

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16202

研究課題名(和文)酸化コレステロールによる血管炎症とHDL機能不全に対する食事因子の改善作用の検討

研究課題名(英文)Oxysterol enhanced leukocyte-endothelial interaction

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食事由来の酸化コレステロールの一種である7-ketocholesterolに着目し、動脈硬化の初期段階である血管炎症惹起作用について検討を行った。層流下で接着実験を行ったところ、血管内被細胞HUVECへのヒト単球系細胞株THP-1のローリング数は、7-ketocholesterolにおいて有意に増加した。HUVECにおける細胞接着分子E-selectinの発現は、7-ketocholesterolによって著しく増加し、その作用はp38MAPK経路の活性化、転写因子ATF-2の活性化を介することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：7-Ketocholesterol is a major dietary cholesterol oxidation product found in high concentrations in atherosclerotic plaques, which contribute to the development of atherosclerosis. Pretreatment of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with 7-ketocholesterol significantly enhanced the total interactions between human monocytic cells (THP-1 cell line) and TNF- $\alpha$ -activated HUVECs under physiological flow conditions, compared to pretreatment with cholesterol. 7-Ketocholesterol enhanced the expression of E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 proteins. It also activated p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and treatment with a p38 MAPK inhibitor inhibited both E-selectin expression via ATF-2 activation and 7-ketocholesterol-induced THP-1 adhesion to HUVECs. These findings suggest that 7-ketocholesterol enhances leukocyte-endothelial interactions by upregulating the expression of adhesion molecules, presumably via the p38 MAPK-dependent pathway.

研究分野：血管炎症

キーワード：酸化コレステロール 血管炎症

## 1. 研究開始当初の背景

平成 17 年農水省の試算によると、我が国の飲食費において『加工品』は 53.2% の割合を占める。高齢化社会の進展、単身世帯の増加から、今後さらに利便性の高い冷凍食品やインスタント食品等の加工品に頼る食生活になると予測される。近年、「長期間保存による油脂の劣化」、「電子レンジでの加熱調理による酸化」によって、加工食品中に酸化コレステロールが生成することが分かってきた。酸化コレステロールが生体に与える影響については未解明な部分が多いが、アテローム性動脈硬化巣において食事由来の酸化コレステロールが多く検出されること (Staprans I et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998) や、冠動脈疾患と負の相関を示す高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロール値が低いヒトでは血中の酸化コレステロール値が高いこと (Nunes VS et al., *Clin. Biochem.* 2013) から、動脈硬化の発症や進展に關与する危険因子として注目され始めている。

酸化コレステロールは、通常のコレステロールと同じく小腸の NPC1L1 を介して取り込まれることが分かっている。そのため、酸化コレステロールの多い食品を継続的に摂取していると、腸管リンパ由来の炎症性物質や酸化コレステロールを含むリポ蛋白によって血管炎症が惹起されることや、抗炎症作用やコレステロール引抜作用を担う HDL 粒子が成熟しない (= 機能不全な HDL が生成することから、動脈硬化が発症もしくは進展する可能性が考えられる。そして、加工食品を頻食する現代の食習慣を踏まえると、同時に摂取することで炎症リスクを減弱できるような食事因子を明らかにすることが、動脈硬化の一次予防・重症化予防に極めて重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、酸化コレステロール摂取による血管炎症について、特に白血球と血管内皮の相互作用の検討をすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 酸化コレステロール含有高脂肪食負荷マウスにおける血管炎症反応の検討

酸化コレステロール負荷によって、動脈硬化進展に重要な血管炎症が生じるかどうか検討した。C57BL/6J マウスに、高脂肪食とともに経口ゾンデで酸化コレステロールを、対照群には通常のコレステロールを 4 週間摂取させた。その後、麻酔下でマウス大腿動脈を用いた生体内血管観察システムにより、血管内皮への白血球接着現象をリアルタイムで観察し、ライブイメージを動画に取り込み、画像解析することで、血管内皮に接着する白血球数を算出した。

(2) 7-ketocholesterol の白血球 - 血管内皮相互作用の検討

7-ketocholesterol の血管内皮細胞に対する単球接着実験

酸化コレステロールの一種である

7-ketocholesterol を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) を播種し、50  $\mu$ M

