

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11775

研究課題名(和文) 非必須脂肪酸システインによる動脈硬化進展メカニズムの解明及び再生血管に与える影響

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of atherosclerosis development by the nonessential fatty acid cysteine and its effect on regenerating blood vessels

研究代表者

加藤 洋一 (Kato, Youichi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00231259

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)：近年、高濃度のシステインが、膵細胞のインスリン分泌を抑制させるという *in vitro* のデータが報告され、過剰なシステイン摂取が糖尿病を悪化させる可能性が示唆されている(Nakatsu et al., 2015)。しかしながら、システインによる直接の動脈硬化促進に関する報告は少ない。2個のシステインが酸化されることによってシスチンが生成されるが、本研究において我々は高濃度のシスチンが、スカベンジャー受容体の一つであるMarcoの発現増加を通じて、マクロファージの酸化LDLの取込みを促進する可能性を示した。システインの過剰摂取は、糖尿病の悪化のみならず動脈硬化を直接的に促進させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非必須アミノ酸の一つであるシステインは、メラニン色素の合成を抑制する作用、肝臓の解毒を高める作用などを有するため、色素沈着や二日酔いの改善などを目的とするサプリメントとして広く利用されている。近年、高濃度のシステインが、膵細胞のインスリン分泌を抑制させるという *in vitro* のデータが報告され、糖尿病を悪化させる可能性が示唆された。今回我々は、システインの代謝物であるシスチンが、その高濃度下においてマクロファージの酸化LDLの取込みを促進して動脈硬化を進展させる可能性を示した。過剰なシステイン摂取が糖尿病増悪のみならず、動脈硬化を直接的に促進させる可能性があり、過剰摂取を控える必要がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, *in vitro* data have been reported that high concentrations of cysteine inhibit insulin secretion by pancreatic beta cells, suggesting that excessive cysteine intake may exacerbate diabetes (Nakatsu et al., 2015). However, there are few reports on direct atherosclerosis promotion by cysteine; oxidation of two cysteines produces cystine, and in the present study we show that high concentrations of cystine may promote macrophage oxidation and LDL uptake through increased expression of Marco, one of the scavenger receptors. LDL uptake by macrophages through increased expression of Marco, one of the scavenger receptors. Excessive cysteine intake may directly promote atherosclerosis as well as exacerbate diabetes.

研究分野：動脈硬化発生のメカニズム

キーワード：マクロファージ シスチン システイン 酸化LDL スカベンジャー受容体 泡沫細胞 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) McCully が 1969 年に先天性代謝異常症の 1 つで血漿中ホモシステイン濃度が著しく高値であるホモシステイン尿症患者において若年期から動脈硬化性、血栓性病変が発症することを報告 (McCully, Am J Pathol 1969) して以来、血漿ホモシステイン濃度の上昇は心血管疾患の危険因子として確立されている。ホモシステインとシステインは CH₂ 基数が 1 つ違うだけで、物理化学的性質もよく似ているにも拘らず、血漿システイン濃度の上昇と心血管疾患の関連性についての報告は少なかった。

(2) 非必須アミノ酸の一つであるシステインは、体内で合成できるため体外から摂取する必要はないが、メラニン色素の合成を抑制する作用、肝臓の解毒を高める作用などを有するため、色素沈着や二日酔いの改善などを目的とするサプリメントや医薬品として広く服用されている。

(3) 近年、高濃度のシステインが、膵細胞のインスリン分泌を抑制させるという *in vitro* のデータが報告され、過剰なシステイン摂取が糖尿病を悪化させる可能性が示唆されている (Nakatsu et al. 2015)。このように、システインの無計画な摂取は健康に悪影響を及ぼす可能性があるにも拘らず、世界保健機関 (WHO) はシステインの推奨摂取量を示すのみで (WHO technical report series; No. 935) 「摂取量の上限についての具体的なエビデンス」はほとんどなく、栄養学および医学の観点から解明すべき学術的「問い」の一つとなっていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では前述の問いを基に「システインとシスチンの過剰摂取が動脈硬化を悪化させる一因である可能性及びそのメカニズム」並びに「動脈硬化や糖尿病を増悪させるなどの副作用の出にくいシステイン摂取量の上限」を明らかにすることを主な目的とした。これが達成されることにより、

