

血中エクソソームを介したコリンの栄養機能の実証

東京農工大学大学院農学研究院・教授 三浦 豊

■ 緒 言

コリンは4級アンモニウムイオンのトリメチルアミノメタノールであり、乳や卵に豊富に含まれていることが知られている。現在、我が国ではコリンは栄養素として扱われておらず、食品成分表への記載もなく、食事摂取基準も定められていない。しかし米国ではコリンの摂取基準が定められており、食品への含量表示も行われている¹⁾。我が国の国民の健康長寿のためにもコリンの栄養素としての重要性を明らかにし、食品成分表への収載と摂取基準を定めることは重要であり、本研究がその端緒となることを目指した。具体的に成長期および妊娠期にあるラットを用い、食事性コリンの影響を血中エクソソームとの関連から明確にすることで、コリンの栄養素としての重要性を明確にすることを目的とした(なおエクソソームの名称について、最近エクソソーム、分泌小胞、アポトーシス小体など細胞が分泌する小胞を細胞外小胞という総称で呼ぶことが提唱された。本研究で調製しているエクソソームは厳密にはエクソソームだけでなく他の小胞も含んでいるため細胞外小胞と記述することが正しいが、申請書作成時点の記述に従いエクソソームの名称のまま記すこととした)。エクソソームとは細胞が分泌する直径 100 nm 程度の膜小胞であり、内部に mRNA、miRNA などを含有する細胞間情報伝達因子である。対照である通常食に加えて、コリン欠乏およびコリン過剰状態でラットを長期間飼育した後、血中エクソソームを調製し、培養細胞系による機能の検証とエクソソーム中 miRNA の網羅的解析を実施した。

■ 方 法

(1)成長期のラットに対する作用の検討

1-1)飼育計画

実験動物として4週齢のWistar系雄性ラット(日本SLCより購入)を用いた。1週間の予備飼育の後、ラットを4群に分け、1群にはAIN93G準拠の20%カゼイン食を摂取させ、対照群とした。残る3群には、それぞれAIN93Gよりコリンを抜いたコリン欠乏食(DまたはDefと記載、 β コーンスターチで補正)、20%カゼイン食に0.196%となるようにグリセロホスホコリン(GPCと記載、株式会社日油)を添加したGPC食および0.727%となるようにホスファチジルコリン(PCと記載、辻製油株式会社)を添加したPC食を3週間自由摂取させた。なお、GPC食およびPC食ではコーンオイルで補正を行った。GPCならびにPCの添加量は、以下のように決定した。GPCはヒト試験で1,000mg/日摂取で生理機能が確認されている²⁾ことから、ヒトとラットの体重ならびに平均1日食餌摂取量をもとに計算した。PCについては、GPC食とコリン含量が等molになるように調製した。

3週間の試験の後、ラットを麻酔下で開腹し、下向大静脈より全採血し、血清を調製した。生化学検査用に一部の血清を分注し、残りを血中エクソソーム調製に使用した。

1-2)血中エクソソームの調製

血清からのエクソソームの調製は以下のように行った。調製した血清を3,000 × g、20分の遠心2回に供したのち、遠心上清を100,000 × g、60分の超遠心に供した。遠心上清を取り除いた後、沈殿をリン酸緩衝液(PBS)で懸濁後、同条件の超遠心を繰り返し、最終的に得られた沈殿をPBSで懸濁して、エクソソームとした。調製したエクソソームの確認はエクソソームマーカーであるHSP70とCD81の存在により行った(data not shown)。

1-3)エクソソームの機能解析

調製したエクソソームを培養細胞に添加して、その機能を検討した。具体的にはL6筋管細胞とマクロファージ様細胞RAW264.7の培地にエクソソームを添加し、48時間培養後、それぞれグルコース消費能(グルコース取り込みと代謝の合算)およびリポ多糖刺激時のTNF- α 産生能への影響を既法に従い、測定した^{3, 4)}。

1-4) エキソソーム中の miRNA の網羅的解析

エキソソーム中の RNA を市販のキット (Total exosome RNA & Protein isolation kit, Thermo Fisher Scientific) を用いて調製した。調製した RNA 中の miRNA はフィルジェン社に依頼し、GeneChip™ miRNA 4.0 Array を用いて解析した。

