

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02895

研究課題名(和文)酸化・炎症・脂質代謝のクロストークを標的としたポリフェノールの動脈硬化制御機構

研究課題名(英文)Anti-atherosclerotic action of polyphenols targeting the cross-talk between oxidative stress, inflammation and metabolic disorder

研究代表者

近藤 和雄 (KONDO, Kazuo)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：30153711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：食生活の乱れにより、生体内では『酸化ストレス』、『炎症』、『脂質代謝異常』が引き起こされ、動脈硬化進展が促進する。この酸化・炎症・脂質代謝のクロストークにNrf2、AMPKを介した調節機構が存在する可能性を見出し、本研究では、食品に含まれる抗酸化成分であるポリフェノールに焦点を当て、培養細胞ならびにマウスを用いて、飽和脂肪酸やLPS、サイトカイン刺激下において、これらの調節機構に対して有効に働く成分を探索した。結果として、いくつかのポリフェノールにおいてNrf2、AMPKを介して抗動脈硬化作用を発揮する可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Unbalanced diets may cause oxidative stress, inflammation and metabolic disorder, which accelerate atherosclerosis progression. We focused on the regulatory system for the cross-talk between oxidative stress, inflammation and metabolic disorder through Nrf2 and AMPK pathway, and evaluated the effects of polyphenols by using the cultured cells or mice models. Our study suggests that some polyphenols could improve oxidative stress, inflammation and metabolic disorder induced by saturated fatty acid / LPS / cytokine through, at least in part, Nrf2 and AMPK pathway.

研究分野：動脈硬化、脂質代謝、酸化ストレス

キーワード：ポリフェノール 動脈硬化 酸化ストレス 炎症 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールは植物性の食品に広く含まれており、特に、茶類やコーヒー、野菜、果実等に多く、色や苦味、渋味を供する成分である。申請者は、食品による動脈硬化予防の観点から、ポリフェノールの抗酸化作用に着目し、赤ワインやココアの摂取により LDL の酸化が抑制されることを世界に先駆けて明らかにした。その後は、緑茶やレモン、シソなど、日本人の食生活に重要な食品について、LDL 酸化抑制作用を報告している。さらに、血管炎症に関して、単球と血管内皮細胞の接着を解析する血管生物学的手法を取り入れ、レモンやコーヒーなどに豊富なポリフェノールについて検討し、食品研究の分野ではいち早く、ポリフェノールによる接着抑制作用を見出した。また近年では、レモンやシソのポリフェノールが、肝臓における脂質代謝を調節する作用を有することも明らかにしている。

このように、抗酸化作用から注目したポリフェノールにおいて、直接的な抗酸化作用だけではない様々な抗動脈硬化作用が明らかとなってきた。申請者はその作用メカニズムを解明する中で、これらの作用には共通の調節機構が存在するのではないかとこの着想に至った。その中心的な役割を担う因子として、現在注目しているのが、細胞の酸化ストレスセンサーとして重要な Nrf2 (NF-E2-related factor 2) と、エネルギーセンサーとして働く AMPK (AMP-activated protein kinase) である。Nrf2 は種々の酸化ストレス刺激により活性化され、抗酸化酵素や解毒代謝酵素の発現を誘導し、細胞の恒常性を維持する重要な役割を担っている。AMPK は細胞内エネルギーの減少に反応して活性化し、脂質代謝や糖代謝を調節する働きを持つ。

申請者はこれまでの研究において、血管内皮細胞や単球、マクロファージ、肝臓における酸化ストレス、炎症、脂質代謝異常に対して、Nrf2、AMPK が抑制的に働くことを見出している。非常に興味深いことに、ポリフェノールの中には、これらを活性化させるものがいくつか報告されている。こうした調節機構は、これまで個別に考えられてきた、酸化・炎症・脂質代謝が Nrf2、AMPK を介して相互に関連していることを示唆しており、このクロストークを制御する因子として、ポリフェノールは大いに期待できる。

2. 研究の目的

食生活の乱れにより、これらの調節機構が破綻すると、酸化ストレスの増大、炎症、代謝異常が惹起されると考えられる。そこで本研究では、動脈硬化進展過程において重要な役割を果たす血管内皮細胞や単球、マクロファージ、肝臓において、ポリフェノールの Nrf2、AMPK を介した制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題である『酸化・炎症・脂質代謝のクロストークを標的としたポリフェノールの動脈硬化制御機構』の解明に向けて、以下の流れで研究を実施した。

