

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09115

研究課題名(和文) 食品成分による動脈硬化症予防法の開発

研究課題名(英文) The exploration of the food ingredients which prevent arteriosclerosis

研究代表者

内匠 正太 (Takumi, Shota)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：80570770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動脈硬化症に予防的にはたらくHDLの産生を促進する食品成分を探索することにより、食品成分による動脈硬化症の予防を目的とした。今回検討を行った食品成分の中で特にクルクミンがHDL産生の責任分子の一つであるATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1)の発現を誘導することが明らかとなった。また、クルクミンが無機ヒ素曝露によるABCA1の発現低下を抑制し、細胞内コレステロールの蓄積を抑制する効果があることが示唆された。クルクミンがどのようなメカニズムにより、ABCA1の発現を誘導するかについては、今後も詳細に解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化を基盤とする心疾患及び脳血管疾患は、わが国では悪性新生物に次ぐ死亡原因であり、多くの疫学研究からHDLの低下が、動脈硬化症のリスク要因の一つと考えられている。食品成分により、HDL値を正常に戻すことができれば、日常的な食事による病気の予防に繋がると期待される。本研究において、HDL産生の責任分子であるABCA1の発現を誘導する作用が、クルクミンに認められた。また、クルクミンがヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積を抑制することが明らかになった。このことから、クルクミンが動脈硬化症の予防や、深刻なヒ素汚染に苦しむ地域の人々の健康の保持・増進に貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to prevent atherosclerosis by the food ingredients that promote the production of high-density lipoprotein (HDL) in blood. HDL acts preventively against atherosclerosis. In this study, we revealed that curcumin, which is the main component of turmeric, induces the expression of ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1), which is one of the responsible molecules for HDL production. We also revealed that curcumin suppresses the decrease in ABCA1 expression due to exposure to inorganic arsenic and suppresses intracellular cholesterol accumulation. In previous our study, we reported that inorganic arsenic exposure enhanced the accumulation of intracellular cholesterol by suppressing the expression of ABCA1. These results suggested that curcumin may contribute to the prevention of arteriosclerosis, and the health promotion of people in areas suffering from severe arsenic contamination.

研究分野：衛生学

キーワード：ABCA1 HDL コレステロール 食品成分

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えたわが国では、動脈硬化症等の生活習慣病が今後ますます増加することが予想され、それに伴う医療費の増大が懸念される。動脈硬化を基盤とする心疾患及び脳血管疾患は、わが国では悪性新生物に次ぐ死亡原因であり、これら2つの死因を総合すると悪性新生物と同程度の割合を占めると考えられる。こうした中、医療費削減の観点から、日常的な食事による疾病予防が今後有効な手段になると考えられる。

これまでの多くの疫学研究から、血中高密度リポタンパク質(HDL)は動脈硬化と負の相関を示すことが報告されており、血中 HDL の低下は、動脈硬化症のリスク要因の一つと考えられている。血中 HDL は主に肝臓の ATP-binding cassette transporter-1(ABCA1)を介して産生され、肝臓特異的 ABCA1 欠損マウスでは血中 HDL が 80%低下することが報告されている(Timmins et al., 2005)。HDL はコレステロールの分解能を持たない末梢細胞表面からの余剰コレステロールの引き抜きと、コレステロールの胆汁酸への転換排出の場である肝臓へのいわゆるコレステロールの逆輸送を促進する役割を担っており、血中 HDL の低下は、末梢細胞でのコレステロールの蓄積を引き起こし、血管壁におけるマクロファージの泡沫化を介して動脈硬化の引き金となると考えられている。以上のことから、HDL 産生の責任分子であり、細胞内コレステロールの排出に関与する ABCA1 は、動脈硬化症の予防に有効な標的分子と考えられている。

2. 研究の目的

前述の通り超高齢化社会を迎えたわが国においては、動脈硬化症等の生活習慣病が今後ますます増加することが予想され、日常的な食事による疾病予防が医療費削減の観点からも、今後有効な手段になると考えられる。そこで本研究では、動脈硬化症の危険因子とされる血中高密度リポタンパク質(HDL)の低下に着目し、HDL 産生を促進する食品成分を探索することを目的とする。すなわち、HDL 産生の責任分子である ABCA1 の発現を選択的に誘導する食品成分の探索と、その発現誘導メカニズムについて解析することで、食品による動脈硬化症予防のための科学的エビデンスを集積することを目的とする。

