

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05481

研究課題名(和文) 魚油構成成分による腸管脂質代謝制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Controls of intestinal lipid metabolism by fish oil

研究代表者

高橋 信之 (TAKAHASHI, Nobuyuki)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50370135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず食後高脂血症増悪化のメカニズムを明らかにするため、脂肪含量の違い、あるいは構成脂肪酸の種類の違いで食後高脂血症を評価したところ、脂肪含量が大きくなるにしたがい、また飽和脂肪酸含量が多くなるにしたがい、食後高脂血症が増悪化することが明らかとなった。このとき腸管上皮組織での炎症性サイトカイン発現が増加していたことから、食後高脂血症の増悪化に飽和脂肪酸による腸管炎症が関わっていることが示唆された。一方で、技術的な問題からDHA・EPAの存在形態による抗炎症作用の違いについては、研究期間中に明らかにすることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、魚油中のDHA・EPAの存在形態の違いによる抗炎症作用ならびに食後高脂血症に対する作用を明らかにすることはできなかった。しかし研究の過程において、高脂肪食摂取、特に飽和脂肪酸の摂取によって腸管上皮組織で炎症が誘導され、その腸管炎症が食後高脂血症を増悪化させる可能性が示唆された。この知見は、今後、食後高脂血症増悪化を改善する食品成分の同定・機能解析において、きわめて重要であり、食後高脂血症をターゲットとした機能性食品の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, cellular and animal experiments were performed in order to elucidate a mechanism of amelioration in postprandial lipidemia. Oral lipid tolerance test (OLT) revealed high-fat-diet and saturated fatty acids ameliorated the postprandial lipidemia. Expression levels of pro inflammatory cytokines were increased by the high-fat-diet and saturated fatty acids in the intestinal epithelia. On the other hand, differences in forms of DHA/EPA in fish oil could not be detected because of technical difficulties.

研究分野：代謝生理学

キーワード：脂質代謝 魚油 DHA EPA 消化管 食後高脂血症 炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患の予防・改善は現代社会における急務となっている。現在、日本人の死因の上位に動脈硬化が原因で発症する心疾患や脳血管疾患が占めているためである。これまで動脈硬化性疾患発症リスクとして、空腹時血中中性脂肪濃度が重要であると考えられてきた。しかし近年、空腹時ではなく食後の血中中性脂肪濃度の上昇、すなわち食後高脂血症のピーク値が動脈硬化性疾患発症リスクとより高い相関を持つことが疫学調査により明らかにされている。したがって、食後高脂血症のピーク値を下げることで動脈硬化性疾患の予防・改善により有効であると考えられる。

これまで研究代表者は、腸管上皮細胞の脂肪酸酸化に着目し、食品成分によって食後高脂血症をコントロールできないか検討を進めてきた。その結果、肝臓などで脂肪酸酸化亢進作用を示す核内受容体ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR $\alpha$ ) を腸管上皮細胞で薬剤により活性化させることで食後高脂血症を改善できることを示した。また魚油に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) には PPAR $\alpha$  活性化能があるため、DHA 含有率の高い魚油の摂取により食後高脂血症が改善することを報告した。魚油は様々な生理機能を持ち、その有効成分は DHA やエイコサペンタエン酸 (EPA) といったオメガ 3 系脂肪酸である。しかしこのとき、DHA と同様に PPAR 活性化能を有する EPA には食後高脂血症改善作用が認められず、その理由を明らかにすることができなかった。

魚油中で DHA・EPA は、遊離脂肪酸ではなく、トリアシルグリセロールやリン脂質など様々な形態で存在する。近年、そうしたオメガ 3 系脂肪酸の存在形態の違いが生理作用に影響する可能性が示唆されている。特に抗炎症作用については、DHA・EPA のリン脂質体が遊離脂肪酸の状態よりも強いことが報告されている。しかし、存在形態における違いが食後高脂血症に対してどのような影響を与えるかについては全く明らかにされていない。脂肪酸の存在形態は、生体から分泌される消化酵素や様々な疾患発症に関わる腸内細菌による代謝などによって変化する可能性があるため、それぞれの存在形態の生理作用における差異を明らかにすることは、食品科学の分野において極めて重要な課題である。

