

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32618

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11110

研究課題名(和文)機能性食品成分がカイロミクロンの合成・分泌に与える影響の細胞生物学的検討。

研究課題名(英文)Cell-biological analysis of the effects of functional food ingredients on the synthesis and secretion of chylomicron.

研究代表者

松島 照彦(Matsushima, Teruhiko)

実践女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：60199792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食後高脂血症を抑制する食品成分とその作用機序の解析を目的として、培養腸管細胞Caco2、反転腸管系、家兔個体を用い、食品成分のカイロミクロンの構造タンパクであるapoB48分泌、動脈硬化および関連遺伝子に与える影響を観察し、resveratrol, genistein, curcuminは腸管細胞および反転腸管からのapoB48分泌を減少させ、APOB, A1CF, APOBEC1の遺伝子発現調節を介していることが明らかとなった。また高脂肪飼育家兔においては血中トリグリセライドを減少させ、大動脈脂肪線条の形成を抑制したため、これらの食品成分は動脈硬化発症の抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常などのリスクによる動脈硬化性疾患は、健康寿命の短縮や寝たきりの原因ともなり社会的に大きな問題である。これまで脂質異常や動脈硬化を抑制するという食品や成分が数多く挙げられているが、実験手法に乏しく解析が進んでこなかった、本研究は独自に樹立したapoB48特異抗体を用い、細胞、組織、個体の3レベルにおけるタンパクと遺伝子レベルにおいて研究を行った。その成果として、腸管細胞、腸管組織、個体において、curcuminなどの食品成分が、脂質異常、動脈硬化薬の形成を抑制しうることをタンパク、遺伝子レベルにおいて解明できたことは、医薬品の開発にもつながり、大きな社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of food ingredients on postprandial hyperlipidemia, a potent risk of atherosclerosis, secretion of apolipoproteinB48, the constitutive protein of chylomicron and expression of relevant genes were analyzed using cultured human intestinal cell Caco2, everted sac system of rabbit intestine and rabbits fed with high fat diet. By resveratrol, genistein and curcumin, apoB48 secretion and gene expression of APOB, A1CF and APOBEC1 was decreased in Caco2 cells and everted sac system. In rabbits, feeding of these food ingredients decreased serum triglyceride level and suppressed lipid streak formation in aorta. It is expected that these ingredients and their derivatives have potentials to suppress dyslipidemia and atherosclerosis.

研究分野：内科学、臨床栄養学、脂質代謝学

キーワード：動脈硬化 カイロミクロン アポリポ蛋白 反転腸管 培養細胞 レスベラトロール ゲニステイン
クルクミン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の発症リスクとして食後高脂血症の影響が注目されている。食事由来の腸管リポタンパクであるカイロミクロン (以下 CM) の分析には apoB48 の測定が必要であるが、apoB48 は apoB100 と共通の遺伝子から翻訳され apoB100 の N 末端側とアミノ酸配列が同一であるため、特異的に測定するための抗体を得ることは難しいと考えられてきた。そこで我々は apoB48 の C 末端の合成ペプチドを用いて ApoB48 特異的モノクローナル抗体 4C8 を樹立し、これを用いて ELISA 系を開発し (文献 1)、apoB48 の定量測定が可能となった。

近年、いくつかの食品の機能性成分の動脈硬化予防に対する効果について報告が見られている。培養細胞系としては Hidalgo によって樹立された Caco2 極性培養系があり、腸管組織系としては Wilson & Wiseman が開発した反転腸管系において吸収、分泌の実験が行われている。しかし、動物レベルも含め様々な研究が行われているものの、apoB48 分泌を検討した報告は少なく、特異的な ELISA 法を用いた報告はこれまでになかった。また APOB 遺伝子、編集遺伝子の発現とも併せて観察した報告は見られていない。

