

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17923

研究課題名(和文)ポリフェノールの抗動脈硬化作用に関わる転写因子の網羅的同定とその作用機構の解明

研究課題名(英文)The comprehensive identification of transcription factors associated with anti-atherosclerotic effects of polyphenols and the clarification of the mechanisms

研究代表者

叶 奈緒美(KANOHI, Naomi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：30780267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノールの抗動脈硬化作用に関連する転写因子をTandem Mass Tag 解析を用いて網羅的に同定した。同定された転写因子の一つであるFoxM1の核内たんぱく質レベルは、酸化LDL処理により減少し、数種のポリフェノール(レスベラトロール、ピセイド、ヘスペレチン、エリオジクチオール)の処理により増加した。また、動脈硬化抑制に貢献するMFG-E8の遺伝子発現およびエフェロサイトーシス活性が、酸化LDL処理により減少し、レスベラトロール、ピセイド、ヘスペレチン、エリオジクチオールの処理により増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果は、ポリフェノールの抗動脈硬化作用の科学的な根拠を提供し、新規の分子基盤に基づいた機能性食品の開発に貢献することが期待される。また、本研究で確立したシグナル関連転写因子の網羅的同定システムは、転写因子間のクロストークの発見による遺伝子発現の新規制御機構の解明を含む新たなシグナル伝達機構の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively identified the transcription factors associated with anti-atherosclerotic effects of polyphenols using the Tandem Mass Tag analysis. The oxidized LDL decreased and several polyphenols (resveratrol, piceid, hesperetin and eriodictiol) increased the protein level in nuclear of FoxM1, one of the identified transcription factors. Furthermore, the oxidized LDL decreased and resveratrol, piceid, hesperetin and eriodictiol increased the gene expression of MFG-E8 and efferocytosis activity, both contribute to the suppression of atherosclerosis.

研究分野：食品科学

キーワード：機能性食品成分 ポリフェノール 動脈硬化 転写因子 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の上位を占めている心疾患と脳血管疾患は主に動脈硬化を原因として起こる。酸化 LDL の生成が動脈硬化につながる初期のイベントであると認められている。酸化 LDL が血管壁に沈着すると、マクロファージがこれを次々と取り込み、大量に酸化 LDL を取り込んだマクロファージは細胞死し、コレステロールの塊が残り、粥状のプラークが血管壁にたまることで動脈硬化が進行する。現在のところ、動脈硬化に対する画期的な治療法は確立されていない。一方で、動脈硬化は食生活、運動、喫煙、ストレスなどの生活習慣と深いつながりがあることから、日々の生活の中で動脈硬化促進因子を排除・低減することにより、動脈硬化を予防することが可能と考えられる。

ポリフェノールは植物性食品や飲料に広く含まれ、日常的に摂取する成分であり、抗動脈硬化活性を有することが疫学的な研究により明らかとなっている。また、これまでの動物実験や細胞実験の結果から、ポリフェノールは、抗酸化作用や、一酸化窒素産生の増加、炎症や脂質代謝の調節、内皮機能の改善などを介して抗動脈硬化作用を発揮することが明らかとなっている。一方で、これらの生理活性を担う転写因子群の全体像が不明であることが上流メカニズム解明の障壁となっている。さらに、ポリフェノールはその基本骨格や水酸基の結合位置の違いにより機能性の種類や強さが異なることが報告されている。

したがって、ポリフェノールの抗動脈硬化作用の体系的な理解を目指し、様々な種類のポリフェノールに応答する転写因子を網羅的に特定する必要があると考えた。

2. 研究の目的

食品由来ポリフェノールについて抗動脈硬化作用に関与する転写因子を網羅的に同定し、ポリフェノールの抗動脈硬化効果に関わる作用メカニズムをさらに明らかにすることを目的とした。

具体的には、(1) 酸化 LDL による動脈硬化促進効果を抑制できるポリフェノールの種類とその至適処理条件の検討を行い、(2) 蛍光ディフェレンスゲル二次元電気泳動法 (2D-DIGE) および Tandem Mass Tag (TMT) 解析を用いて、ポリフェノールの抗動脈硬化作用に関連する転写因子を網羅的に同定し、(3) ポリフェノールの抗動脈硬化効果に関わる作用メカニズムのさらなる解明を目指す。

3. 研究の方法

実験に使用する酸化 LDL は、ヒトの末梢静脈血から超遠心分離法により単離した LDL を *in vitro* で酸化させて調製する (Kotosai et al., *Lipids* 2013)。この手法を用いることで、脂質過酸化の指標である thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 値が 10 倍以上増加することを既に確認している。ヒト単球性白血球細胞 THP-1 を 100 nM PMA 処理によりマクロファージへと分化させて実験に使用した。酸化 LDL と食品成分処理により発現が変動する核内たんぱく質の同定のために、2D-DIGE と TMT 解析を使用した。各種刺激による転写因子の核内移行やリン酸化レベルの変動は Western Blotting により評価し、遺伝子発現の変動は qRT-PCR により評価した。