7-ketocholesterol あるいは cholesterol を 24 時間前刺激した後、0.1ng/ml TNF を 4 時間刺激し、BCECF-AM 標識したヒト骨髄単球性白血球細胞株 (THP-1) 細胞とローター上で 10 分間インキュベートして、接着実験を行った。EDTA/EGTA/HBSS (-) 溶液で HUVEC に接着した THP-1 細胞を剥がし、蛍光強度を測定した。

7-ketocholesterol の層流下での血管内皮細胞に対する単球接着実験

ゼラチンコートしたカバースリップに

HUVEC を播種し、50  $\mu$ M 7-ketocholesterol あるいは cholesterol を 24 時間前刺激した後、0.1ng/ml TNF を 4 時間刺激し、37 に保温された位相差顕微鏡上の flow chamber にセットした。THP-1 細胞溶液を、flow chamber にシリンジポンプを用いて流速 43.2ml/hr (1.0dyne/cm<sup>2</sup>) で流し、HUVEC と THP-1 細胞の接着の様子をビデオカメラで撮影した。1 視野あたり 10 秒、各コンディション 14 視野を録画し、10 視野を計測に用いた。撮影した動画は PC に取り込んで画像化し、THP-1 細胞の rolling と adhesion の数を計測した。

7-ketocholesterol による接着分子発現の検討

7-ketocholesterol 20 時間刺激後、0.1ng/ml TNF 4 時間刺激した HUVEC から lysate を回収した。E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で解析した。ローディングコントロールには、 $\beta$ -actin を用いた。

7-ketocholesterol による炎症サイトカイン mRNA 発現量の検討

7-ketocholesterol 24 時間刺激、TNF 2 時間刺激をした HUVEC から RNA を抽出し、Prime script RT を用いて cDNA を作製した。さらに、KAPA SYBR qPCR kit を用いて反応させ、Interleukin-8 (IL-8), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析した。コントロールは 18S rRNA とした。

7-ketocholesterol による NF  $\kappa$ B の活性化の検討

HUVEC に 7-ketocholesterol 24 時間刺激、TNF 20 分刺激を行った後、NF  $\kappa$ B p65 のリン酸化、NF  $\kappa$ B の不活性化タンパクである I  $\kappa$ B のタンパク質発現量をウエスタンブ

ロットで解析した。さらに、同様に処理した HUVEC を 1%パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体として rabbit anti-p65、二次抗体として goat anti-rabbit-FITC を用いて免疫蛍光染色を行った。さらに DAPI を用いて核を染色し、細胞内での p65 の局在を調べた。

#### 7-ketocholesterol による MAPK 経路と ATF-2 活性の検討

HUVEC に同様の処理後、p38MAPK、c-JNK のリン酸化、さらに核分画を抽出して ATF-2 の活性化をウエスタンブロットで解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酸化コレステロール含有高脂肪食負荷マウスにおける血管炎症反応の検討

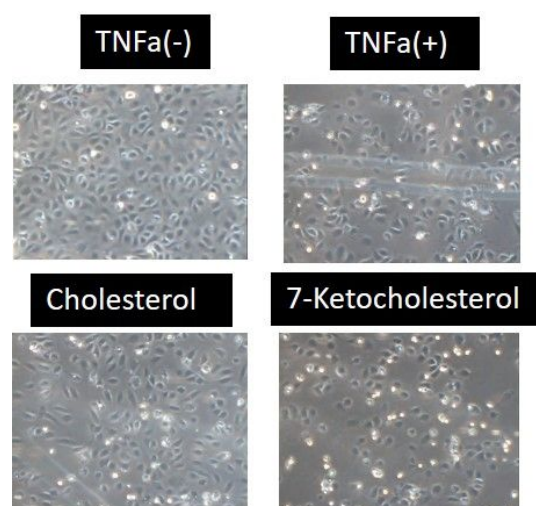
C57BL/6J マウスに、高脂肪食とともに経口ゾンデで酸化コレステロールを、対照群には通常のコレステロールを 4 週間摂取させた。その後、麻酔下でマウス大腿動脈を用いた生体内血管観察システムにより、血管内皮への白血球接着現象をリアルタイムで観察し、ライブイメージを動画に取り込み、画像解析することで、血管内皮に接着する白血球数を算出した。高脂肪食負荷によって、血管内皮への白血球接着は増加したものの、コレステロール群と酸化コレステロール群で有意な差は認められなかった。マウスを用いた酸化コレステロール負荷実験では、当初の予想に反して、白血球の血管内皮への接着現象は見られなかった。体重、肝重量においても、コレステロール群、酸化コレステロール群ともに有意な差は見られなかった。今回負荷した酸化コレステロールの吸収率が非常に低いことから、当初の計画を変更して、*in vitro* における酸化コレステロールの血管炎症作用とその作用メカニズムの解明を重点的に検討することにした。

