

酸化コレステロールの挙動に注目した 卵黄リン脂質摂取による脳機能の改善に関する研究

九州大学大学院農学研究院・教授 佐藤 匡央

■ 緒 言

脳内のコレステロールは脳内で合成され、血液からの供給を受けない。脳内の脂質は脳液中でアポリポタンパク質 E (ApoE) に受け渡され、リポタンパク質として細胞間を移動している。アルツハイマー型認知症の遺伝的要因として ApoE 遺伝子の変異が挙げられ¹⁾、近年、アルツハイマー型認知症の発症と脳内の脂質代謝の関連を調べる研究が盛んに行なわれるようになった。アルツハイマー型認知症と関連する重要な脂質成分として、酸化コレステロール分子が注目されつつある。14 種類確認されている酸化コレステロール分子種のうち、脳だけで合成される 24(S)-hydroxycholesterol (24-OH) が少なく、全身のミトコンドリアで合成される 27-hydroxycholesterol (27-OH) が何らかの経路で脳内に流入し増加した場合に、アルツハイマー型認知症の原因物質であるアミロイド β が蓄積することが報告されている²⁾。しかし、どのような条件で 24-OH の合成抑制や 27-OH の脳内への流入増加が起こるかは未解明である。

卵黄には脂質が約 30% 含まれ、さらにその内の 30% 程度がリン脂質である。そのリン脂質の主成分はホスファチジルコリン (PC) であり、卵黄リン脂質の約 85% を占めている。この PC から供給されるコリンは神経伝達物質であるアセチルコリンが合成される³⁾。卵黄摂取による脳機能改善についてはすでに示唆されているが⁴⁾、その脳機能改善作用の主体は神経伝達物質の基質を供給する PC にあると予測される。本研究は、卵黄 PC 摂取による脳機能改善について、脳内の酸化コレステロール分子の挙動に着目して評価することを目的として行った。

■ 方 法

11 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに市販固形飼料 CRF-1 を与えて 13 週間飼育を行い、老化させた。24 週齢に達した後、平均体重が同じになるように各群 8 匹ずつとなるよう群分けした。対照群には、AIN76 組成を基本とする半精製食を与え、卵黄由来 PC を与える群には食餌脂質の一部を卵黄 PC に置換した PC 食を与えた (表 1)。また、PC 食と同様の組成の脂肪酸をトリアシルグリセロール態で摂取する FA 群を設定した (表 2)。卵黄 PC のパルミトオレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2n-6) を基準としてラード、パーム油、コーン油を混合し、不足する脂肪酸分子種 (C16:0、C18:0、C20:4n-6、C22:6n-3) についてはトリパルミチン、トリステアリン、アラキドン酸エチル、ドコサヘキサエン酸エチルを添加した。各食餌を与えて 4 週間飼育後、吸入麻酔下で大動脈採血を行い、血漿 (EDTA 添加) (採血条件に問題があり、対照群および FA 群で血漿サンプルのみ n=7)、脳組織を得た。血漿コレステロール濃度、血漿リン脂質濃度をコレステロール E-テストワコーおよびリン脂質 C-テストワコーを用いて測定した。脳組織より脂質を抽出し、GC-MS により酸化コレステロール分子種の測定を行った。各測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、群間の差は GraphPad (ver.8.3) を用い、Tukey-Kramer 検定にて評価した。

■ 結 果

摂食開始時の体重、摂食量、終体重には群間で有意な差は見られなかった (表 3)。血漿コレステロール濃度は FA 食の摂食により対照群に対して有意に上昇したが、PC 群は対照群と同程度であった (表 4)。血漿リン脂質濃度は PC 食摂食により上昇する傾向 ($P=0.078$) を示したが、FA 群では有意な上昇は見られなかった。酸化コレステロール 14 分子種のうち、9 分子種の存在をラット脳内で確認した (data not shown)。卵黄 PC を摂取した PC 群で 24-OH、4 β -hydroxycholesterol (4 β -OH)、6-ketocholesterol (6-keto)、 α -epoxycholesterol (α -epoxy) および β -epoxycholesterol (β -epoxy) の 5 分子種が対照群と比較して有意に高い脳内濃度を示した。一方、FA 群で対照群と比較して有意に高い濃度を示したのは 4 β -OH のみであった。脳内の 27-OH、25-hydroxycholesterol (25-OH)、7-ketocholesterol (7-keto)、 β -cholestan-triol (β -triol) 濃度には 3 群間で有意な変化は見られなかった。27-OH/24-OH 比を算出した結果、PC 群、FA 群ともに対照群と比較して有意に小さい値であった (図 1)。

