

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08084

研究課題名(和文)胆汁酸への異化代謝促進による高コレステロール血症の治療および予防対策

研究課題名(英文) Treatment and prevention of hypercholesterolemia by acceleration of cholesterol catabolism to bile acids.

研究代表者

大和 進 (Yamato, Susumu)

新潟薬科大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：60057370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、培養細胞系(ヒト肝腫瘍HepaRGおよびヒト肝がん由来HepG2細胞株)と高感度分析法(GC-MSおよびLC-MS/MS)を用いた評価系は、胆汁酸への異化代謝促進をターゲットとした高コレステロール血症の治療および予防対策に寄与する機能性食品因子の解析に有用なことを明らかにした。また、この評価系を用いて、これまで報告例の極めて少ない、胆汁酸の合成促進物質として、数種の有望な化合物(シアニジン、プロブコール、スウェルチアマリン、エピガロカテキンおよび β -シトステロール)を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：It has become apparent that the evaluation system using cell culture (both HepaRG and HepG2 cell lines) and high sensitive analytical methods (GC-MS and LC-MS / MS) is useful for the analysis of functional food factor contributing to the treatment and prevention of hypercholesterolemia by acceleration of cholesterol catabolism to bile acid. And then, we have found several compounds (cyanidin, probucol, swertiamarin, epigallocatechin and β -sitosterol) to promote the cholesterol catabolism to bile acids by this evaluation system.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：胆汁酸 異化代謝 GC-MS LC-MS/MS HepG2細胞 HepaRG細胞

1. 研究開始当初の背景

生体内コレステロールは、アセチル CoA から生体内で合成される経路 (供給)、食餌由来で小腸コレステロールトランスポーターNPC1L1 を介して吸収される経路 (供給) と、胆汁酸などに異化代謝される経路 (排泄) によって、コレステロール量が維持されている (図1)。

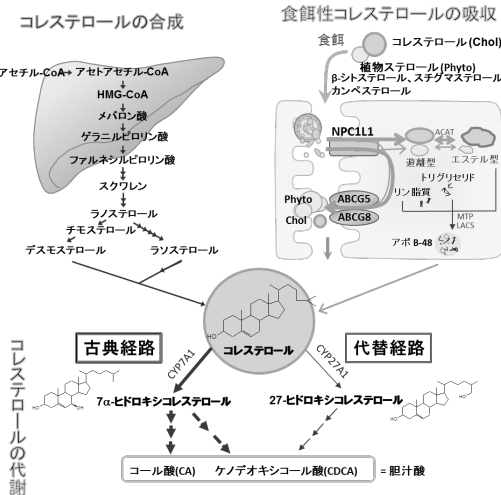


図1 コレステロールの合成・吸収・代謝

脂質異常症である高コレステロール血症治療薬としては、主に合成を抑制するスタチン系薬物、食餌由来のコレステロールの小腸コレステロールトランスポーター吸収阻害薬のエゼチミブなどが挙げられ、第一選択薬として使用されている。しかしながら、コレステロール合成抑制薬のスタチン系薬物を長期投与 (6 か月間) すると、食餌からのコレステロール吸収が代償的に増加し、また、コレステロール吸収阻害薬のエゼチミブにおいても長期投与 (1 か月間) でコレステロール合成が代償的に増加することが報告されている。また、著者らも、エゼチミブを長期投与した患者血液において吸収の抑制と代償的な合成の微増を認めるとともに新たな知見として、「コレステロールの胆汁酸の異化代謝前駆体のオキシステロール量 (7α-ヒドロキシコレステロールおよび 27-ヒドロキシコレステロール) は変化しない」という結果をこれまでに得ている (著者らの関連報告論文: *Atherosclerosis* 230:48-51, 2013.)。

