

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870507

研究課題名(和文)リンパ管を対象とした抗インフラメーキング分子探索とその制御に関する研究

研究課題名(英文) Identification of food components which change inflammatory responses in the lymphatic system

研究代表者

城内 文吾(Shirouchi, Bungo)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00548018

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)：リンパ脂質輸送とリンパ系の炎症状態に及ぼす食品成分の影響を調べ、脂質輸送と炎症反応との関係解析を試みた。その結果、酸化コレステロール摂取がリンパ液中の炎症性サイトカイン濃度を上昇させること、プテロスチルベン摂取がリンパ液中の炎症性サイトカイン濃度を低下させることを見出した。ホスファチジルコリン(PC)摂取も炎症性サイトカイン濃度を低下させ、この低下にはリンパ脂質輸送変動及びCD3-CD4+細胞の減少が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to explore food components affecting lymphatic levels of lipids and inflammatory cytokines in thoracic lymph duct-cannulated rats. As the results, we found that dietary oxysterols increase lymphatic inflammatory cytokine levels, and that dietary pterostillbene or phosphatidylcholine reduces lymphatic inflammatory cytokine levels in rats. In addition, our results suggest that the reduction of lymphatic inflammatory cytokine levels by dietary phosphatidylcholine contribute to the change of lymphatic lipid transport and the reduction of CD3-CD4+ cells in the lymph.

研究分野：栄養化学

キーワード：リンパ管 リンパ液 炎症 脂質輸送 半永久胸管リンパカニューレション

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで食品成分ならびに薬品成分が食後のリンパ脂質輸送量にどのような影響を与えるかを評価し、脂質輸送量を増減させる化合物を見出してきた。脂質輸送量の変動には、リンパ流量変動に依存または非依存のタイプが存在する。平滑筋と弁を持ち血管構造と近い集合リンパ管(胸管リンパ管もその一つ)におけるリンパ圧は、血管と同様に「リンパ圧 = リンパ流量 × リンパ管抵抗」で説明できるものと考えられる。集合リンパ管壁は、リンパ流によりズリ応力、そしてリンパ圧により法線応力が生じるものと考えられる。このような観点から、リンパ流量の変動や化合物のリンパ輸送量の増減といった物理的刺激の過度な発生は、リンパ管の損傷、炎症のトリガーとなり、ひいては種々の病態発症に対しても影響を与えるのではとの着想を得た。

2. 研究の目的

炎症は生体内外の有害刺激に対する生体防御反応であり、この防御反応の破綻は種々の病態発症につながる。しかし、血管同様に全身に張り巡らされているリンパ管(リンパ系)の炎症が種々の病態に影響を与えるという知見、リンパ液中の炎症状態を評価した知見は見受けられない。本研究では、リンパ脂質輸送とリンパ系の炎症状態に及ぼす食品成分の影響を調べ、脂質輸送と炎症反応との関係解析を試み、リンパ系炎症応答と種々の病態発症との関係についての基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 磁気ビーズ抗体を用いた Multiplex assay system (MAGPIX[®]) によるリンパ液中のサイトカイン定量の検討

(2) リンパ液からの免疫担当細胞の分離ならびにフローサイトメーター解析の検討

末梢血からの免疫担当細胞の分離には、Ficoll 溶液が用いられる。Ficoll 溶液中のリンパ液からの免疫担当細胞の分離、細胞表面マーカーに結合する蛍光標識モノクローナル抗体で多重染色を行い、フローサイトメーターでの解析を検討した。

(3) 半永久胸管リンパカニューレーション手術を施したラットを用いたリンパ液中サイトカイン濃度を変動させる食品成分の探索

本研究では、無麻酔・無拘束下でリンパ液を採取できる半永久胸管リンパカニューレーション手術を施した Sprague-Dawley (SD) 系ラットを用いた。手術を施したラットに、種々の食品成分を含む食餌を摂取させ、7 時間にわたりリンパ液を採取した。リンパ液中の各種脂質濃度は、酵素法、化学法及びガスクロマトグラフィーにより測定した。リンパ液中の 27 種類のサイトカイン濃度は、磁気

ビーズ抗体 (Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Premixed 27 Plex, Merck, Millipore) を用いた MAGPIX[®] により定量した。また、各サイトカイン濃度に対して、複数の脂質パラメーターの影響度合いを解析するためにステップワイズ法による変数選択を用いた重回帰分析 (SPSS Statistics ver. 22.0, IBM) を行った。なお、本動物実験は、九州大学動物実験委員会による動物実験計画書の審査ならびに承認を得て実施した。

酸化コレステロール摂取がリンパ液中サイトカインプロファイルに及ぼす影響

酸化コレステロール (OC) は、コレステロールを加熱後、アセトンで溶出溶媒としたシリカゲルのオープンカラムクロマトグラフィーにより分取した。得られた OC は 10 種類の混合物であった。ラットのリンパ液採取時に用いた OC 食は、食餌脂肪 10%、OC 0.075% を添加したものであった (Control 食は OC を含まない)。