また、申請者は、東南アジアなどのヒ素汚染地域において動脈硬化症が増加傾向にあることが報告(Karim et al., 2013)されていることから、無機ヒ素が ABCA1 の発現に及ぼす影響についても研究を進めており、無機ヒ素曝露により ABCA1 の発現が抑制傾向にあることを見出し、そのメカニズムについて解析を続けてきた(若手研究(B)期間:平成26~27年度)。このことから、ABCA1 の発現を選択的に誘導する食品成分を見出すことが出来れば、動脈硬化症の予防だけでなく、深刻なヒ素汚染に苦しむ地域の人々の健康の保持・増進にも貢献できると考えた。

3. 研究の方法

本研究は、動脈硬化症の発症予防に有効な食品成分を探索することを目的に行った。動脈硬化症に予防的に働く HDL に着目したことから、HDL 産生の主要な臓器である肝臓に由来するヒト肝臓由来細胞株 HepG2 を用いて実験を行った。まず ABCA1 の発現を誘導する食品または食品成分の候補として赤しそ、ウコン及び柑橘類に含まれるフラボノイドであるノビレチンやタンゲレチン、海藻に含まれるフロログルシノールやマンニトールなどを用い、ABCA1 のタンパク質発現を指標にしたスクリーニング試験を行った。その結果、今回検討した候補食品の中でウコンが最も有効と考えられる結果が得られたことから、ウコンの主成分であるクルクミンについて、以下に示す解析を行った。

(1) MTT assay による無毒性濃度の決定

HepG2 細胞をプレートに播種し、24 時間培養した後、クルクミンを曝露した。3 日間インキュベートした後、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) を添加し、3 時間インキュベーション後、細胞内脱水素酵素活性により生成したホルマザン量を相対比較し、細胞の生存率を指標にクルクミンの無毒性濃度を評価した。

(2) ABCA1 の遺伝子発現解析

HepG2 細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を 5 ml 播種し、24 時間、37 °C でインキュベーション後、2, 5, 10 μ M のクルクミンを曝露した。また ABCA1 の発現を上昇させることが知られている T0901317 をポジティブコントロールとして用いた。曝露後、24 時間、37 °C でインキュベートした後、細胞を回収しセパゾールを用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA から ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用い cDNA を調製した。調製した cDNA を用い、StepOne[™] リアルタイム PCR により各遺伝子の発現を解析した。内部標準遺伝子には、CPB を用いた。

(3) ABCA1 のタンパク質発現解析

HepG2 細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を 5 ml 播種し、24 時間、37 °C でインキュベート後、10 μ M 無機ヒ素 (NaAsO_2) およびクルクミン (2, 5, 10 μ M) を単独または複合曝露した。また、ABCA1 タンパク質の発現を上昇させることが知られている T0901317 をポジティブコントロールとして添加した。24 時間インキュベート後、細胞を回収し細胞ライセートを調製し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現解析を行った。内部標準には、 Na^+/K^+ -ATPase を用いた。

(4) 細胞内コレステロールの蛍光染色

クルクミン単独での細胞内コレステロールへの影響が認められなかったことから、我々の以前の研究において、本実験系で細胞内にコレステロールを蓄積させることが明らかになっていた無機ヒ素と複合曝露することにより、クルクミンが細胞内コレステロールに及ぼす影響を解析した。細胞を一晩培養後、クルクミン及び無機ヒ素を添加し、3日間培養した細胞に、Cell-Based Assay Fixative Solutionを添加し、固定した後、Wash Bufferで洗浄後、Filipin III solutionを添加し、暗所で60分静置し蛍光染色を行った。Wash Bufferで洗浄後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

本研究において、ABCA1の発現を指標に動脈硬化症の予防に有用な食品成分を探索した結果、今回検討した食品中でウコンが最も有効であった。そこで、ウコンの主成分であるクルクミンについて、以下に示す解析を行った。

(1) クルクミンが ABCA1 の発現に及ぼす影響

本研究では、HDL産生の主要な臓器である肝臓に着目し、ヒト肝がん由来細胞であるHepG2細胞を対象とした解析を行った。まず、クルクミンの無毒性濃度を評価するために、MTT assayを行った。その結果から、クルクミンの無毒性濃度を10 μMとし、以後の解析を行った(図1)。