1-5) 生化学的解析

調製した血清中の各種生化学指標については、一部を市販のキットで、残りをオリエンタル酵母工業株式会社に依頼して測定した。

(2) 妊娠ラットに対する作用の解析

妊娠初期の Wistar ラットを購入し、1) に示した食餌のうち対照食、GPC 食、PC 食を出産後 1 週間まで摂取させた。親ラットおよび仔ラットを解剖し、血清および仔ラット胃内の母乳を採取した。親ラット血清および母乳よりエキソソームを上述のように調製し、エキソソームマーカーの確認およびグルコース消費能および TNF- α 産生能への影響を同様に検討した。

(3) 統計解析

実験結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計解析は one-way ANOVA を行った後、Tukey の多重検定により群間比較を行い、P 値が 0.05 より小さいときに統計学的に有意な差があるとした。

■ 結 果

(1) 成長期ラットへの作用

3 週間の実験食摂取期間中の体重変化、食事摂取量、解剖時の肝臓重量を図 1 および表 1 に示した。体重および食事摂取量において GPC 群が他の 3 群に比べてわずかに大きな値を示したものの、4 群間に統計学的に有意な差は見られなかった。また肝臓重量にも差がなかった。

血清生化学指標についてはアルブミン濃度、グロブリン濃度、血糖値、尿酸値、中性脂肪濃度、遊離脂肪酸濃度に群間の差はなかった (表 2)。既報ではコリン欠乏時に脂肪肝が誘導され、脂質異常症が起きることが知られているが、今回の実験では GPC 群において、リン脂質濃度、総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度、LDL-コレステロール濃度がコリン欠乏群 (総コレステロール濃度については他の 3 群) に対して有意に高い値を示した (表 2)。今回は肝臓脂質は測定していないが、解剖時の視認ではコリン欠乏群で肝臓が明らかに白っぽくなっており、脂肪肝が惹起されていることを確認している。

各群の血清から調製したエキソソームの L6 筋管細胞におけるグルコース消費能を測定したところ、PC 食群ラット由来のエキソソーム添加時に対照群よりも有意に高いグルコース消費能が観察された (図 2A)。また RAW264.7 細胞での TNF- α 産生能については、統計学的に有意ではないものの、PC 食群由来エキソソームが TNF- α 産生能を抑制する傾向が観察された (図 2B)。

エキソソーム中の miRNA の網羅的解析では、対照群をコントロールとして 2 倍以上の増減が見られた miRNA の数は、欠乏群で 213 個 (増加 62 個、減少 151 個)、GPC 群で 193 個 (増加 103 個、減少 90 個)、PC 群で 197 個 (増加 80 個、減少 117 個) となった (図 4)。変化が見られた miRNA のいくつかについて、データベースで解析したところ、肝臓疾患に関わるものや抗炎症に関わる可能性のあるものが含まれていたことから、コリン欠乏および添加食の摂取によるエキソソームの機能変化の少なくとも一部が含有される miRNA の変化によるものである可能性が示唆された。

(2) 妊娠ラットでの作用

妊娠および授乳期間中に PC 食および GPC 食を摂取した際の体重変化と食餌摂取量には有意な差は見られなかった (結果は示さず)。母ラット血清および母乳から調製したエキソソームについて、1) と同様にグルコース消費能および TNF- α 産生能への影響を検討したところ、PC 食摂取母ラット血清由来エキソソーム添加時に他の 2 群と比べて有意に高いグルコース消費能が観察された (図 3A)。一方 RAW264.7 細胞の TNF- α 産生能については PC 食群の母乳由来エキソソームが他の群よりわずかに低い値と示したものの、すべての群間で有意な差は見られなかった (図 3B)。この実験では調製できたエキソソームの量に限りがあったため、十分な解析が行えなかった。

■ 考 察

コリンについては、欠乏時に脂肪肝が誘導される、過剰摂取時に体臭の変化が起きるなどの欠乏症と過剰症が報告されているが、その栄養学的特性はあまり理解されていない。コリンの重要性については、神経伝達物質のアセチルコリンの原料となる、細胞膜やリポタンパク質の構成成分であるホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンの構成成分である、メチル基代謝経路での作用などが知られているが、食事由来コリンがどのような作用をどのような経路で発揮するかについてはほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、主としてコリン欠乏および過剰が血中エキソソームにどのような影響を及ぼすかを検討した。妊娠時及び母乳への影響も検討することを目指したが、妊娠ラットの頭数および採取できた母乳の量に限りがあったため、こちらについては十分な解析はできなかった。したがって、ここでは成長期のラットで得られた結果を中心に考察する。

