

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00886

研究課題名(和文) HDLをターゲットとした食品由来硫黄化合物の新たな抗動脈硬化作用の解明

研究課題名(英文) The new study of anti-atherosclerotic effects of sulfuric compounds for HDL

研究代表者

近藤 春美 (KONDO, Harumi)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80401602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高密度リポタンパク質(HDL)は動脈硬化巢中の泡沫化マクロファージから余分なコレステロールを引き抜いて肝臓へと戻す抗動脈硬化作用を有する。本研究では硫黄化合物のコレステロール引き抜き能について検討した。硫黄化合物は、ニンニクに含まれるアリルシステインスルホキシド(ACSO)とメチルシステインスルホキシド(MCSO)およびその代謝物であるジアリルジスルフィド(DADS)とジアリルトリスルフィド(DATS)、ブロッコリーに含まれるスルフォラファン(SFA)とスルフォラフェン(SFE)を用いた。その結果、コントロールと比較して、DADS、DATS及びSFAはコレステロール引き抜き能が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫黄化合物を含むニンニクや玉ねぎは日本人の食生活に密接に関係していることから、有病者だけでなく未病者の健康寿命の延長も期待できるという点で公衆衛生的見地からも多大な貢献が期待できる。申請者は食事因子に着目した実験を行い、硫黄化合物の中からニンニク香気成分がコレステロール引き抜きを促進することを発見した。今回、コレステロール引き抜きを増大させる硫黄化合物を発見したことにより、これらの化合物をリード化合物とした日本人の主要死因である癌と動脈硬化の未病分野への予防として応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Reverse cholesterol transport (RCT) from macrophages to feces is a mechanism critical to the anti-atherogenic property of HDL. The present study was undertaken to investigate the effects of sulfuric compounds on HDL-mediated cholesterol efflux from the macrophages. Sulfuric odors of garlic; diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS) and their precursors; S-methyl-L-cysteine sulfoxide (MCSO) and S-allyl-L-cysteine sulfoxide (ACSO), respectively, were used. THP-1 cells were maintained in RPMI 1640 containing 10% FBS. The cells were labeled with [3H] cholesterol in media for 24 hours and incubated with sulfuric odor of garlic or its precursor in the presence and absence of HDL for 24 hours. The percentage cholesterol efflux was calculated by dividing the media-derived radioactivity by the sum of the radioactivity in the media and the cells. Results: Both DADS and DATS enhanced HDL-mediated cholesterol efflux from THP-1 macrophages.

研究分野：食品栄養学

キーワード：HDL コレステロール 動脈硬化 硫黄化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化性疾患である心疾患・脳血管疾患は我が国の死因統計において、およそ3割を占めている。(厚生労働省, 2017)動脈硬化症は血管の最も内側にある血管内皮が危険因子により傷つき、余剰な低比重リポタンパク質 (LDL) コレステロールが血管内皮から血管壁内部に入り込み、LDL コレステロールを排除しようと単球が血管内皮に侵入することにより進行する。血管壁に侵入した単球はマクロファージに分化し、マクロファージが脂肪やコレステロールを取り込む泡沫細胞に分化する。泡沫細胞が血管壁に蓄積することによりアテロームが形成され、動脈硬化症となる。動脈硬化症が原因となり血流減少や血栓が出来ることにより心疾患、脳血管疾患を発症する。(北, 1999) 動脈硬化症は泡沫マクロファージ細胞から高比重リポタンパク質 (HDL) がコレステロールを引き抜いて肝臓に戻す作用 (コレステロール逆転送) の促進がアテローム動脈硬化症の進行を予防する。また、アテローム性動脈硬化症の後退さえも誘発する可能性がある。(Cuchel M *et al.*, 2006)

(2) 近年、生活習慣病に予防効果のある食品に注目が集まっている。1991年には栄養改善法により、からだの生理学的機能などに影響を与える保健効能成分を含む食品である特定保健用食品が定義された。2015年には国が安全性および機能性検査を行わないが、科学的根拠が示された食品である機能性表示食品が制度として開始し、国民が健康食品の選択を行う機会が増加した。そして食品企業も多くの機能性表示食品を開発し、1053件の機能性表示食品が販売されている。(日本健康・栄養食品協会, 2018)