また、近年、機能性食品が注目を浴び、ポリフェノールのヘスペレチン (柑橘由来) などはコレステロールの合成を抑制する作用が、また、エピガロカテキンガレート (茶由来)、ウコン中のクルクミンはコレステロール吸収を抑制するなど、多数報告されているが、食品機能因子の作用についても治療薬と同様に、コレステロールの合成・吸収の阻害に集中している。

このようなことから、コレステロールの供給抑制に対して、胆汁酸への排泄促進をターゲットとした新規治療薬や食品機能因子の開

発とその評価系が必要と考えられる。

コレステロールの異化代謝によって生成される胆汁酸は肝臓で合成され、その合成経路には、7α-ヒドロキシコレステロールを経由するメインルート (古典経路と呼ばれる) と 27-ヒドロキシコレステロールを経由するサブルート (代替経路と呼ばれる) が存在する (図 1)。このコレステロールの異化代謝を促進する物質として、治療薬のプロブコールがあり、また、生薬の中には、胆汁酸分泌亢進作用を示すものもあるが、詳しい作用機序は不明である。

2. 研究の目的

(1) 当研究室ですでに開発した、胆汁酸の前駆体である 7α-ヒドロキシコレステロールおよび 27-ヒドロキシコレステロールの同時高感度 GC-MS 定量法に加え、胆汁酸のコール酸 (CA) およびケノデオキシコール酸 (CDCA) とその抱合体を、LC-MS/MS によって高感度定量し、分析系全体を確立する。(2) 細胞培養系を用いて機能性食品の評価を行い、胆汁酸への異化代謝促進をターゲットとした高コレステロール血症の治療および予防対策に寄与する。

3. 研究の方法

ヒト肝がん由来 HepG2 培養細胞およびヒト肝腫瘍 HepaRG 細胞を用いて、評価物質を加え、72 時間培養後、細胞および培養液上清を採取した。評価物質は、大豆由来ダイゼイン、ゲニステイン、柑橘由来ナリンゲニン、ヘスペレチン、エリオジクチオール、茶由来カテキン、エピカテキン (EC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCG) の 10 種類のポリフェノール、生薬由来成分のゲンピピン、シアニジン、スウェルチアマリン、アウクビンの 4 種、コレステロール代謝に効果があると言われているアミノ酸の 1 つである S-メチルシステインスルホキシド (SMCS)、胆汁酸促進作用のある医薬品であるプロブコールについて検討し、さらに、植物ステロールであるカンペステロール、スチグマステロール、β-シトステロールの合計 19 種類の物質について評価した。添加濃度は細胞毒性をあらかじめ検討し、細胞毒性の出ない最大の濃度とした。また、コレステロール代謝促進としてのコントロールとして胆汁酸合成前駆体のオキシステロールである 7α-ヒドロキシコレステロール (7α-OH)、27-ヒドロキシコレステロール (27-OH) およびコレステロールを添加培養したものについても評価した。

まず始めに、胆汁酸である CA、CDCA およびその抱合体であるグリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸の 6 種類について、高感度一斉分析法を確立し、これらの物質を評価した。測定方法としては、細胞培養液を固相抽出 (WAX) を用いて処理後、

LC-MS/MS 法で定量した。定量は、CA および CDCA の重水素標識体を内標準物質に用いて行った。

次に胆汁酸が増加したものについて、細胞内のオキシステロール(7 α -OH および 27-OH) を定量し、作用部位を検討した。

これらの定量については、細胞をジルコニアビーズを用いて細胞を破碎し、水酸化カリウムによるケン化、*n*-ヘキサンによる溶媒抽出、固相抽出(シリカカートリッジ)を行い、水酸基をトリメチルシリル誘導体化し、GC-MS 法を用いて高感度定量した。定量は、27-OH の重水素標識体を内標準物質に用いて行った。

なお、HepG 細胞では、7 α -OH から CA が生成される古典経路があまり合成されず、評価が難しいため、HepG2 細胞では、主に 27-OH から CDCA が合成される代替経路について評価を行った。古典経路については、肝臓の酵素発現が強い HepaRG 細胞を用いて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 胆汁酸高感度 LC-MS/MS 定量法の確立