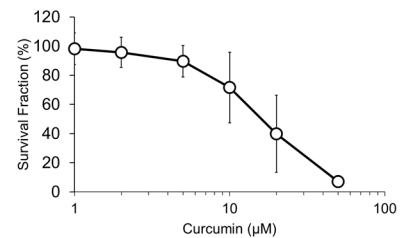


図1. クルクミンの細胞毒性評価

次に、クルクミンがHepG2細胞のABCA1の遺伝子及びタンパク質の発現に及ぼす影響を解析した。その結果、クルクミン曝露による濃度依存的な発現増加は遺伝子レベルでは認められなかったものの増加傾向にあることが明らかとなった(図2)。一方、タンパク質レベルでは、クルクミン曝露により濃度依存的な発現増加が認められた(図3)。

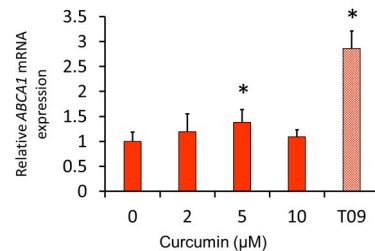


図2. ABCA1 遺伝子発現への影響

(2) クルクミンによる細胞内コレステロール蓄積の抑制

クルクミンによるABCA1の発現誘導が認められたことから、細胞内コレステロールへの影響を解析したところ、クルクミンの単独曝露による細胞内コレステロール量の変動は認められなかった。そこで、我々の以前の研究により、無機ヒ素曝露がABCA1の発現を抑制すると共に細胞内コレステロールの蓄積を誘導することが明らかになっていたことから、クルクミンが無機ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積を抑制するか否か検討を行った。

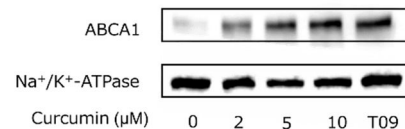


図3. クルクミンによる ABCA1 の発現への影響

その結果、無機ヒ素曝露によるABCA1のタンパク質レベルでの発現低下をクルクミンが対照群のレベルまでではないものの抑制することが明らかとなった(図4)。また、コレステロールに特異的に結合する蛍光プローブであるFilipin IIIを用いた細胞内コレステロールの蛍光染色の結果、無機ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積がクルクミンにより抑制されることが明らかとなった(図5)。

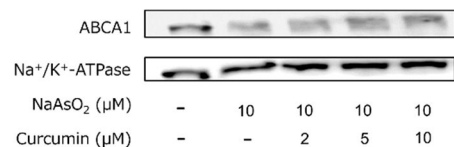


図4. ヒ素及びクルクミンの複合曝露による ABCA1 の発現への影響

以上の結果から、無機ヒ素曝露によるABCA1の発現低下が、クルクミンにより抑制されることによって、ABCA1を介した細胞内コレステロールの細胞外への輸送能が回復することが推察された。クルクミンによるABCA1の発現誘導に関しては、マクロファージを用いた実験系でヘムオキシゲナーゼ1を介した経路などが

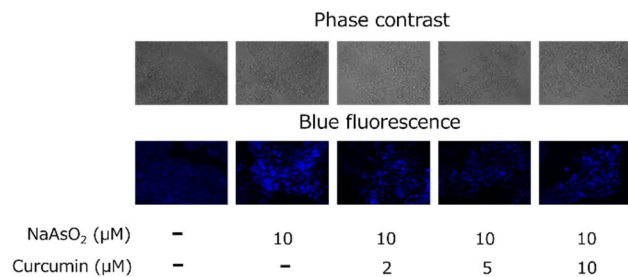


図5. ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積にクルクミンが及ぼす影響

ABCA1の発現を誘導することが報告されている。しかし、肝臓由来の細胞を用いた本実験系では、タンパク質レベルでの変動に比べ、遺伝子レベルでの発現変動は、わずかであった。このことから、クルクミンによるABCA1タンパク質の安定化や分解経路の抑制などの関与も推察された。今後もクルクミンがどのようなメカニズムにより、ABCA1の発現を増加させるのか、そのメカニズムについて詳細に解析を進めたい。