Nrf2、AMPK の活性化作用を有するポリフェノールの探索

培養細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト単球系細胞株 (THP-1)、マウスマクロファージ株化細胞 (RAW264.7 細胞)、ヒト肝がん由来細胞株 (HepG2) を用いた。Nrf2 の活性化機構として Keap1 の解離、Nrf2 の核移行を western blot により検討した。Nrf2 により発現が調節される因子として、抗酸化酵素である HO-1、NQO1 等の発現を real time PCR、western blot 法により検討した。AMPK 活性化について、AMPK のリン酸化を western blot 法により検討した。AMPK により発現が調節される因子として、血管拡張因子である一酸化窒素合成酵素 (eNOS)、脂質代謝酵素である ACC 等の発現を real time PCR、western blot 法により検討した。

刺激下の細胞における Nrf2、AMPK を介したポリフェノールの抗動脈硬化作用の検討

各細胞に飽和脂肪酸、グルコース、LPS の刺激を行い、酸化ストレス、炎症、代謝異常を誘導し Nrf2、AMPK を介した調節機構が存在するのかを検討した。さらに、ポリフェノールについて抑制効果を検討した。

(1) 血管内皮細胞 × TNF- α / 飽和脂肪酸

HUVEC を用いて、活性酸素種産生、炎症性サイトカイン産生、単球接着、一酸化窒素産生、オートファジーに対するポリフェノールの改善作用を、real time PCR、western blot 法により検討した。さらに、それぞれの刺激において関与が示唆される受容体 (Toll-like receptor 2/4、CD36 等)、シグナル伝達経路 (TLR4/NF- κ B、MAPK、Nrf2、AMPK 等) について検討した。

(2) マクロファージ × 飽和脂肪酸 / LPS

RAW264 細胞を用いて、スカベンジャー受容体発現、炎症メディエーター (iNOS、COX-2) 産生、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生、オートファジーに対するポリフェノールの改善作用を、real time PCR、western blot 法により検討した。さらに、関与が示唆される受容体、シグナル伝達経路 (TLR4/NF- κ B、MAPK、Nrf2、AMPK 等) について検討した。

(3) 肝細胞 × 飽和脂肪酸

HepG2 細胞を用いて、細胞内トリグリセリド・コレステロール蓄積、脂質代謝酵素 (ACC 等)、脂肪酸合成酵素 (FAS) 等の発

現に対するポリフェノールの改善作用を、real time PCR、western blot 法により検討した。さらに、脂質合成に関わる転写因子 (SREBP-1c) について検討した。酸化ストレス、炎症に関しては、活性酸素種産生、炎症性サイトカイン産生、アポトーシスに対する影響を検討した。

高脂肪食 / LPS 負荷マウスにおける Nrf2、AMPK を介したポリフェノールの抗動脈硬化作用の検討

C57BL/6 マウスを用いて、高脂肪食ならびに LPS により誘導される炎症に対するポリフェノールの改善作用を検討した。炎症反応に対する影響については、脂肪細胞へのマクロファージ浸潤 (F4/80 免疫染色) 等の組織学的評価に加え、肝臓や腎臓、脂肪組織における炎症関連遺伝子発現量等の変化を評価した。

4. 研究成果

(1)血管内皮細胞

アントシアニン類やスチルベン類を含む食品抽出物において、血管内皮細胞における抗酸化酵素発現の誘導や、接着分子発現の抑制といった改善効果が認められたが、Nrf2 には影響が認められなかった。一方で、クルクミンにおいては顕著な Nrf2/HO-1 の誘導が認められ、炎症抑制作用が明らかとなった。

(2)マクロファージ

没食子酸を含む食品抽出物をマクロファージ細胞に作用させると、スカベンジャー受容体発現、炎症性サイトカイン発現、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生、活性酸素種産生を抑制することを明らかにした。さらに、LPS ならびに飽和脂肪酸誘導性の炎症反応を顕著に抑制することを明らかにした。阻害剤やノックダウンによる影響を検討し、Nrf2、AMPK の関与が明らかとなった。さらに、脂肪細胞とマクロファージの共培養系においても抗炎症作用が認められた。

(3)肝細胞

没食子酸を含む食品抽出物や、イソフラボン類において、肝細胞における飽和脂肪酸誘導性の脂質蓄積やアポトーシスに対する影響を検討した。

(4)マウス

没食子酸を含む食品抽出物において、食事誘導性肥満マウスにおける代謝異常や、脂肪組織における炎症反応を抑制する可能性が示された。短期間の LPS 投与マウスにおける効果についても検討した結果、Nrf2 のターゲット遺伝子である HO-1 などの抗酸化酵素の発現を誘導し、酸化ストレスや炎症反応を抑制する可能性が示された。

