

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07434

研究課題名（和文）細胞を酸化ストレスから守るリゾリン脂質の発見

研究課題名（英文）Discovery of lysophospholipids that protect cells from oxidative stress

研究代表者

千葉 仁志（Chiba, Hitoshi）

北海道大学・保健科学研究所・名誉教授

研究者番号：70197622

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）：リゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）は、ホスファチジルエタノールアミンの加水分解産物であるがその脂質代謝における役割は解明されていない。本研究課題は、ヒト肝臓由来細胞株（C3A）における脂質代謝への影響を検討することを目的としている。脂質の代謝と異化に関連する遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。LPE の補給は細胞の脂肪滴形成を誘導し、中性脂肪の加水分解制御因子 ATGL の発現を低下させた。これらの発見はLPEが脂肪分解と脂肪酸生合成を抑制することによって脂肪滴形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）は、ホスホリパーゼによるリン脂質の加水分解によって生成される脱アシル化産物である。臨床研究において、片頭痛患者血清中のLPE濃度が低下したことを示す報告がある。このように、LPEには明らかな生理学的意義があることが示唆されている。しかし、LPEの脂質代謝における役割は十分に解明されていないのが現状である。本研究では補給したLPEが脂肪分解を抑制し肝細胞の脂肪滴形成に関与していることを明らかにした。本研究成果は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の予防と治療に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Lysophosphatidylethanolamine (LPE) is a hydrolysis product of phosphatidylethanolamine, but the role of LPE in lipid metabolism has not been elucidated. The purpose of this research is to examine the effects on lipid metabolism in C3A. The expression of genes related to lipid metabolism and catabolism was evaluated using real-time PCR. LPE supplementation induced cellular lipid droplet formation and decreased the expression of ATGL for TAG hydrolyzation. These findings suggested that LPE is involved in lipid droplet formation by suppressing lipolysis and fatty acid biosynthesis.

研究分野：脂質代謝学、細胞代謝学

キーワード：リゾリン脂質 LPE 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年酸化ストレスや脂質代謝異常に起因とする非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の内、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は世界的に患者数が増え続けており、社会的な問題となっている。NASHは肝硬変や肝臓に進行する予後不良の疾患であるが、その有効な予防法や治療法は確立されていない。リゾリン脂質は、ホスホリパーゼA1/A2によるリン脂質の加水分解によって生成される脱アシル化産物である。リゾリン脂質の生理活性は、その化学的性質に応じて異なると考えられている。片頭痛患者血清中のLPE濃度が低下したことを示す報告がある (Ren, et al. *Lipids Health Dis.* 17:1-9, 2018)。当研究室の先行研究で、NASHモデルマウス肝臓中のLPEが減少したことを明らかにした (Furukawa, et al. *Chem Phys Lipids.* 200:133-8, 2016)。NAFLD患者血清中の総LPEが減少したと報告されている (Tiwari-Heckler et al. *Nutrients.* 10:649, 2018 ; Yamamoto, et al. *Anal Bioanal Chem.* 413:245-254, 2021)。研究代表者らは脂質代謝の正常化や酸化ストレスの軽減に働く機能性物質を探索していた過程で、LPEの抗酸化機能を見いだしたがLPEが肝細胞の脂質代謝に与える影響について不明である。

2. 研究の目的

本研究課題ではヒト培養肝細胞における LPE 分子の動態を観察し、LPE の細胞毒性や脂肪滴形成および脂質代謝関連遺伝子の発現量を調べ、LPE が肝細胞の脂質代謝に与える影響を調査する。