β-オクサステアリン酸摂取がリンパ液中サイトカインプロファイルに及ぼす影響

β-オクサステアリン酸 (PT) は天然に存在するレスベラトロールのアナログであり、抗炎症・抗酸化作用を有することが知られている。ラットのリンパ液採取時に用いた PT 食は食餌脂肪 10% とし、PT を 5mmol/kg diet で添加したものであった (Control 食は PT を含まない)。

大豆及び卵黄由来ホスファチジルコリン摂取がリンパ液中サイトカインならびに免疫担当細胞プロファイルに及ぼす影響

食事脂質の 3~8% を占めるリン脂質 (PL) は、トリアシルグリセロール (TAG) とは異なる生理機能を発揮することが知られている。食事 PL の大部分をホスファチジルコリン (PC) が占める。ラットのリンパ液採取時に用いた食餌は、Control 食が食餌脂肪 (TAG のみ) 10%、食餌脂肪の 3 割を大豆由来 PC (Soy PC 食) あるいは卵黄由来 PC (Egg PC) で置き換えたものであった。

4. 研究成果

(1) 磁気ビーズ抗体を用いた Multiplex assay System (MAGPIX[®]) によるリンパ液中のサイトカイン定量の検討

リンパ液をサンプルとして MAGPIX[®] に供した場合、リンパ液に微量に存在するフィブリンがノズルを詰まらせ、測定ができなくなることが分かった。そこで、各 well の測定間における洗浄工程 (洗浄溶液及び洗浄回数) を検討し、リンパ液サンプルでの測定を可能にした。27 種類のサイトカインのリンパ液中の濃度を一斉定量し、CV 値を評価したところ、低いもので 1.2% (Eotaxin)、高いもので 18.0% (G-CSF) であり、検出限界を除くと 26 種類の測定が可能となった。

(2) リンパ液からの免疫担当細胞の分離ならびにフローサイトメーター解析の検討

ラットの末梢血から免疫担当細胞を分離する際に使用される Ficoll 溶液 (Ficoll-Paque PREMIUM, density 1.084 g/ml, GE Healthcare) で、ラットのリンパ液からも免疫担当細胞を含む画分を得ることができた。得られた細胞画分を細胞表面マーカーに結合する蛍光標識モノクローナル抗体 (FITC anti-rat CD3 antibody, APC/Cy7 anti-rat CD4 antibody, PE anti-rat CD8a antibody, APC anti-rat CD45RA antibody, BioLegend) で多重染色後、フローサイトメーター (SH800, Sony) に供することで、リンパ液中の免疫担当細胞プロファイルが解析できた。

(3) 半永久胸管リンパカニキュレーション手術を施したラットを用いたリンパ液中サイトカイン濃度を変動させる食品成分の探索

OC 摂取がリンパ液中サイトカインプロファイルに及ぼす影響

OC 摂取は、OC を除く他の脂質のリンパ輸送に影響を与えない一方で、21 種類のサイトカイン濃度を有意に上昇させた。変動したサイトカインの多くが動脈硬化症と関連のあるサイトカインであり、OC 摂取により Th1/Th2 バランスは Th1 優勢にシフトしており、炎症状態にあることが示唆された。

PT 摂取がリンパ液中サイトカインプロファイルに及ぼす影響

PT 摂取はリンパ脂質輸送量に影響を与えず、リンパ液中 IL-17A (炎症性サイトカイン) 濃度及び TBARS 濃度を有意に低下させ、リンパ系においても PT の抗炎症・抗酸化作用が確認された。

Soy PC 及び Egg PC 摂取がリンパ液中サイトカインならびに免疫担当細胞プロファイルに及ぼす影響

PC 摂取は、TAG 輸送量には影響を与えず、リン脂質輸送量は増加傾向を示した。また、リンパ液中の数種の炎症性サイトカイン濃度が、PC とくに Soy PC 摂取により低下した。RANTES 濃度はリン脂質輸送量との間に有意な負の相関が認められた。Th1 細胞より産生されるサイトカイン濃度についての重回帰分析より、リン脂質画分の脂肪酸が Th1 サイトカイン濃度の予測因子となることが分かった。また、PC とくに Soy PC 摂取により、リンパ液中の CD3-CD4+細胞の減少も認められ、この変化もサイトカイン濃度変動に影響していることが示唆された。

以上より、食品成分によりリンパ系の炎症状態が変動することが示された。変動が認められた炎症性サイトカインの多くが、動脈硬化症に関連するものであり、リンパ系の炎症状態が脈管系 (血管やリンパ管) 疾患の発症

に関わる可能性が示された。今後は、リンパ系の慢性炎症状態が種々の疾患発症に関わるか、より詳細な解明を続けていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Shirouchi B, Kashima K, Horiuchi Y, Nakamura Y, Fujimoto Y, Tong LT, Sato M. 27-Hydroxycholesterol suppresses lipid accumulation by down-regulating lipogenic and adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. *Cytotechnology*, in press, Doi:10.1007/s10616-016-9962-5, 2016, 査読有.