まず3週間の欠乏および過剰状態が体重等の基礎的指標と血清生化学マーカーに与える影響であるが、食餌摂取量や体重に関しては有意な差は見られなかった。また血清生化学指標についても糖代謝やタンパク質代謝に関する指標については大きな差はなく、3週間のコリン欠乏および過剰は糖代謝やタンパク質代謝に関しては直接的な影響はないものと考えられる。一方脂質関連指標については、これまでのコリンに関する報告と同様に直接的な影響が観察された。具体的には総コレステロール濃度において GPC 食群が他の3群よりも有意に高い値を示し、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質濃度では GPC 食群が欠乏群に比べて有意に高い値を示した。中性脂肪濃度には4群間で有意な差は見られなかった。コリン欠乏群で血中脂質濃度が低い値になった原因として、コリン欠乏群では解剖時に脂肪肝が誘導され、肝臓からの脂質分泌が低下していると推測されること、ヒトでは主要なコレステロールが LDL-コレステロールであるのに対して、ラットは HDL-コレステロールであるという脂質代謝経路の違いの両者が影響していると考えた。またコリンを添加した際の血中脂質濃度への影響が水溶性コリン化合物である GPC で顕著に観察され、脂溶性コリン化合物である PC では観察されなかったことは、食餌性コリンの腸管での消化・吸収過程の違いを示唆しており、非常に興味深い結果である。今回は時間の制約で測定できなかったが、血中のコリン関連化合物濃度を測定することで、食事性コリンを供給する際にどのような形態で与えることが望ましいかに関する知見が得られる可能性が高いため、さらに検討を進める計画である。

次に血中エキソソームへの影響であるが、まず培養細胞を用いた機能検定では、上述の脂質代謝への影響とは異なり、PC 食群でのみ変化が観察された。具体的には PC 食摂取ラット(成長期および妊娠期の両者)の血中エキソソームはグルコースの筋管細胞への取り込みと代謝を有意に促進し、コリンの摂取が間接的に糖代謝に影響している可能性が示唆された。また我々は脂溶性コリン化合物の一つであるスフィンゴミエリンがアトピー様皮膚炎モデルマウスの炎症症状を有意に改善することを報告しており⁵⁾、食事性コリン化合物、特に脂溶性コリンに抗炎症作用があることが予想されていたが、PC 食群由来エキソソームが弱いながらも TNF- α 産生能を抑制する作用を示したことは、食事性コリンの抗炎症作用の少なくとも一部が血中エキソソームの変化を介している可能性を示唆するものである。しかし、この作用は成長期のラットでのみ観察され、妊娠期のラットでは見られていない。先のアトピー様皮膚炎に対する作用も比較的低年齢から発症させたモデルマウスでの結果である。食事由来脂溶性コリンのエキソソームを介した抗炎症作用については、さらなる検討が必要である。

最後にエキソソーム中の miRNA に関する結果であるが、予想以上に多くの miRNA がコリン欠乏および過剰により変化することが明らかとなった。変化が明らかとなった miRNA の数が多く、またその機能が未知であるものが多数含まれていたため、厳密な GO 解析、パスウェイ解析は行えなかったが、いくつかの miRNA が肝臓疾患や抗炎症作用に関与していることが確認されたため、今後これらについて詳細に検討していく必要があると思われる。しかし、今回解析対象とした血中エキソソームは多くの臓器から分泌されたものの総体であり、どの臓器からどのようなエキソソームが、どの程度分泌され血中に存在しているかに関しては全く明らかになっていない。この点を検討しない限り、血中エキソソームの生理的な意義は明らかにならず、ひいては食事性コリンのエキソソームを介した影響を明らかにすることはできない。今後より詳細な検討が必要と考えられ、現在さらに研究を進めている。

■ 要 約

現在栄養素として扱われていないコリンについて、血中エキソソームとの関連から検討したところ、食事性コリン、特に脂溶性コリンがエキソソームの変化を介してその生理作用を発揮している可