3. 研究の方法

リノール酸 (18:2) を含有するリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE 18:2) の添加による細胞障害の程度を確認するために、ヒト肝由来株化細胞 (C3A) を用いて 37℃、5% CO₂ でインキュベーターにて継代培養した。コントロール群と LPE 18:2 添加群を利用し、細胞生存率試験及び Lactate dehydrogenase (LDH) を用いた細胞毒性試験を行った。また、LPE が肝細胞内の脂肪蓄積への影響を調べるために、Orbitrap 質量分析計を用いた脂質の網羅的解析を行った。なお、Real-time PCR による脂質代謝に関連する遺伝子発現を調べるために細胞からの RNA 抽出を市販のキット (PureLink RNA Mini Kit、Life technologies) を用いて行った。

4. 研究成果

得られた結果は次のとおりである。

1) 細胞生存率試験と細胞毒性試験

C3A を用いる細胞生存率試験では LPE 18:2 を添加してから 24 時間後の各刺激群におけるコントロール群に対する細胞生存率はそれぞれ 0.2 μ M LPE 18:2 では 118.8% \pm 11.0%、2 μ M LPE 18:2 では 114.4% \pm 6.1%、20 μ M LPE 18:2 では 117.7% \pm 8.3%、200 μ M LPE 18:2 では 125.3% \pm 15.0%であった (各群 n = 6)。細胞生存率は LPE 高濃度になるに従ってわずかに増加した。これらのデータは、LPE 18:2 が C3A 細胞に対して細胞毒性を引き起こさないことを示唆している。

2) LPE が肝細胞内の脂肪蓄積への影響

C3A 細胞にそれぞれ濃度の 0.2、2、20、200 μ M の LPE 18:2 を添加し、24 時間後の Oil Red O 染色の結果及び Oil Red O 抽出液の吸光度測定の結果を示した。0.2-200 μ M の全ての LPE 添加群において脂肪滴の形成が確認された。また、Oil Red O の抽出液の吸光度を測定した結果では、コントロール群と比較して、2-200 μ M LPE 18:2 添加群で脂肪滴が形成された。さらに、それらの脂肪滴量は、添加した LPE 18:2 の濃度依存的に上昇した。

3) Orbitrap 質量分析計による細胞内脂質の網羅的解析

LPE (20 μ M) を C3A 細胞に添加し、24 時間後の細胞内各脂質の網羅的解析を行った (Yamamoto, et al. *Nutrients* 2022, 14(3), 579)。トリグリセリド (TAG) の網羅的解析の結果では、51 分子種が検出された。有意差のあった分子種では、コントロール群と比較して LPE 18:2 添加群で大半の分子種が増加し、特に TAG 54:4 に着目すると、アシル基の構成成分として 18:2 が検出された。さらに、有意差のあった分子種のうち、増加量がコントロール群と比較して LPE 添加群で 2 倍以上と顕著だった分子種は 14 種あった。Cholesterylester (CE) の網羅的解析も行い、cholesteryl linoleate (CE 18:2) がコントロール群と比較して LPE 18:2 添加群で有意に増加した。

Phosphatidylethanolamine (PE) の網羅的解析結果では、コントロール群と比較して LPE 18:2 刺激群で PE 34:3、36:3、38:7、40:8、44:12 が有意に増加し、特に PE 36:3 と PE 40:8 のアシル鎖には 18:2 が検出された。LPE の網羅的解析結果では、LPE 18:2 が顕著に増加した。また、LPE 16:0、20:4 が有意に低下した一方で、LPE 18:1、LPE 22:6 は有意に増加した。

4) LPE が脂質代謝に関連する遺伝子への影響

LPE が細胞の脂質代謝への影響を調べるために、トリグリセリドの異化作用 (ATGL)、トリグリセリドの合成 (DGAT1)、脂肪酸合成 (SREBP1 および SCD1)、および脂肪酸取り込みに関与するいくつかの遺伝子の発現を分析した。コントロール群と LPE 18:2 添加群における各標的遺伝子の発現量の結果を示した。コントロールに対する LPE 添加

群における遺伝子の発現量が ATGL、SREBP1、SCD1 では有意に低下し、DGAT1 では有意差は見られなかった (<https://doi.org/10.3390/nu14030579>)。