細胞培養液上清中の胆汁酸を酵素サイクリング法を用いて定量を行ったが、定量限界以下であり、酵素サイクリング法の改良を試みたが、定量できなかったため、LC-MS/MS 法を用いて胆汁酸である CA、CDCA およびその抱合体であるグリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸の 6 種類について、高感度一斉分析法を確立した。胆汁酸 6 種および内標準物質 2 種類は、良好に分離し、10 分以内で測定することができた。

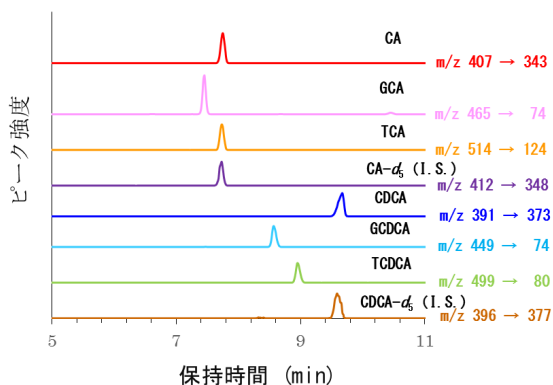


図 1 胆汁酸のクロマトグラム

次に、細胞培養液上清を固相抽出して、測定を行ったところ、添加回収率は 94.3 ~ 104% と良好に回収でき、本法を細胞培養液上清に応用した。なお、GCA については、63.7%であったが、これは、他の胆汁酸に比べ、濃度が 30 倍ほど高く存在しているためである。サンプル量の変更、希釈等、改良を行ったがあまり改善は見られず、培養液に標準品を添加した時の直線性は問題なかったことから、本法を用いて検討を行うこととした。

(2) 肝細胞を用いた胆汁酸促進物質の探索 2-1. ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた CDCA 合成(代替経路)促進物質の探索

HepG2 細胞を用いた CDCA に対する(代替経路)効果については、胆汁酸合成促進のコントロールとして用いた 7 α -OH、27-OH およびコレステロールについては、それぞれ、818%、84%、73%と 7 α -OH については、大幅な増加が認められたが、7-OH およびコレステロールについては、若干減少傾向であった(図 2)。しかしながら、7 α -OH において増加が認められたため、この評価系を用いて評価することとした。

また、コントロールの CA および CDCA 濃度は、それぞれ 0.38 \pm 0.051 ng/mL、4.02 \pm 0.84 ng/mL ($n=3$) であった。

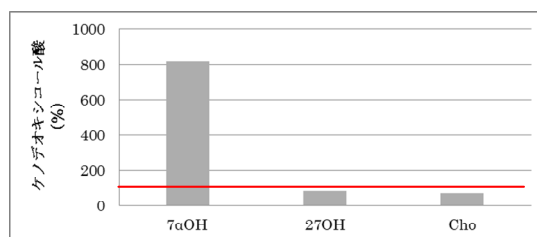


図 2 CDCA 合成経路に対する評価 1

無添加培養の CDCA 量を 100% として、相対比で表した。赤いラインは 100% を示す。
7 OH : 7 -ヒドロキシコレステロール
27OH : 27-ヒドロキシコレステロール
Cho : コレステロール

この評価方法を用いて、評価物質を評価したところ、EGCG、 β -シトステロールにおいてケノデオキシコール酸が微増したが、有意差は認められなかった ($n=3$, 図 3, 4, 5, 6)。