能性を示唆する結果を得ることができた。これらの結果は栄養学的に新しい知見であり、今後のコリン研究の進展が期待される。

■ 文 献

- 1) 日比野英彦、大久保剛、*J.Lipid Nutr.*, 26, 89-106, 2017
- 2) Kawamura T, Okubo T, Sato K, Fujita S, Goto K, Hamaoka T and Iemitsu M, *Nutrition*, 28, 1122-1126, 2012
- 3) Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y and Yagasaki K, *Phytomedicine*, 16, 437-443, 2009
- 4) Komatsu W, Miura Y and Yagasaki K, *Nutr. Cancer*, 43, 82-89, 2002
- 5) Takeshima K, Mori Y, Sakai F, Haruta-Ono Y, Kadooka Y, Yagasaki K, and Miura Y, *J. Func. Foods*, 8C, 53-62, 2014

表 1 体重、食餌摂取量ならびに肝臓重量

	CON	GPC	PC	D
Initial body weight (g/rat)	94.9 ± 1.8	96.5 ± 1.6	96.9 ± 2.0	96.4 ± 1.8
Final body weight (g/rat)	210.9 ± 4.4	216.4 ± 5.7	211.9 ± 4.2	214.2 ± 3.9
Food intake (g/rat)	333.2 ± 6.0	344.1 ± 9.5	336.5 ± 4.8	332.5 ± 5.0
Liver weight (g/rat)	8.6 ± 0.5	9.2 ± 0.7	8.9 ± 0.3	9.0 ± 0.3

CON(n=8), GPC, PC, D(n=6)の平均値±標準誤差を示す。各群間に有意差なし

表 2 血清生化学指標

	CON	GPC	PC	D
Albumin (g/dL)	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.5	3.9 ± 0.3
Globulin (g/dL)	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.3	2.0 ± 0.2
Glucose (mg/dL)	128 ± 10	128 ± 9	130 ± 8	134 ± 10
Uric Acid (mg/dL)	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2
NEFA (μEq/L)	937.5 ± 135.6	921.5 ± 97.1	969.2 ± 140.5	922 ± 105.4
TG (mg/dL)	94.8 ± 18.3	78.2 ± 7.2	112.3 ± 19.2	116.8 ± 11.0
T-Cho (mg/dL)	100.6 ± 4.3 ^a	120.7 ± 5.6 ^b	95.0 ± 4.7 ^a	81.0 ± 6.4 ^a
HDL-Cho (mg/dL)	36.6 ± 1.1 ^{ab}	40.7 ± 1.4 ^b	36.3 ± 0.9 ^{ab}	34.7 ± 1.9 ^a
LDL-Cho (mg/dL)	7.5 ± 0.3 ^{ab}	9.0 ± 0.7 ^b	7.5 ± 0.4 ^{ab}	6.0 ± 0.8 ^a
PL (mg/dL)	174.1 ± 4.4 ^{ab}	193.3 ± 6.8 ^b	169.3 ± 4.3 ^{ab}	153.8 ± 9.2 ^a

CON(n=8), GPC, PC, D(n=6)の平均値±標準誤差を示す。異なるアルファベットを付した群間で統計学的に有意差あり(P<0.05)。

NEFA：遊離脂肪酸濃度、TG：中性脂肪濃度、T-Cho：総コレステロール濃度、HDL-Cho：HDL-コレステロール濃度、LDL-Cho：LDL-コレステロール濃度、PL：リン脂質濃度

