

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19880027
 研究課題名（和文） トコトリエノールとトコフェロールによる肝臓 LDL 受容体の発現調節作用の解明
 研究課題名（英文） Study on induction of LDL receptor in HepG2 cells by tocotrienol and tocopherol
 研究代表者
 川上 祐生（KAWAKAMI YUKI）
 岡山県立大学・保健福祉学部・助教
 研究者番号：30453202

研究成果の概要：動脈硬化の発症と進展には、血液中のコレステロール量が密接に関わっている。血液中の主要なコレステロール運搬体である LDL の高値は、動脈硬化の危険因子の一つとして注目されている。本研究では、トコフェロールとトコトリエノールの 2 種類のビタミン E のうち、イネやパームなどの特定の植物に含まれているトコトリエノールが、血中の LDL 量を制御できる肝臓の LDL 受容体の量を上昇させることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：トコトリエノール、トコフェロール、LDL 受容体、発現調節

1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとする先進諸国では、高齢化の進行とともに生活習慣病患者が急増している。その中で、アテローム性動脈硬化が原因で発症する生活習慣病患者は世界的に多く、その予防と対策は急務となっている。アテローム性動脈硬化は動脈内膜中にコレステロールや線維性結合組織などが蓄積し、動脈壁にプラークが形成される状態である。その結果、血流不全や血栓形成などを引き起

こし、脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な疾患を発症させる。アテローム性動脈硬化の発症と進展の初期段階には、血中コレステロール量が密接に関わっている。とくに、血液中の主要なコレステロール運搬体である LDL 量の高値は、アテローム性動脈硬化の危険因子の一つとして注目されている。血液中の LDL 量は LDL 受容体により制御され、LDL 受容体を介して肝臓や末梢組織に取り込まれ、細胞にコレステロールを供給する。LDL 受容体

の発現が減少すると LDL は血液中に留まり、動脈硬化リスクが高まる。現在、動脈硬化の対策として、LDL 受容体をターゲットにした研究が世界的に行われている。

イネ、パーム、コムギなどの世界を代表する特定の植物には、トコトリエノール(T3)という食品成分が含まれている。T3 は、クロマン環にイソプレノイド鎖が結合した構造であり、クロマン環にフィチル鎖が結合したトコフェロール (TOC) と構造が類似している。さらにクロマン環へのメチル基の結合位置と数の違いにより、それぞれ 4 種類の同族体が存在する(図 1)。近年、この T3 の抗癌、抗血管新生、コレステロール低下などの生理作用が明らかにされ、注目されている。しかしながら、T3 は TOC と化学構造が類似しているにも関わらず、このような T3 の作用は、TOC には無いか極めて弱い。T3 と TOC の側鎖構造と生理活性の強さに関連性があることが予想されるが、その明確な理由は不明である。

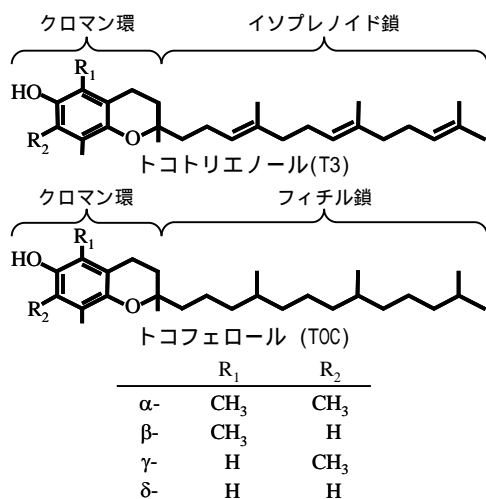


図1 トコトリエノールとトコフェロールの化学構造

従来、T3 によるコレステロール低下作用は肝臓のコレステロール合成律速酵素の阻害によることとされ、LDL 受容体に対する影響についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、LDL 受容体の発現に及ぼす T3 と TOC の影響を比較しながら、T3 と TOC の化学構造と活性の関連性、T3 による作用機構、生体内での有効性などについて検討し、LDL 受容体発現調節作用の一端を明