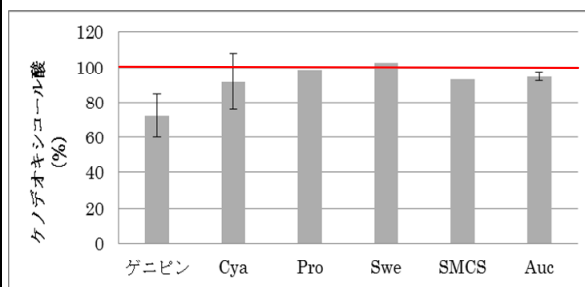


図 3 CDCA 合成経路に対する評価 2

無添加培養の CDCA 量を 100% として、相対比で表した。赤いラインは 100% を示す。
Cya : シアニジン、Pro : プロブコール
Swe : スウェルチアマリン
SMCS : S-メチルシステインスルホキシド
Auc : アウクビン

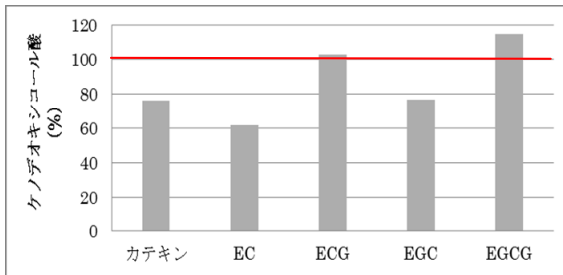


図4 CDCA 合成経路に対する評価3
無添加培養の CDCA 量を 100%として、相対比で表した。赤いラインは 100%を示す。
EC : エピカテキン、
ECG : エピカテキンガラート
EGC : エピガロカテキン
EGCG : エピガロカテキンガラート

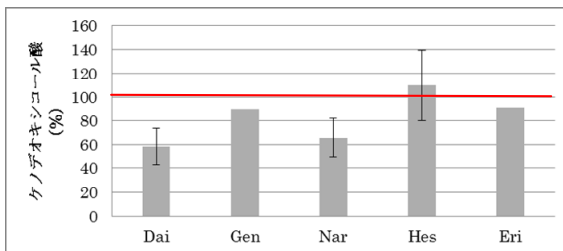


図5 CDCA 合成経路に対する評価4
無添加培養の CDCA 量を 100%として、相対比で表した。赤いラインは 100%を示す。
Dai : ダイゼイン、Gen : ゲニステイン
Nar : ナリゲニン、Hes : ヘスペレチン
Eri : エリオジクチオール

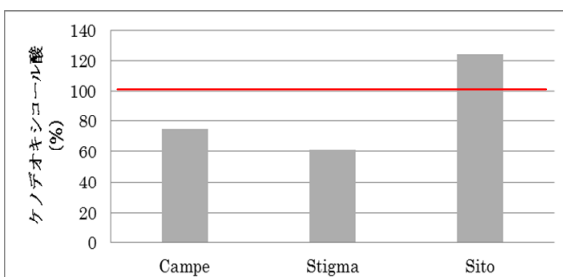


図6 CDCA 合成経路に対する評価5
無添加培養の CDCA 量を 100%として、相対比で表した。赤いラインは 100%を示す。
Campe : カンペステロール
Stigma : スチグマステロール
Sito : β -シトステロール

2-2. ヒト肝腫瘍由来 HepaRG 細胞を用いた CA 合成(古典経路)促進物質の探索

次に、胆汁酸合成経路のメインルートである CA 合成(古典経路)の促進物質を探索した。HepG2 細胞では、CA の合成があまり進まないため、さまざまな肝由来酵素の活性の高いヒト肝腫瘍由来 HepaRG 細胞を用いることで評価を行った。コントロールの CA 濃度は $18.7 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ であり、CDCA は検出されなかった。よって、この評価系では、産生される胆汁酸は古典経路の胆汁酸がほとんどで

あることが分かった。

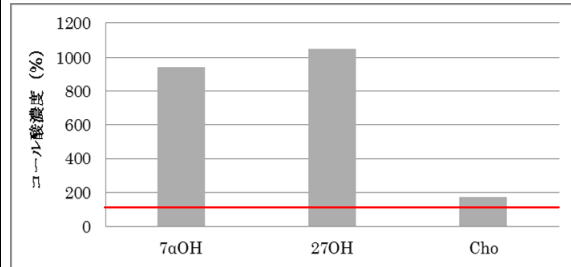


図7 CA 合成経路に対する評価1
無添加培養の CA 量を 100%として、相対比で表した。赤いラインは 100%を示す。
7 OH : 7 -ヒドロキシコレステロール
27OH : 27-ヒドロキシコレステロール
Cho : コレステロール