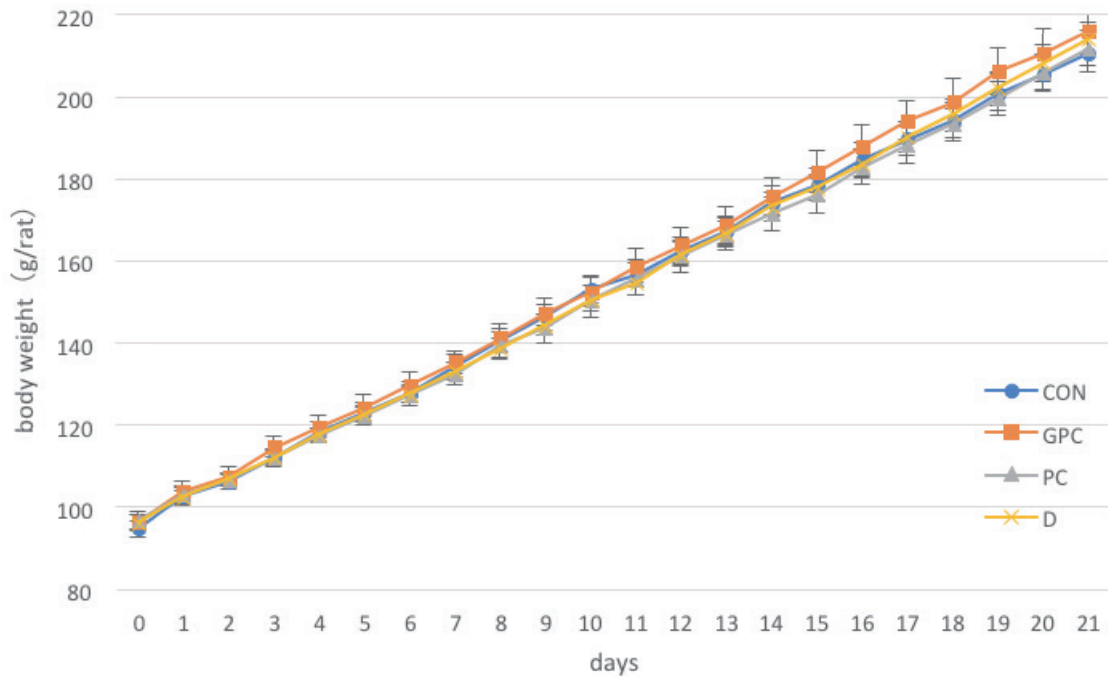
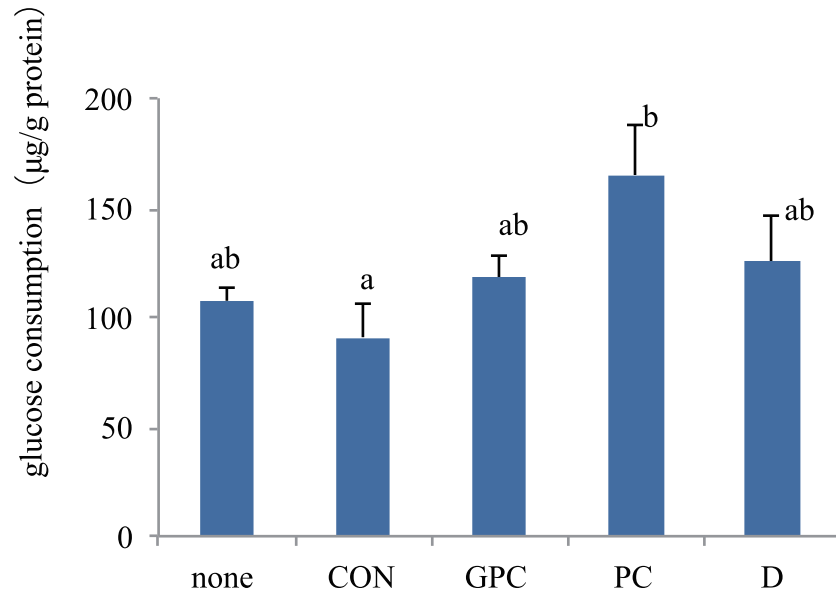