ATGL は脂肪滴の主な構成成分である TAG を加水分解し、ジアシルグリセロール(DAG)へ変換する酵素であり、一方、DGAT1 は DAG をアシル化し、TAG を合成する酵素である。細胞に取り込まれた LPE は脂肪酸 FA 等に分解され、その脂肪酸は TAG や CE などに代謝され、ATGL の低下による TAG の分解抑制のために TAG の蓄積が起こると考えられた。また、SCD1 が低下しており、1 価不飽和脂肪酸の供給が低下したことが示唆され、TAG や CE の増加は、添加した LPE 18:2 に由来した可能性が高いと考えられる。本研究では補給 LPE が脂肪分解を抑制し肝細胞の脂肪滴形成に関与していることを明らかにした (<https://doi.org/10.3390/nu14030579>)。LPE は脂肪肝の誘発において病理学的役割を果たしている可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Nao, Sakurai Toshihiro, Yamamoto Yusuke, Chiba Hitoshi, Hui Shu Ping	4. 巻 48
2. 論文標題 Profiling of lysophosphatidylethanolamine molecular species in human serum and in silico prediction of the binding site on albumin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioFactors	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biof.1868	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 Yamamoto Yusuke, Sakurai Toshihiro, Chen Zhen, Inoue Nao, Chiba Hitoshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 14
2. 論文標題 Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 579 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14030579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wu Y, Chen Z, Jia J, Chiba H, Hui SP	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative and Comparative Investigation of Plasmalogen Species in Daily Foodstuffs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods10010124	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 Sakurai T, Chen Z, Yamahata A, Hayasaka T, Satoh H, Sekiguchi H, Chiba H, Hui SP.	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 A mouse model of short-term, diet-induced fatty liver with abnormal cardiolipin remodeling via downregulated Tafazzin gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Food Agric	6. 最初と最後の頁 jsfa.11144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.11144	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 Tamai Y, Chen Z, Wu Y, Okabe J, Kobayashi Y, Chiba H, Hui SP, Eguchi A, Iwasa M, Ito M, Takei Y	4. 巻 135
2. 論文標題 Branched-chain amino acids and l-carnitine attenuate lipotoxic hepatocellular damage in rat cirrhotic liver.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 111181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2020.111181	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 Yamamoto Y, Sakurai T, Chen Z, Furukawa T, Gowda SGB, Wu Y, Nouse K, Fujii Y, Yoshikawa Y, Chiba H, Hui SP	4. 巻 413
2. 論文標題 Analysis of serum lysophosphatidylethanolamine levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal Bioanal Chem	6. 最初と最後の頁 245-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-02996-9	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 Chen Z, Liang Q, Wu Y, Gao Z, Kobayashi S, Patel J, Li C, Cai F, Zhang Y, Liang C, Chiba H, Hui SP	4. 巻 16
2. 論文標題 Comprehensive lipidomic profiling in serum and multiple tissues from a mouse model of diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11306-020-01732-9	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 Fuda H, Miyanaga S, Furukawa T, Umetsu S, Joko S, Roan Y, Suzuki H, Hui SP, Watanabe M, Chiba H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Flazin as a Promising Nrf2 Pathway Activator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem	6. 最初と最後の頁 12844-12853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b04600.	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 Tsukui Takayuki, Chen Zhen, Fuda Hirotooshi, Furukawa Takayuki, Oura Kotaro, Sakurai Toshihiro, Hui Shu-Ping, Chiba Hitoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Novel Fluorescence-Based Method To Characterize the Antioxidative Effects of Food Metabolites on Lipid Droplets in Cultured Hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 9934 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b02081	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 恵 淑萍, 布田博敏, 千葉仁志	4. 巻 269