胆汁酸合成促進のコントロールとして用いた 7 α -OH および 27-OH において、コントロールと比べてそれぞれ、944%、1049%と大幅にコロール酸が増加した。また、コレステロールにおいても 179%と増加し、コロール酸生成を確認した(図7)。

この評価方法を用いて、評価物質を評価したところ、ゲニピン、シアニジン、プロブコール、スウェルチアマリン、エピガロカテキン(EGC)、カンペステロール、スチグマステロールおよび β -シトステロールにおいて、コントロールと比べ、それぞれ 1249%、117%、126%、136%、245%、113%、194%、144%と増加が認められた($n=1$)。サンプル数を増やして確認する必要があるが、胆汁酸合成促進物質としての可能性が認められた(図8, 9, 10, 11)。

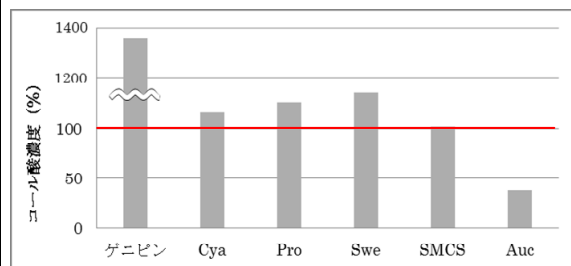


図8 CA 合成経路に対する評価2
無添加培養の CA 量を 100%として、相対比で表した。赤いラインは 100%を示す。
Cya : シアニジン、Pro : プロブコール
Swe : スウェルチアマリン
SMCS : S-メチルシステインスルホキシド
Auc : アウクピン

文 : Proc Natl Acad Sci U S A 115:
3936-3941, 2018. ; Atherosclerosis
230:48-51, 2013.)