図 1 飼育期間中の体重変化

対照群(CON) (n=8)、他の 3 群(欠乏群：D、GPC 食群：GPC、PC 食群：PC) (n=6)の平均と標準誤差を示す。

A



B

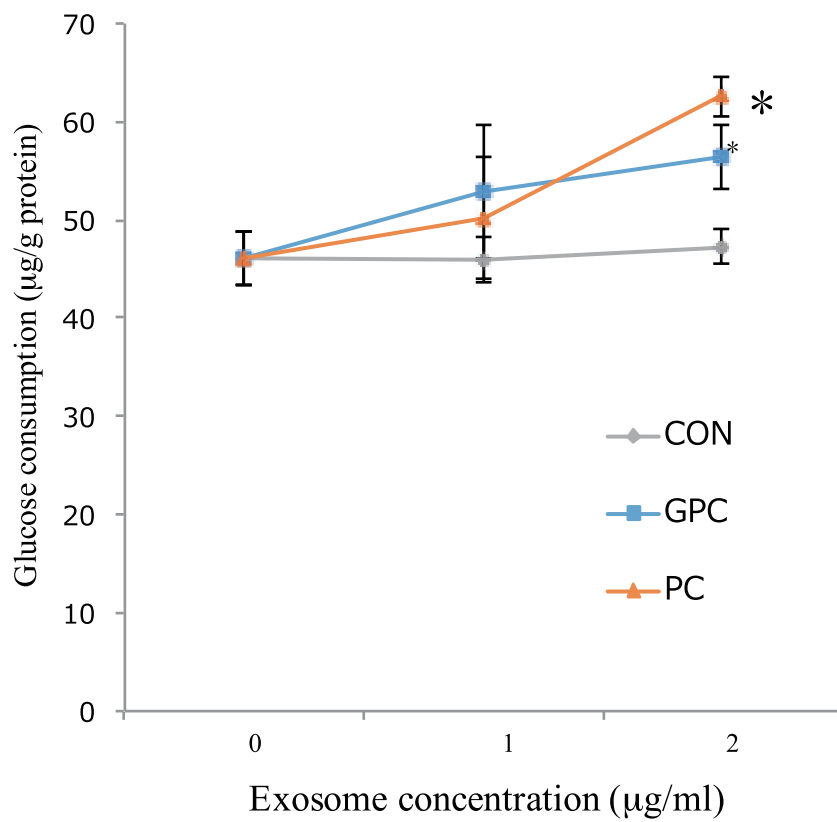
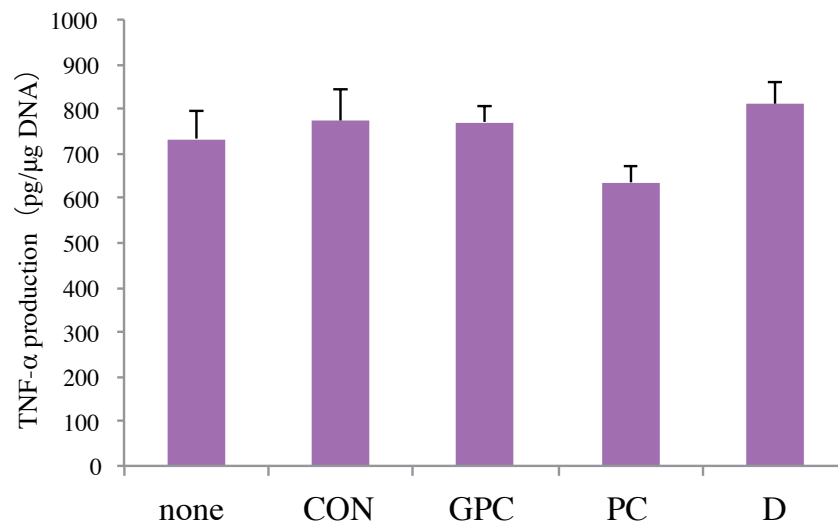


図2 血中エクソソームのL6 筋管細胞のグルコース消費能への作用
 A：成長期ラット血清由来エクソソーム、B：妊娠ラット血清由来エクソソーム
 異なるアルファベットが付された群間で有意差あり(A、 $P<0.05$)、
 *：CON に対して有意差あり(B、 $P<0.05$)

