoshi Kawahara, Yoichi Matsushita, Kazuhiro Sugamoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。