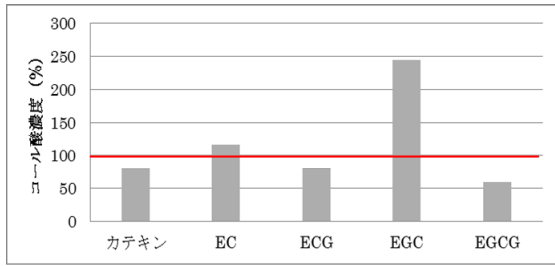


図9 CA合成経路に対する評価3
無添加培養のCA量を100%として、相対比で表した。赤いラインは100%を示す。

EC: エピカテキン、
ECG: エピカテキンガレート
EGC: エピガロカテキン
EGCG: エピガロカテキンガレート

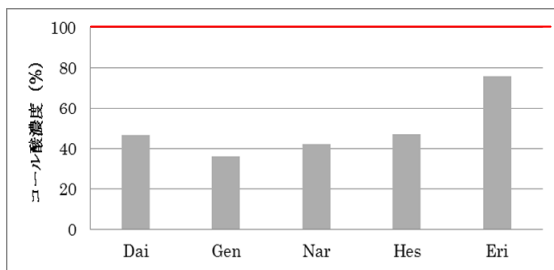


図10 CA合成経路に対する評価4
無添加培養のCA量を100%として、相対比で表した。赤いラインは100%を示す。

Dai: ダイゼイン、Gen: ゲニステイン
Nar: ナリンゲニン、Hes: ヘスペレチン
Eri: エリオジクチオール

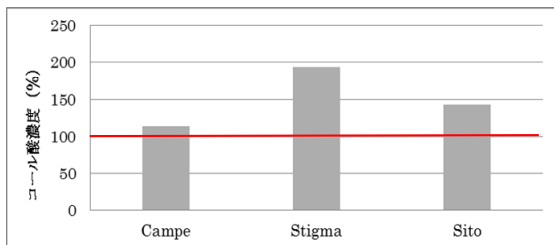
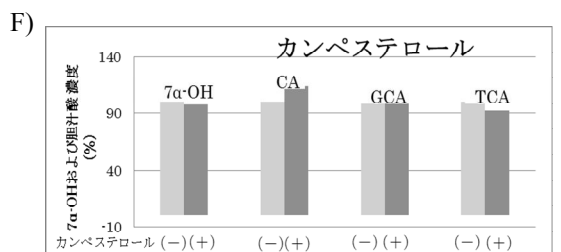
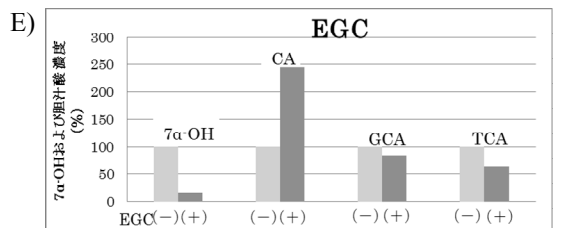
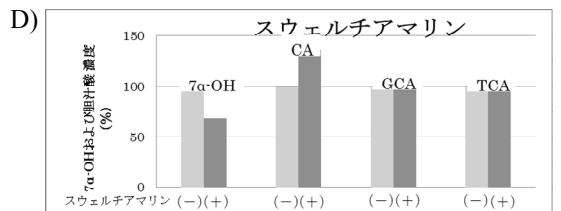
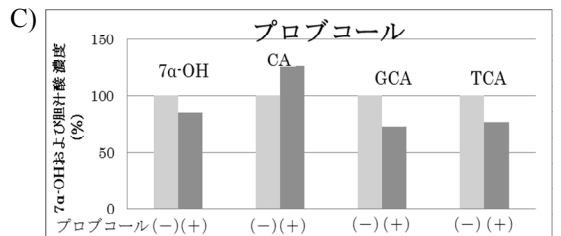
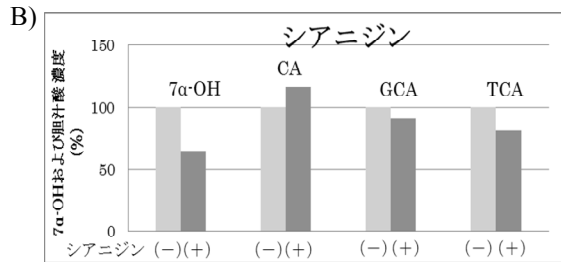
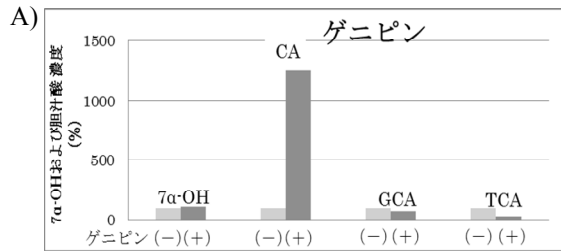


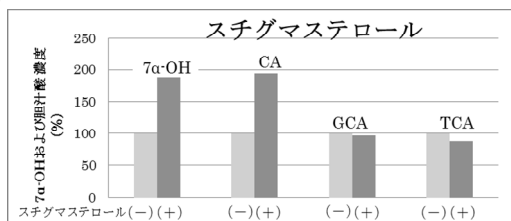
図11 CA合成経路に対する評価5
無添加培養のCA量を100%として、相対比で表した。赤いラインは100%を示す。