##### (2) 7-ketocholesterol の白血球 - 血管内皮相互作用の検討

7-ketocholesterol は血管内皮細胞に対する白血球接着を亢進する

食品中に多く含まれることが知られている酸化コレステロールの一種である 7-ketocholesterol を、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に添加し、ヒト単球系細胞 THP-1 を用いた接着実験を行ったところ、コレステロール刺激に比して有意な接着亢進作用が認められた。さらに生理的な状況で検討を行うため、末梢血管の血流を想定した層流下での接着実験を行ったところ、7-ketocholesterol によって THP-1 細胞の HUVEC に対する接着は有意に亢進した (TNF $\alpha$ +50  $\mu$ M cholesterol: 13.1  $\pm$  0.54 cells/CPF, TNF $\alpha$ +50  $\mu$ M 7-ketocholesterol: 18.9  $\pm$  0.35 cells/CPF,  $p < 0.01$ )。特に、ローリングしている THP-1 細胞数の顕著な増加が観察された (TNF $\alpha$ +50  $\mu$ M cholesterol: 6.4  $\pm$  0.88 cells/CPF, TNF $\alpha$ +50  $\mu$ M

7-ketocholesterol: 10.3  $\pm$  0.86 cells/CPF,  $p < 0.01$ )。



7-ketocholesterol は接着分子や炎症ケモカインの発現を亢進する

7-Ketocholesterol による白血球の血管内皮細胞への接着亢進作用のメカニズムを解明するため、接着分子や炎症性サイトカインの発現量を解析した。その結果、接着分子の中でも E-selectin の発現が 7-ketocholesterol によって著しく増加していた。また、炎症性ケモカインである IL-8 の発現も有意に増加していた。E-selectin は、白血球のローリングを担う重要な分子であり、7-ketocholesterol による E-selectin の増加は、の結果で THP-1 細胞のローリング数が増加したことを裏付ける結果である。

7-ketocholesterol の NF B 活性化に対する影響

次に、7-ketocholesterol の炎症シグナル伝達経路として、NF B 経路に着目した。P65 のリン酸化レベルや核移行、I B の分解レベルとともに、7-ketocholesterol によって部分的な影響が認められたが、NF B 阻害剤を用いても 7-ketocholesterol の接着亢進作用の有意な抑制は認められず、7-ketocholesterol の炎症反応には、NF B 以外の経路の可能性が示唆された。

7-ketocholesterol の MAPK 経路活性化に対する影響

次に、炎症シグナル経路として MAPK 経路の可能性について検討した。その結果、7-ketocholesterol による JNK 経路の活性化は認められなかったが、p38MAPK の顕著なリン酸化を認めた。そこで、p38MAPK 阻害剤 (SB203580) を用いて接着実験を行ったところ、7-ketocholesterol で増加した THP-1 細胞と血管内皮細胞の相互作用は、有意に抑制された。さらに、接着分子である E-selectin の発現抑制も顕著であった。

次に、E-selectin の発現調節に関与する転写因子である ATF-2 のリン酸化について検討した。7-ketocholesterol によって、核分画中の ATF-2 のリン酸化レベルは著しく亢進しており、p38MAPK 阻害剤によって抑制された。

したがって、7-ketocholesterol による E-selectin の著しい発現亢進作用は、主に p38MAPK 活性経路が中心的な役割を担って ATF-2 の活性化を介し、白血球の血管内皮細胞に対するロッキングを増強していることが示唆された。これらの結果より、食事由来の酸化コレステロールの摂取や血管への蓄積は、動脈硬化の初期段階である白血球と血管内皮の相互作用を亢進し、動脈硬化の進展に寄与する可能性が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 3 件)