2. 研究の目的

本研究では、CM 分泌抑制を通じて動脈硬化予防効果が期待される食品成分を探索し、その作用機序を解明することを目的として、血清脂質の改善作用が報告されているワインポリフェノールの成分である resveratrol (Res)、大豆イソフラボンの成分である genistein (Gen)、ウコンの成分の curcumin (Cur) について、細胞、組織、個体の 3 つのレベルにおいて、apoB48 の合成と分泌に与える影響を観察することとした。また、その他のリポ蛋白成分の TG、apoB100、apoAI について検討を行った。さらにリアルタイム PCR を用いて、アポ蛋白 B 遺伝子、および、B48mRNA への編集に携わるシチジンデアミナーゼ複合体である *APOBEC1* とその相補因子である *AICF* について遺伝子発現の測定を行い、食品が脂質の吸収と分泌に与える細胞生物学的な機序を解明することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 脂質ミセル溶液の作成

Oleic acid, cholesterol, 2-monooleoylglycerol, phosphatidyl choline, lyso-phosphatidyl choline, sodium taurocholate の各溶液を培地に分注し超音波槽で処理することにより脂質ミセルを作成した。

(2) 食品成分の調製、添加と培地の回収

Resveratrol, genistein, curcumin (SIGMA) を DMSO に溶解し、培養系管腔側または反転腸管浸漬液に脂質ミセルと共に添加した

(3) Caco2 培養細胞

Caco2 細胞を、多孔性メンブレンをもつ二重底デッシュに濃厚播種 (6×10^5 cells/cm²) し、極性培養による吸収上皮様の単層を形成させた (文献 2)。管腔側である上槽には脂質ミセルと種々の食品成分を加えて培養した。基底膜側に分泌されたリポ蛋白を含む培地を回収した。

(4) 反転腸管

New Zealand White rabbit を麻酔下に開腹し、小腸切片を採取し、反転腸管嚢 (sac) を作成した (文献 3) (本研究は実践女子大学生生活科学部動物実験委員会の審査、承認を受けて実施した)。Sac は 37°C で酸素バブルを通した脂質ミセル溶液に浸漬し、漿膜側に分泌されたリポ蛋白を含む sac 内腔液を回収した。

(5) 家兔個体

New Zealand White rabbit 通常食または高脂肪食 LRC-4 に、Res, Gen, Cur を加え各 2 週間給餌した。耳静脈より採血を行った。麻酔下に開腹し、小腸および大動脈を採取した。

(6) アポタンパクの測定

培養細胞の基底膜側培地、反転腸管系の内腔漿膜側培地および家兔血清中のアポタンパクは ELISA 法、apoB48 (Shibayagi)、apoB100 (Immuno-Biological Laboratories)、apoAI (MABTECH) を用いて測定した。

(7) トリグリセライド (TG) の測定

培養培地、sac 内腔培地または血清に生理食塩水を重層し、20,000rpm で 30 分超遠心し、CM を採取した。CM 分画中の TG をトリグリセライド E-テストワコー (GPO・DAOS 法) を用いて測定した。

(8) 遺伝子発現の測定

培養細胞または反転腸管組織から得た cDNA を real-time PCR (Applied Biosystems) を用いて *ABOB*、*APOBEC1*、*AICF* (家兔実験では *Apob*、*Apobec1*、*Aicf*) 各遺伝子の発現を、 β -*ACTIN* (β -*Actin*) を内在コントロールとして解析した。

4. 研究成果

(1) Caco2 細胞を用いた食品成分の影響の検討

Res、Gen および Cur の添加によって、apoB48 分泌は濃度依存的に減少した(図1)。 apoB100 は測定感度以下であった。 Cur の添加は apoAI を濃度依存的に減少させた。 TG は、Res、Gen の添加によりわずかに増加し、Cur の添加により減少が見られた。