システインとシスチンの過剰摂取が動脈硬化の増悪に寄与することを立証

動脈硬化の進展に対するシステインとシスチンの寄与メカニズムを解明

副作用 (動脈硬化や糖尿病などの悪化) の出にくいシステインの摂取量を提示

という 3 つの世界初の成果につながることを期待された。

(2) この成果は、システインを含有するサプリメントの安全な使用のための指針づくりのためのエビデンスとして貢献し、適正なセルフメディケーションの推進につながることを予想される。厚生労働省の平成 28 年「国民健康・栄養調査」によると、日本人の約 5 人に 1 人が糖尿病患者または予備軍である。また、同省の平成 27 年「人口動態統計」によると、日本人のおよそ 1/4 は、動脈硬化を原因とする心疾患や脳血管疾患で亡くなっている。適正なセルフメディケーションによる疾患予防は、「我が国の財政を圧迫している医療費」の削減、さらには「国民の健康寿命が延伸する社会」の実現に資するものと考えられた。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、次の 3 つの目標を設定し、本研究期間内に (1) ~ (3) を実施した。なお、達成見込みのタイミングは各々令和元年度末、2 年度末および 3 年度末であった。

(1) 動脈硬化の発症過程におけるシステインの作用を *in vitro* で解明

(2) マウス (*in vivo*) にてシステインの摂取量と副作用の関係をモニタリング

(3) 間葉系幹細胞から分化誘導した平滑筋細胞により作製した再生血管の変性防止・耐久化

(1) 動脈硬化の発症過程 (図 1) には、

(A) 血管内皮細胞が障害される、

(B) 血液中の LDL コレステロールが内膜に入り込み酸化を受ける (酸化 LDL の産生)、

(C) マクロファージが内膜中の酸化 LDL を貪食しコレステロールを貯めこむことで血管を肥厚させるといった複数の過程が存在する (図 1)。一方、

(D) HDL コレステロールはマクロファージ中の

コレステロールを引き抜いて肝臓へ輸送することで抗動脈硬化作用を示す (図 1- D)。

そこで、システインが (A) - (D) のそれぞれの過程に影響を及ぼすかどうかを *in vitro* にて調べ、同時にシステインの代謝産物であるシスチンおよびメチオニンの影響も検証した (図 2)。

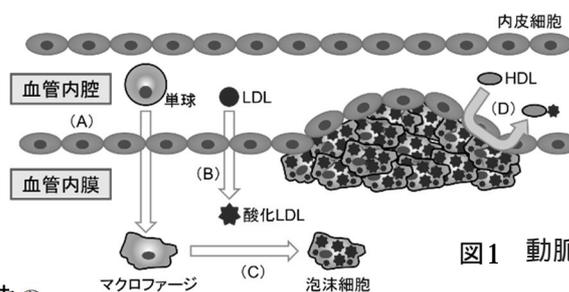


図 1 動脈硬化の発症過程

メチオニンは体内で十分な量を合成できず、体外から摂取しなければならない必須アミノ酸の一つであるが、代謝され、システインに変換される(図2)。このように、システイン及びその代謝前物質や代謝物質の作用を *in vitro* にて

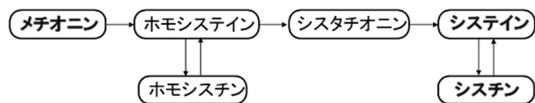


図2 システインの代謝経路

正確に把握することにより、*in vivo*での役割を高精度に推定できる。具体的には、血管内皮細胞にシステイン等を添加し、死細胞染色の蛍光色素であるヨウ化プロピジウム (PI)で染色される細胞の割合をフローサイトメトリーにて測定することで、細胞障害の程度を定量する。LDLの酸化は、ELISAを用いて酸化LDLを定量することで検証する。マクロファージに対して蛍光標識された酸化LDLコレステロールとシステイン等を添加した後、マクロファージ内の蛍光強度の増大をフローサイトメトリーで測定することにより、酸化LDLの取り込みを評価する。蛍光標識された酸化LDLを取り込ませたマクロファージに対してHDLコレステロールとシステイン等を添加した後、マクロファージ内の蛍光強度の減少をフローサイトメトリーにて測定することで、コレステロールの引き抜きを評価する。以上の実験では、蛍光色素とフローサイトメトリーの使用により、短時間で多くの検体を高精度で測定できる。