らかにすることで、アテローム性動脈硬化の予防の可能性を提示したいと考えてこの申請課題を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、T3 および TOC が肝臓の LDL 受容体の発現増加に対する影響に着目して、その作用機構を調べるとともに、実験動物に T3 あるいは TOC を経口投与して生体内での有効性を検討する。具体的な研究目的は以下の通りである。

- ・肝臓 LDL 受容体の発現に及ぼす T3 と TOC の影響をヒト肝臓由来の培養細胞を用いた実験で検討するとともに、T3 および TOC の細胞への取り込みと活性の相関を明らかにする。
- ・T3 と TOC による肝臓 LDL 受容体の発現調節作用のメカニズムを培養細胞実験で明らかにする。
- ・T3 あるいは TOC の動脈硬化予防成分としての有効性を動物実験で検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝癌由来培養細胞 (HepG2) の生存率に及ぼす T3 と TOC の影響

HepG2 細胞を 96-well plate に 37 °C で 24 時間前培養して定着させた。その後培地を除き、種々の濃度の T3 あるいは TOC を含む培養液に換えて 37 °C で 24 時間培養した。0.5 μg/ml の 3-(4, 5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) を含む培地に交換し 37 °C で反応後、イソプロパノール-HCl 混液で反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにて 630 nm をリファレンスとして 570 nm の吸光度を測定し、HepG2 細胞の生存率を確認した。細胞生存率が 50% になる値を 50%細胞障害率 (IC₅₀) として算出し、以下の実験は IC₅₀ 以下の濃度の T3 と TOC を用いて行った。

(2) LDL 受容体の発現レベルに及ぼす T3 と TOC の影響

HepG2 細胞を 37 °C で 24 時間前培養し、

その後培地を除き、種々の濃度の T3 あるいは TOC を含む培養液に換えて 37 °C で 24 時間培養した。RNeasy plus Mini Kit (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen 社) を用いて、逆転写による cDNA の合成を行った。この cDNA を用いて LDL 受容体の mRNA 発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で調べた。

(3) LDL 受容体の機能に及ぼす T3 と TOC の影響

HepG2 細胞を 37 °C で 24 時間前培養し、その後培地を除き、種々の濃度の T3 あるいは TOC を含む培養液に換えて 37 °C で 22 時間培養した。蛍光物質 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) で標識した LDL (DiI-LDL) を含む培養液に交換して培養し、細胞表面に結合した DiI-LDL の蛍光強度をフローサイトメトリー法で調べた。また、このときの DiI-LDL の取り込みの様子を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(4) HepG2 の T3 と TOC の取り込み量の確認

HepG2 細胞を 37 °C で 24 時間前培養し、その後培地を除き、種々の濃度の T3 あるいは TOC を含む培養液で培養した。HepG2 を回収し、プローブソニケーターで細胞を破碎し、ヘキサン-酢酸エチル混液により T3 および TOC を抽出した。HepG2 細胞内の T3 および TOC 濃度を蛍光検出 - 高速液体クロマトグラフィー法 (検出: 励起波長 298 nm、蛍光波長 325 nm、カラム: Inertsil SIL-100A、5 μ m、4.6 \times 250 mm (GL Science 社) 移動相: n-ヘキサン:1,4-ジオキサン:イソプロパノール =100:2:0.2、流速: 1 ml/min) で測定した。

4. 研究成果

本研究では、アテローム性動脈硬化の危険因子の一つである血中の LDL 量を調節す

る LDL 受容体の機能に着目し、食品由来の機能性分子である T3 による LDL 受容体発現調節作用に関する研究を行った。

まず、HepG2 細胞の生存率に与える各種 T3 および TOC の影響を調べた。HepG2 細胞を各濃度の T3 および TOC 存在下で培養し、MTT アッセイを行った。各種 T3 と TOC 存在下で培養した細胞の生存率は、T3 を添加した細胞では濃度依存的に細胞生存率が減少し、各種 T3 の IC₅₀ は α -T3 は 30 μ M、 β -T3 は 13 μ M、 γ -T3 は 18 μ M、 δ -T3 は 12 μ M であった。TOC を添加した細胞では濃度依存的な細胞生存率への影響は認められなかった。