細胞の生存率はいずれの処理を行った後も 95%以上であった。

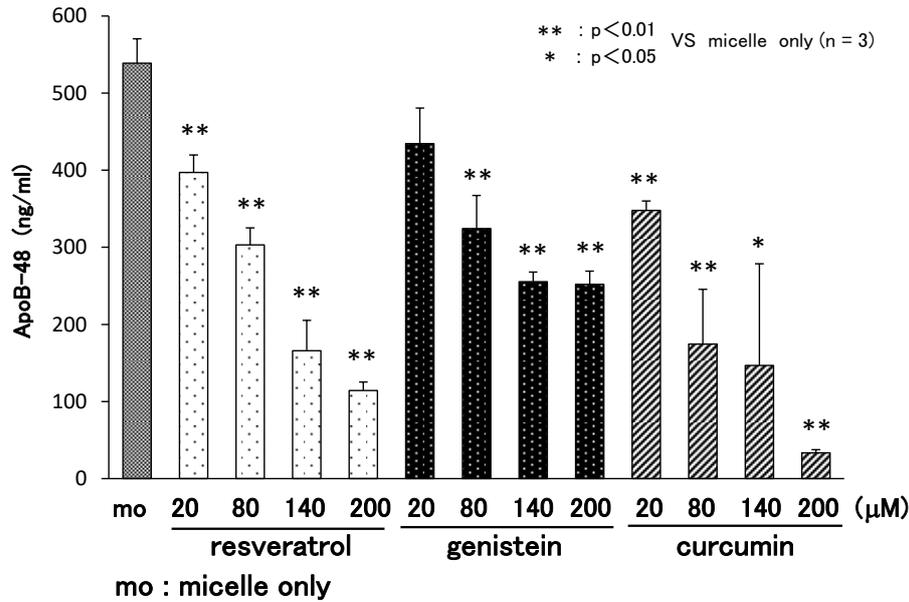


図1. 培養 Caco2 細胞からの apoB48 の分泌に食品成分の添加が与える影響.

遺伝子発現のリアルタイム PCR 分析では、Res、Gen および Cur の添加において、*APOB*、*APOBEC1*、および *AICF* の発現の減少がみられた。 Res の添加では、*AICF* の発現に濃度依存的な減少がみられ、Gen の添加の *APOBEC1* の発現で減少がみられた。 また、Cur 添加では *ABOB*、*AICF* の発現に濃度依存的な減少がみられた。

(2) 反転腸管系からの apoB48 分泌に対して食品成分の添加が与える影響

反転腸管系からの apoB48 分泌は、3 成分とも対照に比べて減少が見られた(図2)。 TG 分泌は 3 成分とも対照に比べ、大きな変化はなかった。

遺伝子発現の解析では、Res の添加により *Apob* の発現の濃度依存的な減少がみられた。*Apobec1* と *aicf* は対照に比べ、増加がみられた。 Gen では *Apob* の発現に濃度依存的な有意な減少が見られた。*Apobec1* と *Aicf* は対照に比べ発現に有意な増加がみられた。 Cur では、*Apob*、*Apobec1*、*aicf* すべて、濃度依存的な有意な減少が見られた。

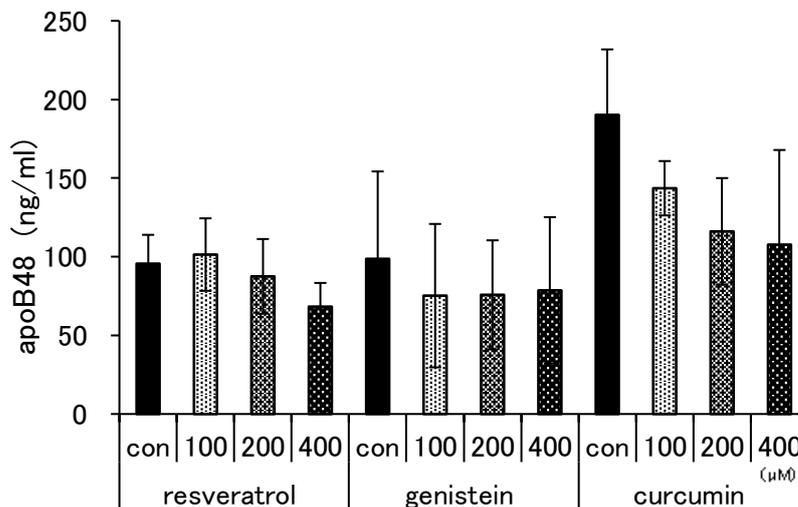


図2. 家兔反転腸管からの apoB48 分泌に対して食品成分が与える影響.