2. 論文標題 脂肪蓄積とマガキから抽出した抗酸化物質	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 814-815
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 Yamamoto Y, Furukawa T, Takeda S, Kashida H, Chiba H, Hui SP	4. 巻 216
2. 論文標題 Examining the effect of regioisomerism on the physico-chemical properties of lysophosphatidylethanolamine-containing liposomes using fluoro probes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 9-16
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17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nao Inoue, Siddabasave Gowda B. Gowda, Divyavani Gowda, Toshihiro Sakurai, Rahef Mesfin Ketema, Atsuko Ikeda, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui
2. 発表標題 Determination of plasma lysophosphatidylethanolamine levels in preadolescent children
3. 学会等名 6th FHS International Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 夏緒、Bomme Gowda Siddabasave Gowda、Divyavani Gowda、櫻井 俊宏、Rahel Mesfin Ketema、池田 敦子、千葉 仁志、惠 淑萍
2. 発表標題 学童の血中リゾホスファチジルエタノールアミン濃度と肥満との関連
3. 学会等名 第63回日本臨床化学会 年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上夏緒、櫻井俊宏、千葉仁志、惠 淑萍
2. 発表標題 主要なリゾホスファチジルエタノールアミンのアルブミン薬物結合サイトに対する結合 親和性の比較
3. 学会等名 第62回年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 夏緒、櫻井 俊宏、千葉 仁志、惠 淑萍
2. 発表標題 ヒト血中リゾホスファチジルエタノールアミンのプロファイルとアルブミンとの結合予測
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会 年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 祐輔、櫻井 俊宏、陳 震、Wu Yue、藤井 佑樹、能祖 一裕、千葉 仁志、惠 淑萍
2. 発表標題 健常者及び非アルコール性脂肪性肝疾患患者の血清中LysoPEプロファイル
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉 仁志, Siddabasavegowda B. Gowda, 布田 博敏, 津久井 隆行, 惠 淑萍
2. 発表標題 Nrf2介在抗酸化物質と考えられるn-3脂肪酸由来脂質の発見
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関島 将人, 櫻井 俊宏, 佐藤 浩志, 何 欣蓉, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 サケ白子抽出物の培養ヒト肝細胞におけるミトコンドリア活性化作用
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 朱音, 櫻井 俊宏, 関島 将人, 山端 ありさ, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 酸化HDLにより誘導された肝細胞過酸化脂質プロファイルの変動
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 74. 山端 ありさ, 櫻井 俊宏, 関島 将人, 上野 朱音, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 酸化HDLの肝脂質代謝及びミトコンドリアへの影響
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 75. 櫻井 俊宏, 高橋 祐司, 藤井 佑樹, 能祖 一裕, 太田 素子, 伊藤 康樹, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 NASH鑑別マーカーとしての血中LDL-TG値の有用性
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 布ふた田 博ひろとし敏, 窪田 航, 上甲 紗愛, 渡邊 貢, 武田 晴治, 惠 淑萍, 千葉 仁志
2. 発表標題 ヒト腎近位尿管上皮細胞を用いたマガキ由来抗酸化物質の抗酸化能
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 佑介, 櫻井 俊宏, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 HK-2 細胞における脂肪滴とカルジオリピンの関連性についての検討
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井 俊宏, 関島 将人, 田村 宥人, 仲門 菜月, 津久井隆行, 布田 博敏, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎発症に対する酸化HDL の関与
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 祐輔, 櫻井 俊宏, 三浦 佑介, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 リゾホスファチジルエタノールアミンの定量系開発のための標準品および内部標準物質の合成
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 惠 淑萍
2. 発表標題 脂肪蓄積と酸化ストレスに関する研究
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本祐輔, 古川 貴之, 櫻田 紘之, 武田 晴治, 惠 淑萍
2. 発表標題 フッ素置換構造を鍵としたリゾリン脂質異性体の合成と物性に関する研究
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会（名古屋）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉 仁志, 布田 博敏, 惠 淑萍
2. 発表標題 食品機能性への臨床化学的アプローチ
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2018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	惠 淑萍 (Hui Shu-Ping) (90337030)	北海道大学・保健科学研究所・教授 (10101)	

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
---------	---------