各種 T3 および TOC が LDL 受容体の発現レベルに影響を与えるかどうかを検討した。HepG2 細胞の生存率に影響を及ぼさない濃度の T3 あるいは TOC 存在下で培養後、回収した total RNA から合成した cDNA をリアルタイム RT-PCR で分析した。 β -actin の発現レベルで標準化した LDL 受容体の mRNA 発現レベルは、 γ -T3 と δ -T3 を添加した細胞では、無添加の細胞と比べて、いずれも 1.8 倍に有意に増加した。

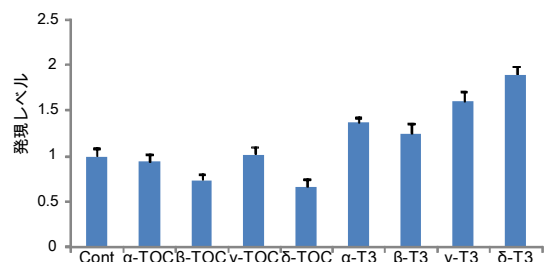


図2 各種 T3 および TOC による LDL 受容体発現レベル

T3 による LDL 受容体の発現量の上昇が LDL 受容体タンパク質としての機能の上昇を伴っているかを確認するために、T3 および TOC で処理した HepG2 細胞の LDL 受容体を介した LDL 取り込み能への影響を、DiI-LDL を用いて共焦点レーザー顕微鏡で検討した。 γ -T3 および δ -T3 存在下で培養した細胞では、DiI-LDL の取り込みを確認できた。次に、T3 および TOC による HepG2 細胞の LDL 取り込み能の影響を DiI-LDL を用いてフローサイトメトリー法で検討した。 γ -TOC 存在下で培養した細胞の DiI-LDL 取り込み量は、無処理の

細胞とほぼ同程度であった。一方、 γ -T3 存在下で培養した細胞の DiI-LDL 取り込み量は無添加の細胞と比べて 1.6 倍増加した。

HepG2 細胞内への TOC あるいは T3 の取り込みの違いが T3 の LDL 受容体発現上昇作用に影響しているのではないかと考え、細胞内の TOC および T3 濃度を測定した。LDL 受容体発現上昇作用が認められなかった β -T3 の細胞内濃度は、LDL 受容体発現上昇作用が認められた γ -T3、 δ -T3 より高値であった。また、TOC に比べて T3 の方が細胞内濃度が高く、細胞内へ取り込まれやすいことが示唆された。T3 および TOC の細胞内濃度が同程度かそれ以上であっても、上昇作用が認められない場合もあり、構造的特異性の違いが大きく影響していると考えられる。

今後は、LDL 受容体の発現を制御する分子に対する T3 の影響を検討していくことで、T3 による LDL 受容体発現上昇のメカニズムが明らかになると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

T. Miyazawa, A. Shibata, P. Sookwong, Y. Kawakami, T. Eitsuka, A. Asai, S. Oikawa, and K. Nakagawa「Anti-angiogenic and anti-cancer potential of unsaturated vitamin E, tocotrienol」
Journal of Nutritional Biochemistry, 2009 Feb;20(2):79-86. 査読あり

[学会発表](計2件)

細川朋子、吉岡晶子、川上祐生、吉田英生、羽田尚彦、高橋吉孝「グアバ葉抽出物による白血球型 12-リボキシゲナーゼの阻害」
(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年12月12日)

高島理恵、白川仁、大崎雄介、佐藤祥子、大橋和、川上祐生、仲川清隆、宮澤陽夫、駒井三千夫「トコトリエノール投与による

肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現変化」(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11日)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 祐生 (KAWAKAMI YUKI)
岡山県立大学・保健福祉学部・助教
研究者番号：30453202

(2)研究分担者

(3)連携研究者