城内文吾. 生理的環境下における食事脂質の吸収評価. *オレオサイエンス (Oleoscience)*, 14, 158-162, 2014, 査読有.

[学会発表] (計 14 件)

城内文吾, 河内明日香, 有馬優子, 佐藤匡央. ホスファチジルコリン摂取によるリンパ液中サイトカイン濃度変動およびその作用機構. 第 6 回機能油脂懇話会 (第 17 回 CLA 懇話会), 2015 年 11 月 14 日, 明治大学駿河台キャンパス (東京都千代田区).

有馬優子, 城内文吾, 馬場龍栄, 永尾晃治, 柳田晃良, 佐藤匡央. レスベラトロールおよびそのアナログであるプテロステルベンは異なる経路を介して動脈硬化症の進展を抑制する. 平成 27 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2015 年 10 月 31 日, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県那覇市).

有馬優子, 河内明日香, 城内文吾, 佐藤匡央. レスベラトロール及びプテロステルベンが食後の脂質吸収及び炎症ステータスに及ぼす影響. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015 年 6 月 27 日, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市).

Shirouchi B, Kawauchi A, Furukawa Y, Arima Y, Sato M. Effects of dietary phosphatidylcholine on postprandial lymphatic inflammatory cytokine levels in rats. ACN2015 (12th Asian Congress of Nutrition), 2015 年 5 月 15 日, Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan).

河内明日香, 城内文吾, 古川裕美子, 佐藤匡央. ホスファチジルコリン摂取がリンパ脂質動態及びサイトカイン濃度と

える影響 .平成 26 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会, 2014 年 10 月 12 日, 熊本県立大学(熊本県熊本市).

城内文吾 . 食事脂質のリンパ輸送とリンパ液中の炎症応答の関係 . 日本油化学会第 53 回年会(招待講演), 2014 年 9 月 10 日, ロイトン札幌(北海道札幌市).

Shirouchi B, Kawauchi A, Furukawa Y, Arima Y, Sato M. Dietary phosphatidylcholine reduces lymphatic inflammatory cytokine levels in thoracic lymph-duct cannulated rats. 1st Asian Conference on Oleo Science (ACOS2014), 2014 年 9 月 8 日, Royton Sapporo (Sapporo, Japan).

城内文吾, 松岡亮輔, 川村沙也佳, 馬場さなえ, 白武佐和子, 永田和子, 友寄博子, 今泉勝己, 佐藤匡央 . 卵白タンパク質摂取は腸管での物理化学的特性を介して食事脂質のリンパ輸送を低下させる . 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 6 月 1 日, 酪農学園大学(北海道江別市).

Shirouchi B, Sato M. Lymphatic lipid transport regulated by dietary components and drug. 105th AOCS Annual Meeting & Expo, A Joint World Congress with the Japan Oil Chemists' Society (Invited speaker), 2014 年 5 月 7 日, Henry B. Gonzalez Convention Center (San Antonio, USA).

城内文吾, 古川裕美子, 河内明日香, 中村有理, 佐藤匡央 . 半永久胸管リンパカニューレションを施したラットにおける食事ステロイドのリンパ吸収及びリンパ液中サイトカイン濃度に対するエゼチミブの影響 . 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市).

古川裕美子, 城内文吾, 河内明日香, 中村有理, 佐藤匡央 . 食事酸化コレステロールのリンパ吸収におけるコレステロール吸収阻害剤の影響 . 平成 25 年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会, 2013 年 10 月 19 日, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市).

Shirouchi B, Nakamura Y, Furukawa Y, Kawauchi A, Imaizumi K, Sato M. Dietary lipid dynamics in the thoracic lymph regulated by food components and drug in the intestinal lumen. IUNS 20th International Congress of Nutrition, 2013 年 9 月 18 日, Granada Conference and Exhibition Centre

(Granada, Spain).

城内文吾, 古川裕美子, 河内明日香, 中村有理, 佐藤匡央 . 食事酸化コレステロールの吸収ならびに体内蓄積に及ぼすエゼチミブの影響 . 日本油化学会第 52 回年会, 2013 年 9 月 3 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市).

河内明日香, 古川裕美子, 城内文吾, 佐藤匡央 . 脂質のリンパ輸送に対する卵黄ホスファチジルコリンの影響 . 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 2013 年 7 月 6 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/nutrchem/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

城内 文吾 (SHIROUCHI, Bungo)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号 : 0 0 5 4 8 0 1 8