(2)システイン、シスチン、またはメチオニンを加えた飲料水を、マウスに24週間自由飲水させる。各アミノ酸の濃度は、(1)*in vitro*の結果、およびマウスの摂水量がおよそ5 mL/日であることを踏まえながら、複数の濃度で検証する。

摂取開始前と、開始後は4週間ごとに経時的に、システイン、シスチン、メチオニンの血中濃度を液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)で定量するとともに、糖尿病と動脈硬化の状態を把握する。具体的には、糖尿病をモニターするために、血中インスリン濃度、血糖、尿糖を測定する。また、動脈硬化の状態を把握するために、非侵襲であり経時的に測定できるメリットのあるCT造影装置および超音波診断装置を用いて動脈硬化のイメージングを行う。ただし、マウスは小さな個体であり、これらイメージングの測定精度が低い問題点があるため、摂取24週間後、単離した大動脈を親油性色素であるオイルレッドOで染色し、動脈硬化部位の割合も計測することで、この問題点を補完し、動脈硬化の状態を把握する。

被験動物としてwild typeマウス、動脈硬化モデルマウス、糖尿病マウスの他、高血圧マウス、肥満マウスなど、様々なマウスを用いる。これにより、様々な背景におけるシステイン等の影響を調べることができ、多様なバックグラウンドを持つ多くの人々に対応できるエビデンスの提示につながる基盤研究になると考える。

以上の実施により、「システインとシスチンの過剰摂取が動脈硬化を悪化させる一因である可能性及びそのメカニズム」並びに「動脈硬化や糖尿病の増悪などの副作用の出にくいシステイン摂取量の上限」をマウスにて明らかにする。

(3)その上で、我々の確立した動脈圧に耐え得る再生血管の使用が特に透析時のアクセス血管として想定されていることに鑑み、システインの再生血管変性に与える影響の程度について精査を行い、その耐久化につなげることを試みた。

4. 研究成果

(1)2個のシステインが酸化されることによってシスチンが生成されるが、申請者らは高濃度のシスチンがマクロファージの酸化LDLの取り込みを促進するデータを *in vitro*にて得た(図3)。

マクロファージによる酸化LDLコレステロールの取り込みは、マクロファージの泡沫化による血管壁への脂肪蓄積を介して、動脈硬化の進展・血管内腔の狭窄につながる過程であることから、シスチンおよびその代謝前物質であるシステインは動脈硬化を増悪させる可能性が示唆された。体内のシステイン濃度は健常人ではおよそ300 μMであり、透析患者では500~900 μMであることから(Nakanishi et al. 2003)、申請者らが *in vitro*の実験で用いている1 mMという濃度は、サプリメントの過剰摂取により十分に到達し得る濃度である。

動脈硬化の発症過程には3(1)図1に示したように、(A)血管内皮細胞障害、(B)血液中のLDLコレステロールが内膜に入り込み酸化(酸化LDLの産生)、(C)マクロファージが内膜中の酸化LDLを貪食し、コレステロールを貯蔵、新生内膜増殖といった複数の過程が存在する。一方、(D)HDLコレステロールはマクロファージ中のコレステロールを引き抜いて肝臓へ輸送することで抗動脈硬化作用を示す。そこでシステインがどの過程に影響を及ぼすかを検討するため、マクロファージの活性化モデルを確立した。