### 2. 研究の目的

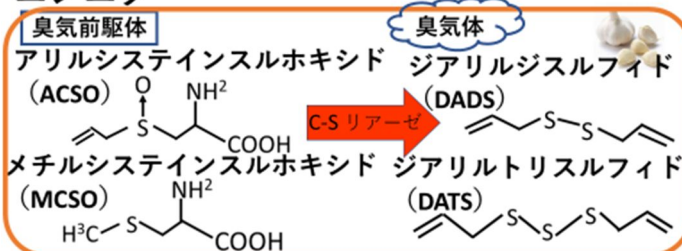
硫黄化合物はニンニク (*Allium sativum*) 等のネギ属 (*Allium*) の野菜、ブロッコリー (*Brassica oleracea var. italica*) やダイコン (*Raphanus sativus var. longipinnatus*) 等のアブラナ科の野菜に含まれる臭いや辛み成分であり、硫黄 (S) を含む物質の総称である。ニンニクは、臭気前駆体であるアリルシステインスルホキシド (ACSO) に C-S リアーゼが働くことで、特有の臭い成分であるジアリルジスルフィド (DADS) やジアリルトリスルフィド (DATS) 等の臭気体が生成する。また、ACSO の類縁化合物としてメチルシステインスルホキシド (MCSO) が存在する (内田, 2009)。ニンニクに含まれるこれらの成分は、癌の予防効果を示すこと (Michael and Silvia, 2017) に加え、最近の研究では、動脈硬化への予防効果が示唆されている (Tsui *et al.*, 2018)。また、ブロッコリーに含まれるスルフォラファン (SFA)、ダイコンに含まれるスルフォラフェン (SFE) は、イソチオシアネートとして知られ、植物体を持つミロシナーゼという酵素が働くことで生成する。これらの物質においても癌への予防効果等の薬理効果があることが報告されている (Maria *et al.*, 2017)。しかし、HDL に関する動脈硬化予防の検討についてはこれまで報告されていない。そこで、本研究では硫黄化合物のコレステロール引き抜き能について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬

<sup>3</sup>硫黄化合物は、研究分担者である日本大学生物資源科学部生命化学科食品化学研究室より提供していただいたアリルシステインスルホキシド (ACSO)、メチルシステインスルホキシド (MCSO)、ジアリルジスルフィド (DADS)、ジアリルトリスルフィド (DATS)、スルフォラファン (SFA)、スルフォラフェン (SFE) の計6種類を使用した。(図.1)

#### ニンニク



#### ブロッコリー

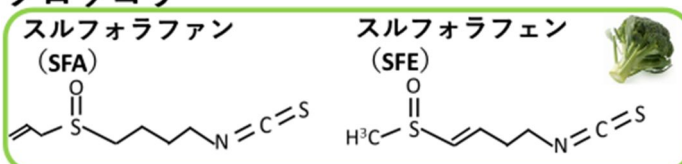


図.1 実験に使用した硫黄化合物

実験に使用した RPMI-1640 培地、Bovine Serum Albumin (BSA) はシグマアルドリッチジャパンのものを使用した。また、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヘキサンおよび2-プロパノールは

和光純薬工業株式会社のものを使用した。ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、ペニシリンストレプトマイシンはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、リン酸緩衝生理食塩水は、株式会社細胞科学研究所のものを使用した。FETAL BOVINE SERUM (FBS)はTissue Culture Biologicalsのものを使用した。H-コレステロールはパーキン・エルマーより購入した。

#### (2)コレステロール引き抜き能の測定方法

THP-1 マクロファージ様細胞の作製ヒト単球由来の THP-1 細胞は、CO<sub>2</sub>インキュベーター(5 % CO<sub>2</sub>、37 °C、BNA600、ヤマト科学株式会社)下で 10 %FBS 添加 RPMI1640 培地にて培養した。THP-1 細胞に 320 nM の PMA を添加し、THP-1 マクロファージ様細胞に分化させ CO<sub>2</sub>インキュベーター(5 %CO<sub>2</sub>、37 °C、BNA600、ヤマト科学株式会社)内で 72 時間培養した。その後、0.1% BSA 添加 RPMI1640 培地にトリチウム標識したコレステロールを 0.33 μCi/mL 添加し、THP-1 マクロファージ様細胞に取り込ませ、CO<sub>2</sub>インキュベーター(5 %CO<sub>2</sub>、37 °C、MCO-19AIC、SANYO 社)内で 24 時間培養した。その後、0.1 %BSA 添加 PBS で 1 well/500 μL ずつ入れて洗浄し、0.1%BSA 添加 RPMI1640 培地に溶解した硫黄化合物と 50 μg/mL の HDL (SIGMA 社)を添加して HDL 存在下または非存在下で CO<sub>2</sub>インキュベーター(5 %CO<sub>2</sub>、37 °C、MCO-19AIC、SANYO 社)内で 24 時間培養した。その後、培地をマイクロチューブに移し、15000 rpm で 10 分間遠心分離 (Microcentrifuge1524、alexred 社)し、その上澄培養液をシンチレーションバイヤルに入れ、シンチレーションカクテル(UltimaGold TM、PerkinElmer 社)を 4 mL ずつ入れた後、液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb4910TR、PerkinElmer 社)を用いて放射能測定した。培地をマイクロチューブに移して空になった 24 穴プレートに 0.1%BSA 添加 PBS を 1 well/500 μL ずつ入れて洗浄し、ヘキサン：イソプロピルプロパノール(1:1)を 1 well/500 μL ずつ入れ、卓上小型振とう機(Shake-LR、TAITEK 社)で 60 分間振とう後、シンチレーションバイヤルに入れた。その後、空になった 24 穴プレートにヘキサン：イソプロピルプロパノール(1:1)を 1 well/500 μL ずつ入れ、卓上小型振とう機(Shake-LR、TAITEK 社)で 60 分間振とう後、先程のシンチレーションバイヤルに入れ、シンチレーションカクテル(UltimaGold TM、PerkinElmer 社)を 4 mL ずつ入れた後、液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb4910TR、PerkinElmer 社)を用いて放射能測定した。硫黄化合物のコレステロール引き抜き能は、培地中の放射能を培地中と細胞中の放射能で割ることで算出した。