さらに近年、研究代表者は、高脂肪食摂取により Toll 様受容体 4 (TLR-4) 活性化を介して腸管上皮組織で炎症が惹起され、その高脂肪食誘導性腸管炎症が脂肪酸酸化を抑えることで食後高脂血症を悪化させることを明らかにした。このことから、抗炎症作用を持つ食品成分が高脂肪食誘導性腸管炎症による食後高脂血症悪化を改善する可能性が考えられるが、その可能性の検討を研究実施期間中に行うことができなかった。また先の DHA による食後高脂血症の改善作用を明らかにした研究において、DHA や EPA が持つ抗炎症作用を PPAR 活性化能と区別して検討することはなかった。

### 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では「魚油中での存在形態の違いにより食後高脂血症改善作用に差が生じるのか」、また「なぜ DHA と EPA とが食後高脂血症改善作用に違いをもたらすのか」という二つの問題を、PPAR 活性化能と抗炎症作用に着目し解決することを目的とする。

存在形態による食後高脂血症改善作用の違い：DHA・EPA の様々な存在形態の違いにより、腸管における脂質代謝および高脂肪食誘導性の腸管炎症に対する影響に差異があるかどうかを明らかにする。

DHA と EPA の食後高脂血症改善作用の違い：PPAR 活性化能および抗炎症作用について、様々な存在形態のものを比較することで、DHA と EPA にどのような差異が認められるか検討する。

### 3. 研究の方法

DHA および EPA の様々な存在形態 (遊離脂肪酸、トリアシルグリセロール、リン脂質、リゾリン脂質など) が高濃度に含まれる各種魚油は、研究協力者である仙台白百合女子大学人間学部健康栄養学科・大久保剛准教授より供与してもらう。これら各種魚油は、PPAR $\alpha$  活性化能と抗炎症作用を併せ持つと考えられ、そのいずれもが食後高脂血症の改善に関与するが、それら二つの作用を同時に検討することは困難である。そこで、PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスを用いて PPAR $\alpha$  活性化能を消失させることで抗炎症作用のみを、高脂肪食誘導性炎症惹起に関わる TLR-4 をノックアウトしたマウスを用いて抗炎症作用を消失させることで PPAR $\alpha$  活性化能のみを検

討する。

C57BL/6J 雄性マウス（9 週齢）に、1 週間の高脂肪食による予備飼育の後、各種魚油を含む高脂肪食を 1 週間摂取させ、経口脂肪負荷試験（oral lipid tolerance test : OLTT）を実施し、まず各種存在形態の違いにおける食後高脂血症に対する差異を検討する。同じ実験条件で、腸管上皮細胞における各種遺伝子発現（脂肪酸酸化、脂肪酸合成、トリアシルグリセロール合成、炎症マーカーなど）を定量的 PCR にて検討し、PPAR $\alpha$  の活性化や高脂肪食誘導性腸管炎症がどのように変化しているか明らかにする。

次に各種魚油を TLR-4 ノックアウトマウスに摂取させ、OLTT および遺伝子発現解析を行う。高脂肪食により惹起される腸管炎症は TLR-4 活性化を介するため、TLR-4 ノックアウトマウスでは高脂肪食誘導性の腸管炎症が起こらないことが予想される。したがって、この TLR-4 ノックアウトマウスに各種魚油を摂取させると、魚油が有する抗炎症作用は発揮されないため、その PPAR $\alpha$  活性化能だけを評価することが可能となる。

#### 4 . 研究成果

まず細胞レベルで DHA・EPA の抗炎症作用を評価するため、炎症時に活性化される転写因子である NF- $\kappa$ B の応答配列により誘導されるルシフェラーゼをレポーター遺伝子として利用したレポーターシステムを構築した。初めに抗炎症作用の評価で一般的に用いられるマクロファージ培養細胞 RAW264.7 細胞でレポーターシステムを起ち上げ、DHA・EPA を含む複数の抗炎症作用を有する食品成分を評価した。DHA・EPA とともに RAW264.7 細胞のレポーターシステムで有意な抗炎症作用を確認した。次に腸管炎症を評価するため、腸管上皮細胞モデルである Caco-2 細胞で、同様のレポーターシステムの構築を試みたが、レポーター遺伝子の安定導入株がどうしても得られず、Caco-2 細胞でのレポーター遺伝子を利用した抗炎症作用の評価は断念した。代わりに炎症性サイトカインの mRNA 発現量を定量的 PCR 法により定量し、RAW264.7 細胞や Caco-2 細胞での抗炎症作用を評価したところ、Caco-2 細胞でも RAW264.7 細胞と同様に LPS 誘導性炎症性サイトカイン発現増加を有意に抑制し、抗炎症作用を確認することができた。しかし、この評価系では DHA と EPA の抗炎症作用に大きな違いは認められなかった。また DHA・EPA の存在形態による抗炎症作用の違いについては、評価するまでに至らなかった。予備的な検討において、サンプル中の各形態の脂肪酸が高純度で含まれているわけではないため、比較検討が困難であった。今後、サンプル中の各形態脂肪酸の純度を上げる操作が必要であると考えられる。