クルクミンにおいて、短期間の高脂肪食負

荷により生じる血管炎症に着目した動物実験を行い、マウス大腿動脈での生体内血管観察システムを用いた単球接着測定と、大動脈と肝臓におけるマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行い、酸化ストレス、炎症、脂質代謝に関連する遺伝子の変動を検討した。

以上の検討より、いくつかのポリフェノールは、飽和脂肪酸や LPS、サイトカイン刺激下の血管内皮細胞、マクロファージ、肝細胞、さらに高脂肪食や LPS 負荷のマウスにおいて Nrf2、AMPK を介して抗動脈硬化作用を発揮する可能性が見出された。

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 8 件)

1. 岸本良美、竹中沙織、才田恵美、鈴木(杉原)規恵、田中未央里、田口千恵、鈴木恵美子、近藤和雄: LDL 酸化ならびに肝脂質蓄積に対するゴボウの抑制作用: 機能性食品と薬理栄養: 11: 89-96: 2017 (査読有)
2. Tanaka M, Kishimoto Y, Saita E, Suzuki-Sugihara N, Kamiya T, Taguchi C, Iida K, Kondo K: Terminalia bellirica Extract Inhibits Low-Density Lipoprotein Oxidation and Macrophage Inflammatory Response in Vitro. *Antioxidants*, 14: E20, 2016 (査読有)
DOI: 10.3390/antiox5020020
3. Sakamoto Y, Kanatsu J, Toh M, Naka A, Kondo K, Iida K: The Dietary Isoflavone Daidzein Reduces Expression of Pro-Inflammatory Genes through PPAR α / γ and JNK Pathways in Adipocyte and Macrophage Co-Cultures. *PLoS One*. 11: e0149676, 2016 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0149676
4. 杉原規恵、岸本良美、吉田博、近藤和雄: 緑茶の LDL 酸化抑制作用: 機能性食品と薬理栄養: 9: 348-353: 2016 (査読無)
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.05.010
5. Taguchi C, Fukushima Y, Kishimoto Y, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Takahashi Y, Kondo K: Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. *Nutrients* 7, 10269-10281, 2015 (査読有)
DOI: 10.3390/nu7125530
6. Suzuki-Sugihara N, Kishimoto Y, Saita E, Taguchi C, Kobayashi M, Ichitani M, Ukawa Y, Sagesaka YM,

- Suzuki E, Kondo K: Green tea catechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low-density lipoprotein particles in humans. *Nutr. Res.* 36: 16-23, 2016 (査読有)
DOI: 10.1016/j.nutres.2015.10.012
7. Kido T, Kondo K, Itakura H, Yokoyama S: Sequential change in physicochemical properties of LDL during oxidative modification. *Chem. Phys. Lipids* 193: 52-62, 2015 (査読有)
DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2015.10.007
8. Yoshino M, Naka A, Sakamoto Y, Shibasaki A, Toh M, Tsukamoto S, Kondo K, Iida K: Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. *J. Nutr. Biochem.* 26: 1193-1199, 2015(査読有)
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.05.010

〔学会発表〕(計 32 件)