4. 研究成果

(1) 酸化 LDL による動脈硬化促進効果を抑制できるポリフェノールの種類とその至適処理条件の検討

THP-1 マクロファージにおいて、酸化 LDL は CD36 と SR-A の mRNA 量を顕著に増加させた。これにより、調製した酸化 LDL が適切に作用していることが確認できた。さらに、数種のポリフェノールが酸化 LDL による CD36 および SR-A の mRNA 量の増加を有意に抑制することを qRT-PCR により明らかにした。

(2) 2D-DIGE および TMT 解析を用いた、ポリフェノールの抗動脈硬化作用に関連する転写因子の網羅的同定

まず、2D-DIGE を用いた転写因子の網羅的同定システムの確立に向けて、LPS シグナルに関わる転写因子 NF-kappaB が本システムで同定できるか検証を行った。ほとんどの転写因子は活性化により核内移行することから、まず、核内タンパク質の変動量を指標にした解析法を検討した。THP-1 マクロファージにおいて、LPS 刺激後に転写因子 NF-kappaB の核内移行が最大になる至適条件を Western Blotting により決定し、この処理条件を用いた 2D-DIGE 解析により、LPS 刺激の有無で発現量が変動する核タンパク質のスポットをいくつか確認できた。さらに、転写因子の多くは活性化によりリン酸化されることから、Wako 社の Phos-tag Agarose を用いたカラムクロマトグラフィーにより核タンパク質画分からリン酸化タンパク質画分を調製し、2D-DIGE に供したところ、LPS 刺激により発現量の増加するスポットをいくつか確認できた。

また、2D-DIGE により確認された LPS 刺激で発現変動のあった核タンパク質のスポットは NF-kappaB であることが確認された。しかし、転写因子は基本的に発現量が少なく、その他の転写因子の増減を 2D-DIGE で検出することは非常に困難であるという結論に至り、本システムによるスクリーニングを断念した。

次に TMT 解析を用いることにより、刺激により量的変動のみられる転写因子の網羅的同定を試みた。THP-1 マクロファージに酸化 LDL と各種ポリフェノールを単独で処理、もしくは組み合わせて処理し、その核画分を TMT 解析に供した結果、これらの処理により有意かつ顕著な発現変動を示す転写因子を多数同定することに成功した。これらの転写因子の中から動脈硬化シグナル経路に関連する転写因子を抽出し、これらについてヒートマップを作成することで変動パターンが明らかとなった。

(3) ポリフェノールの抗動脈硬化効果に関わる作用メカニズムのさらなる解明

TMT 解析を用いたスクリーニングシステムにより、ポリフェノールの抗動脈硬化作用に関連する転写因子として FoxM1 が同定された。FoxM1 の核内レベルは、酸化 LDL 処理により減少し、数種のポリフェノール(レスベラトロール、ピセイド、ヘスペレチン、エリオジクチオール)の処理により増加した。さらに、これらの変動は細胞内の FoxM1 の活性と連動していることが確認された。これに加えて、動脈硬化抑制に貢献する MFG-E8 の遺伝子発現およびエフェロサイトーシス活性が、酸化 LDL 処理により減少し、レスベラトロール、ピセイド、ヘスペレチン、エリオジクチオールの処理により増加することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Liu Xiaoyang, Takano Chiaki, Shimizu Tomomi, Yokobe Shintaro, Abe-Kanoh Naomi, Zhu Beiwei, Nakamura Toshiyuki, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 491
2. 論文標題 Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase ameliorates antiproliferation by benzyl isothiocyanate in human colon cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 209 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.07.078	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 Liu Yujia, Yamanaka Momoko, Abe-Kanoh Naomi, Liu Xiaoyang, Zhu Beiwei, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Murata Yoshiyuki, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 108
2. 論文標題 Benzyl isothiocyanate ameliorates acetaldehyde-induced cytotoxicity by enhancing aldehyde dehydrogenase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 305 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2017.08.016	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 Liu Xiaoyang, Abe-Kanoh Naomi, Liu Yujia, Zhu Beiwei, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Murata Yoshiyuki, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 81
2. 論文標題 Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase impairs the benzyl isothiocyanate-induced accumulation of autophagic molecules and Nrf2 in human colon cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2212 ~ 2215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1374830	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 Tang Yue, Naito Sho, Abe-Kanoh Naomi, Ogawa Seiji, Yamaguchi Shu, Zhu Beiwei, Murata Yoshiyuki, Nakamura Yoshimasa	4. 巻
2. 論文標題 Benzyl isothiocyanate attenuates the hydrogen peroxide-induced interleukin-13 expression through glutathione S-transferase P induction in T lymphocytic leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biochemical and Molecular Toxicology	6. 最初と最後の頁 e22054 ~ e22054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbt.22054	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 Nakamura Toshiyuki、Abe-Kanoh Naomi、Nakamura Yoshimasa	4. 巻 62
2. 論文標題 Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 11～19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.17-91	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Naomi Abe-Kanoh, Yuki Hashimoto, Haruka Yamamoto and Miyuki Uemura
2. 発表標題 The effects of resveratrol and piceid on macrophage efferocytosis
3. 学会等名 ICoFF2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	橋本 優希 (HASHIMOTO Yuki)		
研究協力者	山本 はるか (YAMAMOTO Haruka)		
研究協力者	上村 みゆき (UEMURA Miyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 晶子 (SUZUKI akiko)		
研究協力者	河合 慶親 (KAWAI Yoshichika)		