動物レベルでは、魚油の抗炎症作用による食後高脂血症改善作用を評価するために、まず高脂肪食誘導性の腸管炎症を介した食後高脂血症増悪化について詳細に検討した。脂肪含量が 10、45、60cal% の 3 種類の飼料を用意し、1 週間、C57BL/6J 雄性マウスに摂取させ、食後高脂血症を OLTT にて評価した。その結果、脂肪含量が大きくなるにしたがって食後高脂血症が増悪化することが明らかとなった。また同じ 60cal%高脂肪食摂取の場合でも、飼料中の脂質を構成する脂肪酸が飽和脂肪酸の場合（ラードやパーム油）、不飽和脂肪酸含量の多い高脂肪食（オリーブ油やひまわり油）と比較して、食後高脂血症の増悪化が認められた。脂肪含量の多い飼料を摂取した場合、また飽和脂肪酸含有量の多い高脂肪食を摂取した場合に、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  遺伝子の発現が腸管上皮組織で増加しており、腸管炎症が惹起されていることが示唆された。また 60cal%高脂肪食条件下で、DHA や EPA を多く含む魚油を摂取させた場合に、腸管上皮組織での炎症性サイトカイン発現が有意に抑制されることを確認した。したがって、魚油摂取による食後高脂血症増悪化の改善は、PPAR 活性化以外にも抗炎症作用による可能性が考えられる。しかし、DHA と EPA 含量の違いでは、炎症性サイトカイン発現抑制に有意な差は認められなかった。動物レベルでの食後高脂血症の評価は、個体差が大きく、改善作用の有無については容易に判断できるものの、改善作用のある DHA と EPA を比較する場合には困難であると考えられるため、それ以上の評価は期間中に実施できなかった。TLR-4 ノックアウトマウスを用いた評価についても、交配が予定通りに進まず、期間内の実施を断念した。一方で、食後高脂血症増悪化に腸管上皮組織での飽和脂肪酸による炎症が関与していることが明らかとなり、今後、食後高脂血症増悪化を改善する食品成分の作用メカニズムを考える上で、重要な知見が得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawarasaki S, Kuwata H, Sawazaki H, Sakamoto T, Nitta T, Kim CS, Jheng HF, Takahashi H, Nomura W, Ara T, Takahashi N, Tomita K Yu R, Kawada T, Goto T.	4. 巻 593
2. 論文標題 A new mouse model for noninvasive fluorescence-based UCP1 expression monitoring.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1201-1212
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 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 該当する

1. 著者名 Hara H, Takahashi H, Mohri S, Murakami H, Kawarasaki S, Iwase M, Takahashi N, Sugiura M, Goto T, Kawada T.	4. 巻 67
2. 論文標題 beta-Cryptoxanthin induces UCP-1 expression via an RXR pathway in adipose tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 10595-10603
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 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 Kurata M, Fujiwara N, Fujita K, Yamanaka Y, Seno S, Kobayashi H, Miyamae Y, Takahashi N, Shibuya Y, Masuda S.	4. 巻 22
2. 論文標題 Food-derived compounds apigenin and luteolin modulate mRNA splicing of introns with weak splice sites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 336-352
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 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 炎症による腸管代謝異常の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田 真英、津山 博之、菊池 真優、田中 未央里、井上 博文、上原 万里子、高橋 信之
2. 発表標題 AMPキナーゼの食後高脂血症改善作用への関与
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 2020年度大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	室田 佳恵子  (MUROTA Kaeko)		
研究協力者	大久保 剛  (OHKUBO Tsuyoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------