A 成長期ラット血清由来エクソソーム



B ラット母乳由来エクソソーム

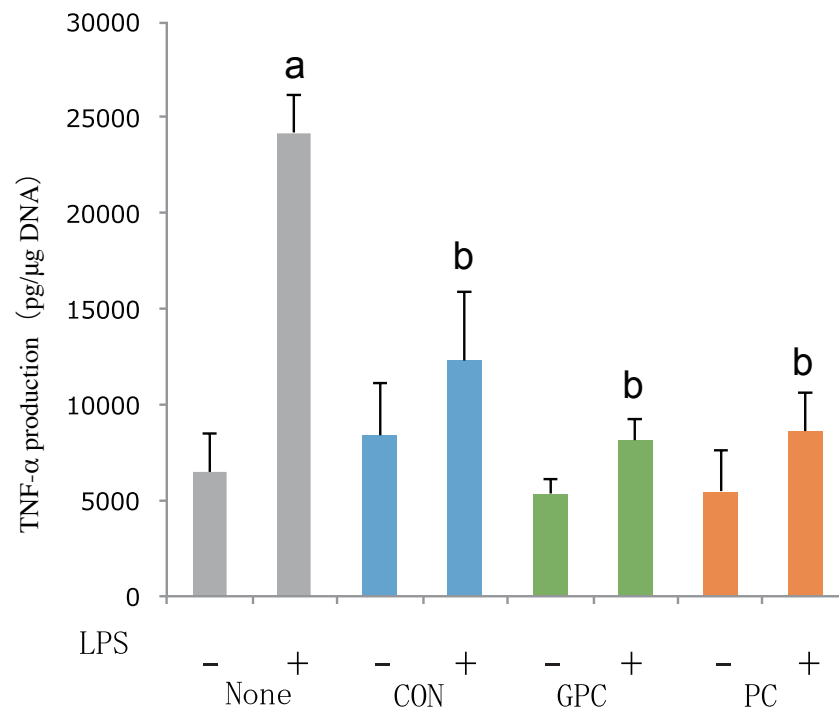


図3 血中および母乳由来エクソソームの RAW264.7 細胞の TNF- α 産生能への作用
None : エクソソーム無添加群、異なるアルファベットを付した群間で有意差あり (P<0.05)

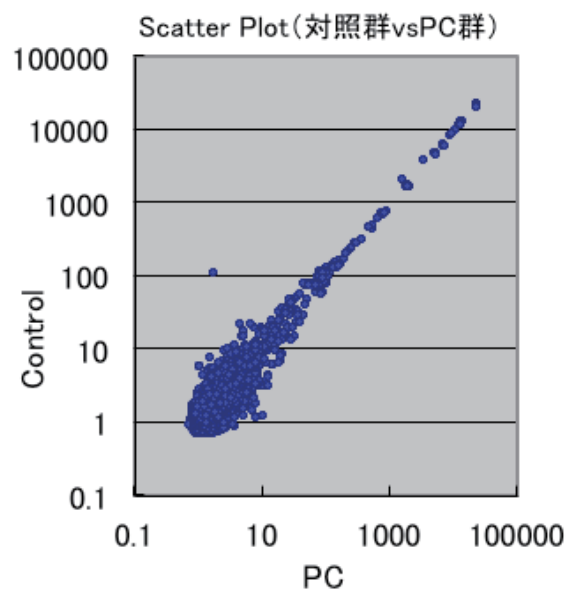
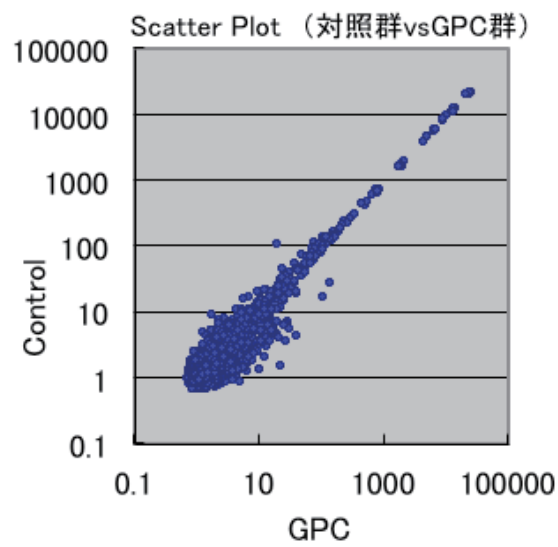
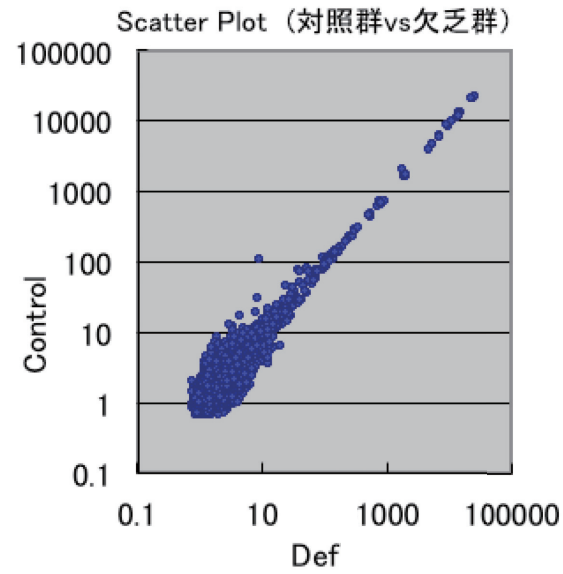


図4 血中エクソソーム中 miRNA の発現解析結果
対照群を縦軸として、横軸に各群を配置した Scatter plot