■ 考 察

卵黄 PC の摂取により脳内の 5 種類の酸化コレステロール分子種の存在量が増加した。PC 群では血漿コレステロール濃度は上昇していないので、体内のコレステロールプールの増大ではなく、酸化コレステロール産生が増加したと考えるべきである。一方で FA 群では血漿コレステロール濃度が上昇しているので、脳内の酸化コレステロール濃度の上昇はコレステロールプールの増大による可能性が高い。前述した 24-OH の 27-OH に対する比は PC 群・FA 群でともに小さくなり、酸化コレステロールの観点からは脳保護的であることが示唆された。また、PC 群のほうがより小さな比となったため、その効果には卵黄 PC 特異的なものが存在する。PC 群の脳内で特異的に増加した 4 分子種のうち、24-OH は脳に高発現する酵素 CYP46 により生成するため、脳に特異的な変化である。CYP46 は脳内のストレスに応答して発現が上昇するため⁵⁾、24-OH には抗ストレス作用があるとされる。24-OH 濃度の上昇はアルツハイマー型認知症の原因物質である不溶性 β -アミロイドの生成を減少させることで^{2,6)}、アルツハイマー型認知症のリスクを下げる。しかし、脳内のストレス因子増加が CYP46 の発現を誘導するメカニズムは未解明である。TAG 態と比較して PC 態の脂肪酸のほうが脳の細胞膜に取り込まれやすいとの報告があり⁷⁾、卵黄 PC の摂取は PC 自身あるいは結合している脂肪酸により脳内の細胞膜脂質の構成を変えることで、24-OH の産生を誘導した可能性が考えられる。

PC 特異的に増加した酸化コレステロール分子種のうち、6-keto、 α -epoxy、 β -epoxy は自動酸化により生成する。摂取した脂肪酸の組成に目立って大きな変化はなく、リン脂質体として摂取したことが影響している可能性が高い。また、主に肝臓および消化管で酸化されて輸送される 4 β -OH の挙動もこれら 3 分子種の挙動と似通っていたため、これらの分子種は肝臓において酸化され、脳へと輸送されたものと推測できる。27-OH は全身のミトコンドリアで生成されたのち、脳へと輸送される。この 27-OH は 3 群間で同程度であったため、卵黄 PC 摂取や脂肪酸組成の変化では変化しにくいことが明らかとなった。

以上より、卵黄 PC の摂取は脳内の酸化コレステロールバランスを脳機能保護的な組成へと導きうることが示された。

■ 要 約

本研究は、脳機能疾患との関連が指摘される脳内の酸化コレステロール分子の挙動に着目して、卵黄ホスファチジルコリン(PC)摂取による脳機能改善について評価することを目的として行った。24 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットに、食餌脂質の一部を卵黄 PC に置換した PC 食あるいは、PC 食と同様の組成の脂肪酸をトリアシルグリセロール態で摂取する FA 食を与えて 4 週間飼育した。卵黄 PC を摂取したラットの脳内特異的に 24-hydroxycholesterol(24-OH)が増加した。同様の脂肪酸組成の FA 食では 24-OH は増加せず、PC 体としての摂取が肝要であった。脳内の 24-OH の増加はアルツハイマー型認知症の改善との関連が指摘されており、卵黄 PC の摂取は脳内の酸化コレステロールバランスを脳機能保護的な組成へと導きうることを示された。

■ 文 献

1. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA.(1993)Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261(5123), 921-3.
2. Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O.(2009)Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener*. 4, 1.
3. Okuda T, Haga T.(2003)High-affinity choline transporter. *Neurochem Res*. 28(3-4), 483-8.
4. Zhou MM, Xue Y, Sun SH, Wen M, Li ZJ, Xu J, Wang JF, Yanagita T, Wang YM, Xue CH.(2016)Effects of different fatty acids composition of phosphatidylcholine on brain function of dementia mice induced by scopolamine. *Lipids Health Dis*. 15(1), 135.
5. Petrov AM, Pikuleva IA.(2019)Cholesterol 24-Hydroxylation by CYP46A1 : Benefits of Modulation for Brain Diseases. *Neurotherapeutics*. 16(3), 635-648.
6. Famer D, Meaney S, Mousavi M, Nordberg A, Björkhem I, Crisby M.(2007)Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 359(1), 46-50.
7. Yalagala PCR, Sugasini D, Dasarathi S, Pahan K, Subbaiah PV.(2019)Dietary lysophosphatidylcholine-

EPA enriches both EPA and DHA in the brain : potential treatment for depression. J Lipid Res. 60(3), 566-578.