1. 田中未央里、岸本良美、近藤和雄、飯田薫子 他：リポ多糖(LPS)刺激マクロファージにおけるターミナリアベリリカ抽出物及び没食子酸の炎症反応ならびに酸化ストレス制御メカニズムの解明：第 40 回日本分子生物学会年会：2017 年
2. 近藤和雄：緑茶やワインなどからのポリフェノールの機能性効果について：第 27 回日本 MRS 年次大会：2017 年(招待講演)
3. 岸本良美、近藤和雄 他：インドキノ抽出物による LDL 酸化抑制作用：第 27 回日本 MRS 年次大会：2017 年
4. 田中未央里、岸本良美、近藤和雄、飯田薫子 他：没食子酸が肥満に伴う慢性炎症ならびに代謝異常に及ぼす影響：第 24 回日本未病システム学会学術総会：2017 年
5. 岩島知未、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：アロニアベリリカ抽出物の血管内皮細胞に対する抗炎症作用機序の解明：第 11 回日本ポリフェノール学会年次大会：2017 年
6. 近藤和雄：ポリフェノールと健康、最前線 コーヒー、緑茶と抹茶の可能性：第 71 回日本栄養・食糧学会大会：2017 年(招待講演)
7. 岸本良美、谷真理子、近藤和雄 他：パルミチン酸刺激による血管内皮障害に対するクルクミンの抑制作用機序の検討：第 71 回日本栄養・食糧学会大会：2017 年
8. 田中未央里、岸本良美、近藤和雄、飯田薫子 他：肥満誘導性の慢性炎症ならびに糖・脂質代謝異常に対する没食子酸の効果：第 71 回日本栄養・食糧学会大会：沖縄：2017 年
9. 岩島知未、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：アロニアベリリカ抽出物の血管内皮炎症に対する抑制作用：第 71 回日本栄養・食糧学会大会：2017 年
10. 近藤和雄：ポリフェノールと動脈硬化予防：第 28 回ビタミン E 研究会：2017 年(招待講演)
11. 田中未央里、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：マクロファージの酸化ストレス防御機構に対するターミナリアベリリカ抽出物の影響：第 14 回日本機能性食品医用学会総会：2016 年
12. 谷真理子：脂質の過剰摂取が血管炎症に及ぼす影響：第 23 回日本未病システム学会学術総会：2016 年(招待講演)
13. 田中未央里、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：ターミナリアベリリカ抽出物がマクロファージにおける抗酸化機構に及ぼす影響：第 23 回日本未病システム学会学術総会：2016 年
14. 田中未央里、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：LPS 刺激マクロファージにおける酸化ストレス防御機構に対するターミナリアベリリカ抽出物の影響：第 10 回日本ポリフェノール学会学術集会：2016 年
15. Kishimoto Y, Kondo K et al.: Effects of Oligonol on high glucose-induced inflammatory responses in THP-1 macrophages: 24th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine: 2016
16. Saita E, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Effects of perilla on lipid metabolism in HepG2 cells: 24th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine: 2016
17. 近藤和雄：ポリフェノールと動脈硬化：第 10 回埼玉 PPAR 研究会：2016 年(招待講演)
18. 岸本良美、谷真理子、近藤和雄 他：飽和脂肪酸刺激による血管内皮炎症に対するクルクミンの抑制作用：第 70 回日本栄養・食糧学会大会：2016 年
19. 田中未央里、岸本良美、飯田薫子、近藤和雄 他：ターミナリアベリリカ抽出物が LPS 刺激マクロファージにおける酸化ストレス防御機構に及ぼす影響：第 70 回日本栄養・食糧学会大会：2016 年
20. 新井英里、岸本良美、近藤和雄 他：インドキノ抽出物の LDL 酸化ならびに血管内皮炎症に対する影響：第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：2015 年
21. 久留悠希、岸本良美、近藤和雄 他：アロニアベリリカ抽出物の血管内皮機能に対する影響：第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：2015 年

22. 才田恵美、岸本良美、近藤和雄 他：ライチ果実由来ポリフェノールの HepG2 細胞における脂質代謝に及ぼす影響：第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：2015 年
23. 竹中沙織、岸本良美、近藤和雄 他：脂質摂取による食後血中脂質動態とそれに対するゴボウの及ぼす影響：第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：2015 年
24. 田中未央里、岸本良美、近藤和雄 他：ターミナリアベリリカ抽出物は LPS によるマクロファージの炎症反応を抑制する：第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：2015 年
25. Saita E, Kishimoto Y, Kondo K et al.: The effect of perilla on the macrophages activation: 23rd International Congress on Nutrition and Integrative Medicine: 2015
26. Arai E, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Effect of Pterocarpus marsupium extract on LDL oxidation and vascular endothelial inflammation: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
27. Kondo H, Kishimoto Y, Kondo K, et al.: Juar tea consumption increases endothelium-bound extracellular superoxide dismutase levels in men with metabolic syndrome: link with LDL oxidizability: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
28. Kudome Y, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Aronia melanocarpa extract in vascular endothelial cells: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
29. Saita E, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Effects of Lychee Fruit Polyphenol on Lipid Metabolism in HepG2 Cells: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
30. Suzuki-Sugihara N, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Comparison of the Effects of Four Major Catechins of Green Tea on Gene Expression Profile in Vascular Endothelial Cells: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
31. Takenaka S, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Effect of Burdock root intake on postprandial serum lipids and inflammatory markers in healthy human subjects: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015
32. Tanaka M, Kishimoto Y, Kondo K et al.: Terminalia bellirica extract inhibits LPS-induced inflammatory mediators expression in RAW 264 cells: 12th Asian Congress of

Nutrition: 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 和雄 (KONDO, Kazuo)
東洋大学・食環境科学部・教授
研究者番号：30153711

(2)研究分担者

鈴木 恵美子 (SUZUKI, Emiko)
お茶の水女子大学・基幹研究院・教授
研究者番号：80154524

飯田 薫子 (IIDA, Kaoruko)
お茶の水女子大学・基幹研究院・教授
研究者番号：50375458

岸本 良美 (KISHIMOTO, Yoshimi)
お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・
プロダクション・寄附研究部門准教授
研究者番号：70600477

谷 真理子 (TANI, Mariko)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附研究部門准教授
研究者番号：90452028