(3) 家兔個体を用いた食品成分が血中の apoB48, TG および動脈硬化に及ぼす効果の検討
 血漿中の apoB48 分泌は Day8 と比べ Day22 において対照群、Res 群、Gen 群、Cur 群、いずれも減少がみられたが、投与群における減少率は対照群に比べ有意な差はなかった。血漿中の TG 濃度の増加率は、Gen 投与群、Cur 投与群では対照群に比べて抑制がみられた (図 3)。

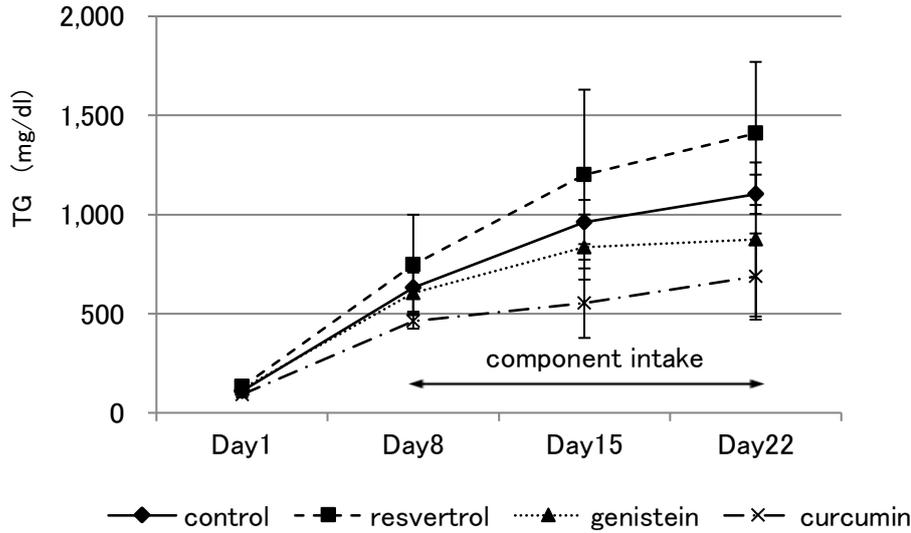


図 3. 食品成分を投与した高脂肪餌飼育家兔の血清 TG 濃度の推移

小腸組織の遺伝子発現は、Res、Cur 投与の *A1cf* の発現において減少の傾向がみられた。

食品成分を長期投与した家兔から得た反転腸管において、Gen、Cur を投与した個体の反転腸管からの TG 分泌は対照に比して、有意な減少がみられた。(図 4)