表 1. 食餌組成

	Control	PC	FA
	<i>(g/kg diet)</i>		
Sucrose	449	449	449
Casein	200	200	200
Cornstarch	150	150	150
Cellulose	50	50	50
Lard	100	60	72.9
Corn oil	-	-	8.3
Palm oil	-	-	8.7
Tripalmitin	-	-	6.4
Tristearin	-	-	1.9
Arachidonyl ethyl ester	-	-	1.5
Docosahexaenyl ethyl ester	-	-	0.2
Egg yolk PC	-	40	-
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3
Cholesterol	1	1	1
Choline Bitartrate	2	2	2
Total	1000	1000	1000

表 2. 食餌油の脂肪酸組成

		Control	PC	FA
		(mol%)		
Capric acid	C10:0	0.06	0.04	0.04
Lauric acid	C12:0	0.13	0.08	0.12
Myristic acid	C14:0	1.93	1.23	1.52
Myristoleic acid	C14:1	0.27	0.16	0.20
Pentadecanoic acid	C15:0	0.13	0.11	0.08
Palmitic acid	C16:0	27.84	33.04	31.77
Palmitoleic acid	C16:1	2.75	2.02	2.01
Heptadecanoic acid	C17:0	0.49	0.35	0.35
Heptadecenoic acid	C17:1	-	-	0.05
Stearic acid	C18:0	14.21	12.72	12.76
Oleic acid	C18:1 (n-9)	43.17	37.26	37.69
Linoleic acid	C18:2 (n-6)	8.00	10.70	11.14
γ-Linolenic acid	C18:3 (n-6)	-	0.04	-
α-Linolenic acid	C18:3 (n-3)	0.17	0.14	0.10
Arachidic acid	C20:0	0.33	0.20	0.30
Eicosenoic acid	C20:1	0.15	0.09	0.09
Eicosadienoic acid	C20:2 (n-6)	0.23	0.27	0.27
Dihomo-γ-linolenic acid	C20:3 (n-6)	0.05	0.16	0.15
Arachidonic acid	C20:4 (n-6)	-	1.17	1.15
Docosenoic acid	C22:1 (n-9)	0.09	0.05	0.05
Docosahexaenoic acid	C22:6 (n-3)	-	0.19	0.18
Total		100.00	100.00	100.00

表 3. 成長パラメータ

	Control		PC		FA	
Body weight (g)						
Initial	658.2	± 12.6	655.4	± 11.4	660.3	± 9.2
Final	718.4	± 14.2	715.0	± 10.7	721.9	± 4.6
Gain	60.2	± 5.8	59.5	± 6.1	61.6	± 6.0
Total food intake (g)	691.9	± 7.5	694.9	± 5.4	703.2	± 0.9
Food efficiency (%)	8.7	± 0.9	8.6	± 0.9	8.8	± 0.9

値は平均値±標準誤差 (n = 8/group) で示している。群間で有意差は認められなかった。

表 4. 血漿脂質濃度

	Control		PC		FA	
	(mg/dl)					
Cholesterol	123.2 ±	10.2 ^a	133.8 ±	8.5 ^a	167.0 ±	12.4 ^b
Phospholipids	210.0 ±	16.5	213.8 ±	12.9	256.6 ±	10.6

値は平均値±標準誤差 (n = 7 or 8/group) で示している。異なるアルファベットを伴う群間に P 値 0.05 未満で有意差あり (Tukey-Kramer 検定による)。

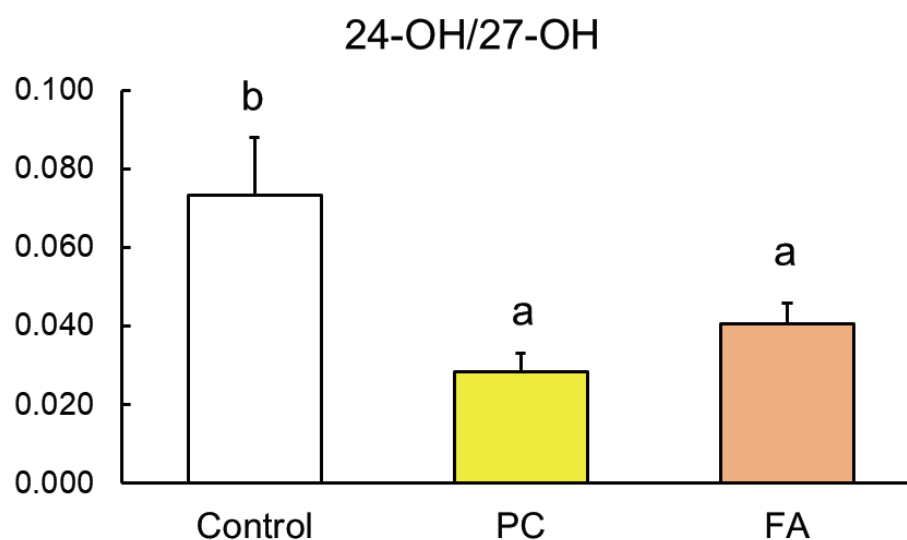


図 1. 脳内 24-hydroxycholesterol/27-hydroxycholesterol 比
値は平均値±標準誤差 (n=8/group) で示している。異なるアルファベットを伴う群間に P 値 0.05 未満で有意差あり (Tukey-Kramer 検定による)。