Campe: カンペステロール
Stigma: スチグマステロール
Sito: β -シトステロール

そこで、次にコロール酸の増加が認められたゲニピン、シアニジン、プロブコール、スウェルチアマリン、エピガロカテキン(EGC)、カンペステロール、スチグマステロールおよび β -シトステロールについて、培養液上清中の胆汁酸の抱合体であるグリココロール酸(GCA)、タウロコロール酸(TCA)をLC-MS/MSで定量し、GC-MSを用いて細胞内の 7α -OH、 27 -OHおよびコレステロールの定量を行った。GC-MS定量法はこれまでに当研究室で開発したオキシステロールのGC-MS高感度定量法を用いて定量した(著者らの関連報告論



G)



H)

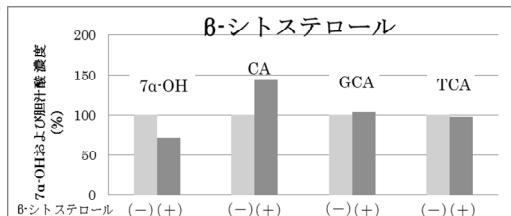


図 12 評価物質の CA 合成経路に対する 7α-OH、GCA および TCA に対する作用評価
 A)ゲニピン B)シアニジン
 C)プロブコール D)スウェルチアマリン
 E)エピガロカテキン F)カンペステロール
 G)スチグマステロール
 H)β-シトステロール

無添加培養時 (-) の量を 100% として相対比で表した。評価物質の濃度は細胞毒性の無い最大の濃度とした。

結果として、ゲニピンは、コール酸のみが大量に増加しており、抱合体は減少傾向であった。このことから、ゲニピンは、コール酸を増加させるあるいは、コール酸からの抱合体の合成を抑制する可能性が考えられた(図 12-A)。また、シアニジン、プロブコール、スウェルチアマリン、EGC および β-シトステロールは、7-OH が減少し、CA が増加したことから、7-OH を通る古典経路内を促進する可能性が考えられた(図 12-B, C, D, E, H)。さらに、スチグマステロールについては、7-OH および CA が増加したことから、コレステロールから 7-OH の産生を促進し、CA 産生を促進していることが推察された(図 12-G)。しかしながら、これらは n=1 のデータであるため、検体数を増やし、結果を確認する必要がある。

本研究で確立された HepaRG 細胞株および HepG2 細胞株と GC-MS および LC-MS/MS を用いた評価系は、胆汁酸への異化代謝促進をターゲットとした高コレステロール血症の治療および予防対策を目的とした機能性食品因子の解析に有用であり、この評価系を用いて、これまで報告例の極めて少ない、胆汁酸の合成促進物質として、数種の有望な化合物(シアニジン、プロブコール、スウェルチアマリン、EGC および β-シトステロール)を見出すことができた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

太田(清水)美穂、不破 史子、中川 沙織、大和 進: コレステロール異化代謝物の生合成に対するシアニジンの作用評価、日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月(金沢)

大和 進、中川 沙織、不破 史子: コレステロールの異化代謝に対するダイゼインの影響-細胞培養系/GC-MS 法を用いた解析-、日本薬学会第 136 年会(横浜)、2016.

〔図書〕(計 2 件)

中川 沙織、大和 進: Topics 胆汁酸への異化代謝促進による予防, BIO Clinica 2018 年 5 月号(特集「肥満症 update」監修 春日 雅人, 475, 73-75, 2018 (編集部推薦による再投稿).

大和 進、中川 沙織: 胆汁酸への異化代謝促進による予防, BIO Clinica 2016 年 12 月号(特集「高コレステロール血症と心血管疾患の新しい展開」監修 島野仁, 44-46, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室
(<http://www2.nupals.ac.jp/labo/ph/analchem/>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大和 進 (YAMATO Susumu)
 新潟薬科大学・薬学部・客員研究員
 研究者番号: 60057370

(2)研究分担者

中川 沙織 (NAKAGAWA Saori)
 新潟薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号: 30410228

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

不破 史子 (FUWA Fumiko)
 清水(太田) 美穂 (SHIMIZU-OHTA Miho)
 新潟薬科大学・薬学部・研究補助員