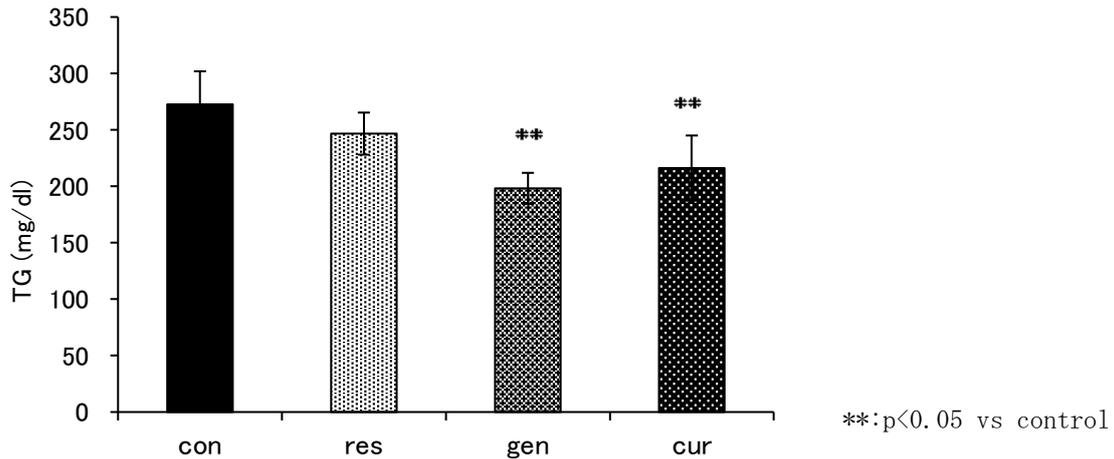


図 4. 食品成分を長期投与した家兔から得た反転腸管における TG の分泌

高脂肪食、および高脂肪食に食品成分を加えた餌で長期間飼育した家兔の大動脈において、対照動物の大動脈には脂肪線条の形成がみられたが、Res 投与兔ではわずかしかがみられず、Gen、Cur 投与兔では全く認められなかった。(図 5)



図 5. 高脂肪食、および高脂肪食に食品成分を加えた餌で 2 週間飼育した家兔の大動脈。対照動物の大動脈には脂肪線条の形成がみられた。

(4) 成果のまとめ

ApoB48 モノクローナル抗体を用いて、細胞レベルである Caco2 極性培養系、および組織レベルである家兔反転腸管系において CM と apoB48 の測定系を確立し、食品成分の影響の定量的な評価を可能とした。あわせて *APOB* および編集因子の遺伝子発現の測定で作用機序を明らかにすることができた。細胞系、反転腸管系において、Res, Gen, Cur は apoB48 の分泌を減少させた。この減少はトリグリセライド自体に対する影響より大きく、apoB48 は CM 粒子 1 個当たり 1 分子存在しているので、分泌される CM 粒子数を減少させていると考えられ、また生体内では CM の代謝産物である動脈硬化惹起性の CM レムナントの粒子数を減少させると考えられる。CM レムナントは apoB48 受容体を介してマクロファージに取り込まれるが (文献 4)、我々は動脈硬化性疾患症例において大動脈に apoB48 を含むリポタンパクの沈着を確認しており (文献 5)、apoB48 分泌の抑制は、動脈硬化リスクである CM レムナントの粒子数を減らすことを通じ、動脈硬化を抑制に通じると考えられる。また、この apoB48 の減少は *APOB* 遺伝子、および、apoB100mRNA から apoB48mRNA を編集する酵素群の遺伝子である *AICF* および *APOBEC1* 遺伝子の発現に対する抑制を介していることが示された。

さらに、動物個体レベルにおいて、高脂肪餌飼育家兔に対する Res, Gen, Cur の投与は血清トリグリセライド濃度を低下させ、大動脈脂肪線条の形成を抑制した。

これらの食品成分またはその誘導体は、ヒトにおいても食事性高脂血症を抑制できる可能性があり、今後の進展は動脈硬化性疾患の発症の抑制に寄与する可能性があると考えられる。また、実験、測定系を確立したことにより、今後、種々の食品成分について食事性高脂血症に対する効果を探索し、機序を解明していくことができると考える。

本研究に関して開示すべき利益相反 COI はない。

引用文献

- (1) Kinoshita M, Kojima M, Matsushima T, Teramoto T: Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin Chim Acta*, 351(1-2): 115-120, 2005.
- (2) Chateau D, Pauquai T, Delers F et al.: Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol*, 202(3): 767-776, 2005.
- (3) Wiseman TH and Wilson G: The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*, 123(1): 116-125, 1954.
- (4) Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK et al.: A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(13): 7488-7493, 2000.
- (5) Nakano T, Nakajima K, Niimi M et al.: Detection of apolipoproteins B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases. *Clin Chim Acta*. 390(1-2): 38-43, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 松島照彦, 松岡康浩, 富重慶子	4. 巻 2
2. 論文標題 食品の機能性成分が食事性カイロミクロンの代謝に与える影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 968, 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富重慶子
2. 発表標題 ウサギ反転腸管系を用いた脂質吸収とカイロミクロンの分泌の測定
3. 学会等名 第41回日本臨床栄養学会（招待講演）
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	富重 慶子 (Tomishige Keiko)	実践女子大学・食生活科学科・非常勤講師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------