#### (3)統計学的処理

結果は平均±標準偏差で表した。統計学的検定には検定ソフト JMP4.0 (SAS インスティテュートジャパン社)を用いた。有意水準を 0.05 とし、p<0.05 を有意差ありと判断した。

### 4. 研究成果

#### (1) ニンニク由来硫黄化合物がコレステロール引き抜き作用に及ぼす影響

ニンニクでは DADS 10 μM で 104.1±1.5% (p<0.05), 100 μM で 106.4±2.1% (p<0.05) であり、どちらも有意差がみられた(表 1-1)。DATS では、10 μM のとき 105.1±1.4%, 100 μM のとき 103.3±0.6% (p<0.05) であり、DADS と同じく DATS でも有意差がみられる結果となった(表 1-2)。また、ニンニクの臭気前駆体である ACSO では 1 μM のとき 97.5±0.8%, 10 μM のとき 90.8±0.9%, 100 μM のとき 100.9±0.7 という結果になった。100 μM では引き抜き能が増加したが、有意差はみられなかった(表 1-3)。また、MCSO では、1 μM のとき 95.6±0.4%, 10 μM のとき 93.3±0.5%, 100 μM のとき 95.6±1.8%という結果になり、どの濃度においても引き抜き能の増加は見られなかった(表 1-4)。

表 1-1. DADS がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 1.4
DADS 1 μM	98.3 ± 1.6
DADS 10 μM	104.1 ± 1.5
DADS 100 μM	106.4 ± 2.1

表 1-2 . DATS がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 0.3
DATS 1 μM	114.1 ± 3.9
DATS 10 μM	105.1 ± 1.4
DATS 100 μM	103.3 ± 0.6

表 1-3 . ACSO がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 1.0
ACSO 1 μM	97.5 ± 0.8
ACSO 10 μM	90.8 ± 0.9
ACSO 100 μM	100.9 ± 0.7

表 1-4 . MCSO がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 1.9
MCSO 1 μM	95.6 ± 0.4
MCSO 10 μM	93.3 ± 0.5
MCSO 100 μM	95.6 ± 1.8

(2) プロッコリー由来硫黄化合物がコレステロール引き抜き作用に及ぼす影響

プロッコリーに含まれる SFA では 1 μM のとき 116.5 ± 0.8% (p<0.05), 10 μM のとき 110.7 ± 3.3%, 100 μM のとき 111.3 ± 1.0% であり、1 μM において有意差がみられた (表 2-1)。SFE では 1 μM のとき 109.9 ± 1.8% (p<0.05), 10 μM のとき 89.6 ± 2.3%, 100 μM のとき 101.3 ± 2.7% (p<0.01) であり、1 μM, 100 μM において有意差がみられた (表 2-2)。

表 2-1 . SFA がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 2.5
SFA 1 μM	116.5 ± 0.8
SFA 10 μM	110.7 ± 3.3
SFA 100 μM	113.3 ± 1.0

表 2-2 . SFE がコレステロール引き抜きに及ぼす影響

サンプル	コレステロール引き抜き能 (%)
control	100.0 ± 1.4
SFE 1 μM	109.9 ± 1.8
SFE 10 μM	89.6 ± 2.3
SFE 100 μM	101.3 ± 2.7