谷 真理子 脂質の過剰摂取が血管炎症に及ぼす影響 日本未病システム学会誌 23(2): 86-90, 2017 (査読無)

Tani M, Horvath KV, Lamarche B, Couture P, Burnett JR, Schaefer EJ, Asztalos BF: High-density lipoprotein subpopulation profiles in lipoprotein lipase and hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis* 253:7-14, 2016 (査読有)

Nakayama S, Kishimoto Y, Saita E, Sugihara N, Toyozaki M, Taguchi C, Tani M, Kamiya T, Kondo K: Pine bark extract prevents LDL oxidation and regulates monocytic expression of antioxidant enzymes. *Nutr Res* 35(1), 56-64, 2015 (査読有)

[学会発表](計 14 件)

谷 真理子、大坂 瑞子、神田 英一郎、才田 恵美、樺山 幸彦、吉田 雅幸：高齢の冠動脈疾患例における血中 C5a 濃度測定の有有用性：第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会：広島：2017 年 7 月

谷 真理子、大坂 瑞子、神田 英一郎、才田 恵美、樺山 幸彦、吉田 雅幸：高齢冠動脈疾患患者における血中 C5a 濃度測定の有有用性：第 3 回 J-ISCIP 学術集会：東京：2017 年 6 月

谷 真理子、大坂 瑞子、霧 裕美、鎌田 悠子、出牛 三千代、吉田 雅幸：7-ketocholesterol は p38MAPK 経路を介して白血球の血管内皮への接着を亢進する：第 40 回日本バイオレオロジー学会年会：岡山：2017 年 5 月

谷 真理子、霧 裕美、鎌田 悠子、大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸：7-ketocholesterol が白血球遊走作用に及ぼす影響：脳心血管抗加齢研究会 2016 第 13 回学術集会：東京：2016 年 12 月

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術総会：福岡：2016：11 月

Tani M, Kamata Y, Deushi M, Osaka M, Yoshida M: 7-ketocholesterol Induces Leukocyte Interaction to Endothelial Cells thorough p38MAPK-dependent pathway: The 19th International Vascular Biology Meeting: Boston, USA: October: 2016

谷 真理子、鎌田 悠子、大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸：7-ketocholesterol の白血球-血管内皮相互作用機序に関する検討：第 48 回動脈硬化学会：東京：2016 年 7 月

谷 真理子、鎌田 悠子、大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸：7-ketocholesterol が白血球の血管内皮細胞に対する接着に及ぼす影響：第 70 回日本栄養・食糧学会大会：兵庫：2016 年 5 月

谷 真理子、鎌田 悠子、大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸：7-ketocholesterol が白血球の血管内皮細胞接着に及ぼす影響：第 13 回日本機能性食品医学学会 学術総会：福岡：2015 年 12 月

谷 真理子、大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸：酸化コレステロールが血管炎症に及ぼす影響：第 37 回日本臨床栄養学会総会/第 36 回日本臨床栄養協会総会第 13 回大連合大会：東京：2015：10 月

Tani M, Matera RM, Schaefer EJ, Asztalos BF：動脈硬化モデルマウスとヒトの HDL 粒子分布の相違に関する検討：第 22 回日本未病システム学会学術総会：札幌：2015：10 月

谷 真理子：HDL と冠動脈疾患の関連：第 27 回油脂・コレステロール研究会：余市：2015：7 月

谷 真理子、大坂 瑞子、吉田 雅幸：7-ketocholesterol の血管炎症惹起作用に関する検討：第 47 回日本動脈硬化学会：仙台：2015：7 月

谷 真理子：食後高脂血症をターゲットにした食事因子の動脈硬化予防作用：第 38 回日本バイオレオロジー学会：東京：2015：6 月

[図書](計 2 件)

谷 真理子 レスベラトロールの抗炎症作用 Resveratrol factbook 23-25, 2016 年 11 月

Schaefer EJ, Tani M: Nutrition and Heart Disease Prevention. *Dyslipidemias*: Humana Press 329-341, June, 2015

[その他]

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/bec/45\\_4c6b6769dd8c9/index.html](http://www.tmd.ac.jp/bec/45_4c6b6769dd8c9/index.html)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

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