動脈硬化性プラーク内にある炎症性細胞ではマクロファージの数がまず増加する。マクロファージを活性化させる因子としてグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成する成分であるリポ多糖(LPS)が知られている。LPSはマクロファージ上のスカベンジャー受容体の発現を促進して、変性LDLの取り込みを増加させることが知られているが、その情報伝達経路に関しては不明な点が多かった。そこで我々は、LPSが主にJAK-STAT経路を介してCD36とCD209の2つのスカベンジャー受容体の発現増加をもたらす、変性LDLの取り込みを増加させることによって新生内膜を増殖、

動脈硬化を進展させる可能性を明らかにした (*Eur J Pharmacol*. 2020 Mar15;871:172940)。

(2)(1)の計画に関して、スカベンジャー受容体は酸化 LDL などの変性リポタンパク質を認識する受容体である。マクロファージの泡沫細胞化に主要な役割を果たすスカベンジャー受容体である CD36 と CD204 (SR-A) が LPS によって主に JAK-STAT 経路を介して発現を増加させることが判明したが、システインおよびシスチンはこれらスカベンジャー受容体の発現量自体には影響を及ぼさなかった (*J Pharmacol Sci* 151: 46-53, 2023)。次に、マクロファージの泡沫細胞化に関わる別のスカベンジャー受容体を探索したところ、一つの候補として Marco が浮上してきた。現在、Marco の発現量および機能に対するシステインおよびシスチンの作用を検討している (投稿中)。

一方(3)の計画に関して、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が猛威を振るう中、緊急事態宣言による研究中断が実験動物に与える不利益を考慮し、長期的な計画が必要な「in vivo」の実験を延期することとした。まん延防止等重点措置等期間の終了した令和4年6月下旬より in vivo 実験を再開し、継続中である。

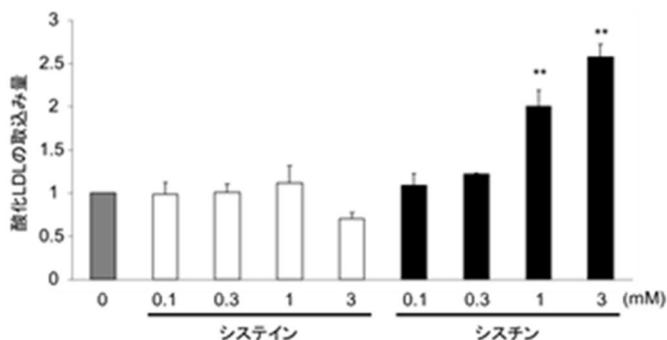


図3 マクロファージの酸化 LDL 取込みをシスチンは促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto R, Kakigi R, Miyamoto Y, Nakamura K, Itoh S, Daida H, Okada T, Katoh Y.	4. 巻 871
2. 論文標題 JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol. 2020 Mar15;871:172940.	6. 最初と最後の頁 871-880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172940.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Ryota, Miyamoto Yuki, Itoh Seigo, Daida Hiroyuki, Okada Takao, Katoh Youichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) suppresses high Ca ²⁺ -enhanced adipogenesis in bone marrow stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 741 ~ 748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-019-00690-9	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 Hashimoto Ryota, Kakigi Ryo, Miyamoto Yuki, Nakamura Kyoko, Itoh Seigo, Daida Hiroyuki, Okada Takao, Katoh Youichi	4. 巻 871
2. 論文標題 JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172940 ~ 172940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Ryota, Koide Hiroshi, Katoh Youichi	4. 巻 151
2. 論文標題 Long-term glucocorticoid treatment increases CD204 expression by activating the MAPK pathway and enhances modified LDL uptake in murine macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.11.003	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hashimoto R, Kakigi R, Miyamoto Y, Nakamura K, Itoh S, Daida H, Okada T, Katoh Y.
2. 発表標題 Glucocorticoid decreases uptake of Ac-LDL through suppression of JAK-STAT pathway in macrophages.
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto Ryota, Miyamoto Yuki, Itoh Seigo, Okada Takao, Katoh Youichi
2. 発表標題 JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	橋本 良太 (Hashimoto Ryota) (60433786)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
---------	---------