硫黄化合物6種類をマクロファージ様細胞に添加し、HDLによるコレステロール引き抜き能を検討した。硫黄化合物がコレステロール引き抜き能に与える影響を調べたところDADS, DATS, SFA, SFEにおいて引き抜き能の増加が見られた。このことから、ニンニクでは特に代謝産物、またプロッコリーの硫黄化合物にはコレステロール引き抜き能を有する可能性が示唆された。硫黄化合物による抗動脈硬化作用に関する論文は、ニンニクではラットによるLDLコレステロールの減少及びHDLコレステロールの増加が報告されている (Tahereh *et al.*, 2015)。また、プロッコリーに含まれるSFAはHDLコレステロール値を低下させる内皮リパーゼ (EL) の発現を阻害する可能性が報告されている (Annukka *et al.*, 2010)。このことから、硫黄化合物は抗動脈硬化作用を有すると考えられる。しかし、HDLを介したコレステロール引き抜き能に関しては研究がないため、今回の結果からどのようなメカニズムで引き抜き能が増加したか検討が必要である

<引用文献>

厚生労働省, 「平成 29 年 人口動態統計 (確定数) の概況」, 性別にみた死因順位 (第 10 位まで) 別 死亡数・死亡率 (人口 10 万対)・構成割合

[https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei17/dl/10\\_h6.pdf](https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei17/dl/10_h6.pdf) (アクセス日 2019 年 3 月 1 日)

北徹, 1999, 動脈硬化の最前線 -発症のメカニズムと臨床 (新臨床医のための分子医学シリーズ)

Cuchel M, Rader DJ, 2006 Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* **113(21)**, 2548-2555

公益財団法人 日本健康・栄養食品協会 「[トクホ]ごあんない 2018 年度版」5-9

内田あゆみ, 2009, ジャンボリーキのスルフィド生成に関わる成分の検索と同定, *食品科学工学会誌*, 280-285

Michael T. Puccinelli 1 and Silvia D. Stan, 2017, Dietary Bioactive Diallyl Trisulfide in Cancer Prevention and Treatment, *International Journal of Molecular Sciences* **18(8)**, 1645

Pi-Fen Tsui, Chin-Sheng Lin, Ling-Jun Ho and Jenn-Haung Lai, 2018, Spices and Atherosclerosis, *Nutrients*, **10(11)**, 1724

Maria Russo, Carmela Spagnuolo, Gian Luigi Russo, Krystyna Skalicka-Woźniak, Maria Daglia, Eduardo Sobarzo-Sánchez, 2018, Seyed Fazel Nabavi and Seyed Mohammad Nabavi, Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment, *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58(8)**, 1391-1405

動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版 (動脈硬化学会)

<https://www.mhlw.go.jp/content/10901000/000393476.pdf> (アクセス日 2019 年 3 月 1 日)

近藤春美, 2012, HDL による動脈硬化制御機構 - ABCA1/G1 のタンパク質分解制御の役割 -, *上原記念生命科学財団研究報告集*, **26**, 111

近藤和雄, 清瀬千佳子, 大森 (平野) 玲子, 斎藤尚子, 近藤 (宇都) 春美, 2007, 食事と心疾患

大森 (平野) 玲子, 2007 食事因子と動脈硬化性疾患に関する研究, *日本栄養・食糧学会誌*, **60(1)**, 3-9

内藤茂三, 山口直彦, 横尾良夫, ネギ類植物からの抗酸化物質の検索, *日本食品工業学会誌*, **28(6)**, 291-296

Annukka M. Kivelä Petri I. Mäkinen, Henna-Kaisa Jyrkkänen, Eero Mella-Aho, Yifeng Xia, Emilia Kansanen, Hanna Leinonen, Inder M. Verma, Seppo Ylä-Herttuala and Anna-Liisa Levonen, 2010, Sulforaphane inhibits endothelial lipase expression through NF- $\kappa$ B in endothelial cells, *Atherosclerosis*, **213(1)**, 122-128

Tahereh, E., Behnoosh, B., Maryam A. A., Rahman G. R., Amir F. F., Vahid, B., and Ali Asgari, High doses of garlic extract significantly attenuated the ratio of serum LDL to HDL level in rat-fed with hypercholesterolemia diet, 2015, *Diagnostic Pathology*, **10(1)**, 74

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Harumi Uto-Kondo, Shiori Kawahara, Katsunori Ikewaki, Hitomi Kumagai
2. 発表標題 The effects of sulfuric odors of garlic and their precursors on HDL-mediated cholesterol efflux from the macrophages
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 コレステロール引き抜き促進剤	発明者 近藤春美、平田拓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2020-067475	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	熊谷 日登美  (KUMAGAI Hitomi)  (20225220)	日本大学・生物資源科学部・教授    (32665)	
研究分担者	池脇 克則  (IKEWAKI Katsunori)  (40287199)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・教授   (82406)	