<引用文献>

- Timmins JM, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:1333-1342.
- Karim MR, et al. Increases in oxidized low-density lipoprotein and other inflammatory and adhesion molecules with a concomitant decrease in high-density lipoprotein in the individuals exposed to arsenic in Bangladesh. *Toxicol. Sci.* 2013;135:17-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takumi Shota, Shimono Tai, Ikema Satoshi, Hotta Yuki, Chigwechokha Petros K., Shiozaki Kazuhiro, Sugiyama Yasumasa, Hashimoto Mitsuru, Furukawa Tatsuhiko, Komatsu Masaharu	4. 巻 194
2. 論文標題 Overexpression of carboxylesterase contributes to the attenuation of cyanotoxin microcystin-LR toxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology	6. 最初と最後の頁 22 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2017.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagisawa Hiroyuki, Seki Yoshiko, Yogosawa Shingo, Takumi Shota, Shimizu Hidesuke, Suka Machi	4. 巻 834
2. 論文標題 Potential role of mitochondrial damage and S9 mixture including metabolic enzymes in ZnO nanoparticles-induced oxidative stress and genotoxicity in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrgentox.2018.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nohara Keiko, Suzuki Takehiro, Okamura Kazuyuki, Matsushita Junya, Takumi Shota	4. 巻 39
2. 論文標題 Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-016-0069-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内匠正太、大柴 薫、古川龍彦、西 優弥、塩崎一弘、小松正治
2. 発表標題 ヒジキに含有される無機ヒ素の細胞毒性及びその細胞膜コレステロール輸送系への影響
3. 学会等名 日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内匠正太、木戸尊將、関良子、柳澤裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏におけるSirt1の役割
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内匠正太、山下優香、小松正治、柳澤裕之.
2. 発表標題 ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積.
3. 学会等名 第87回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富岡 優、嶋 祐介、濱口真理奈、塩崎一弘、内匠正太、小松正治
2. 発表標題 アオコ毒microcystin-LRの上皮間葉転換様作用
3. 学会等名 令和元年度 日本水産学会九州支部会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富岡 優、藤田理子、山本歩加、塩崎一弘、古川龍彦、内匠正太、小松正治
2. 発表標題 Microcystin-LRが誘導するEMT様形質転換細胞の細胞内シグナリングの解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸祥太, 河野和樹, 内匠正太, 小松正治
2. 発表標題 ウナギ緑色蛍光タンパク質eeIGP発現細胞の酸化ストレス応答
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西 優弥, 古川龍彦, 内匠正太, 小松正治
2. 発表標題 無機ヒ素により誘発される細胞内コレステロール蓄積にクルクミンが及ぼす影響
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富岡 優、何 偉傑、塩崎一弘、古川龍彦、内匠正太、小松正治
2. 発表標題 OATP1B3発現細胞にmicrocystin-LRおよびnodularinを曝露することにより誘導される上皮間葉転換様の形質転換細胞の性状解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 何 偉傑、富岡 優、塩崎一弘、古川龍彦、内匠正太、小松正治
2. 発表標題 ケルセチンを用いた肝臓毒マイクロシスチンLRの細胞毒性の抑制
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西 優弥、古川龍彦、内匠 正太、小松 正治
2. 発表標題 無機ヒ素曝露がHepG2細胞におけるコレステロール輸送体タンパク質ABCA1の発現および輸送活性に与える影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富岡 優、内匠正太、杉山靖正、塩崎一弘、古川龍彦、小松正治
2. 発表標題 NodularinはOATP1B3発現細胞に対して上皮間葉転換様の形質転換を誘導する
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 海理，青木 俊二，池田 龍二，堀田 夕貴，塩崎 一弘，古川 龍彦，内匠 正太，小松 正治
2. 発表標題 アクトオシドを用いたマイクロシスチンLRおよびファロイジンの細胞毒性の抑制
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 堀田 夕貴，内匠 正太，橋本 海理，塩崎 一弘，池田 龍二，古川 龍彦，小松 正治
2. 発表標題 マイクロシスチンLRが誘導するアノイクス抵抗性細胞の低酸素応答
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 内匠正太, 小松正治, 柳澤裕之
2. 発表標題 ヒ素がコレステロール代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第86回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所、太田 英明、北畠 直文、白土 英樹	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 350
3. 書名 食べ物と健康 食品の科学(改訂第2版)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学水産学部 食品生命科学分野 ケミカルバイオロジー研究室 https://marinechemicalbiology.jimdofree.com/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小松 正治 (Komatsu Masaharu) (30325815)	鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授 (17701)	