

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20228002

研究課題名（和文） 生体過酸化脂質の生成と制御に関する食品科学的研究

研究課題名（英文） Studies on lipid peroxidation in human disease: its modulation from the view point of food chemistry

研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20157639

研究成果の概要（和文）：

生体の脂質は酸化されると過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）を生じる。これが細胞や臓器機能の低下、動脈硬化、認知症の要因になることを、化学発光分析、質量分析、培養細胞試験、動物実験、ヒト血液分析で証明した。食品からの、ビタミンE、ポリフェノール、カロテノイドの摂取は、これらの脂質過酸化を抑制し、老化性の疾病予防に有効なことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Oxidation of lipids generates lipid hydroperoxide. Through the quantitative analysis of clinical sample with CL-HPLC and LC-MS/MS, and using the functional assessment with cell culture study and animal study, we have proved that the hydroperoxidation of biological lipid results functional deterioration of cells and tissues. Our results also indicated the lipid hydroperoxide of body causes the related disorders like arteriosclerosis and dementia. Antioxidative food components; vitamin E, polyphenol, carotenoid, suppress lipid oxidation in vivo and are useful as antisenescence-nutrient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	29,000,000	8,700,000	37,700,000
2009年度	47,200,000	14,160,000	61,360,000
2010年度	27,400,000	8,220,000	35,620,000
2011年度	26,100,000	7,830,000	33,930,000
2012年度	26,200,000	7,860,000	34,060,000
総計	155,900,000	46,770,000	202,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：過酸化脂質、脂質ヒドロペルオキシド、動脈硬化症、認知症、食品機能

1. 研究開始当初の背景

過酸化脂質は食品油脂の酸化劣化現象として従来研究されてきていたが、申請者は、生体内とくに血管や生体膜脂質の過酸化が、細胞老化や生活習慣病あるいは老化性疾患に深く関与すると考え、食品領域の過酸化脂質研究を生体系に発展させようと考え研究を進めてきていた。

2. 研究の目的

生体に存在する過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）をCL-HPLC法で総量を、LC-MS/MS法で分子種レベルでの定量を行い、疾病（動脈硬化症や認知症）との量的関係と疾病の要因としての過酸化脂質の関与分子機構を解明し、さらに食品成分による生体過酸化脂質の生成制御と老化性疾病の予防について、基

盤的な理解を得ることが目的である。

3. 研究の方法

高純度過酸化脂質標品の合成法を確立し、LC-MS/MS法により分子種レベルでの高感度解析法を開発した。臨床標本、動物組織、培養細胞の過酸化脂質を、CL-HPLC法とLC-MS/MS法で定量し、脂質ヒドロペルオキシドの生成と細胞障害機構を培養細胞試験と遺伝子発現解析で明らかにし、食品成分による脂質過酸化抑制能をヒト試験と動物試験で解析した。

4. 研究成果

(1) ビニルエーテルによる高純度過酸化脂質標品の調製技術の確立

2-methoxypropene をヒドロペルオキシド基に付加して保護し、ヒドロペルオキシド型過酸化脂質 (LOOH、脂質ヒドロペルオキシド) を高純度で得る方法を開発した(図 1)。これによりホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) (純度 99.8%) の使用を可能にした。グリセリン脂質、コレステロール、コレステロールエステル、トリアシルグリセロール、脂肪酸のヒドロペルオキシド標品を調製出来るようにした。これらはいずれも世界初である。

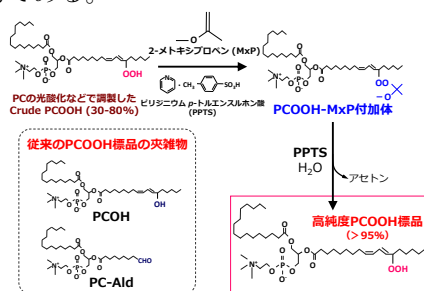


図 1 過酸化脂質標品調製例

国内外の脂質過酸化研究に携わる研究者との情報交換と研究ネットワークの構築のため、国際会議 ICLH2009 を開催し、高純度脂質ヒドロペルオキシド標品を配布できるようにした。さらに、PCOOH 原料にして、還元物 (脂質ヒドロキッド) の高純度標品調製技術を確立し、標品配布の準備を整えた。この高純度過酸化脂質標品調製技術により、生体内の過酸化脂質のより正確な定量と、細胞実験による機能評価が可能になり、脂質ヒドロペルオキシド自体の生理作用の発見と、その分子機構の解明に寄与した。

(2) LC-MS/MS 法による過酸化脂質分子種の一斉定量法の開発

過酸化脂質 (脂質ヒドロペルオキシド) の個々の分子種を一斉網羅的に検出し定量できるように、LC-MS/MS 法の解析条件の最適化に成功した(図 2)。

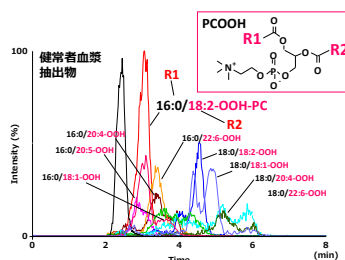


図 2 ヒト血漿 PCOOH 分子種の LC-MS/MS 分析

この条件をリニアイオントラップ型ハイブリッド質量分析装置 4000QTRAP MS/MS (Applied Biosystems) に導入して、Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードで脂質ヒドロペルオキシド分子種を構造解析し定量している。この過程で、脂質の MS/MS 分析で課題となるイオンサプレッション (検出感度低下の原因) を防ぐ技術を見出した。(図 3、4)

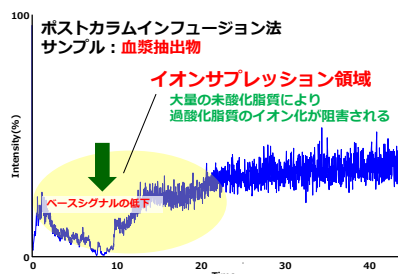


図 3 MS/MS 分析におけるイオンサプレッション

新規分析法のイオンサプレッションの確認

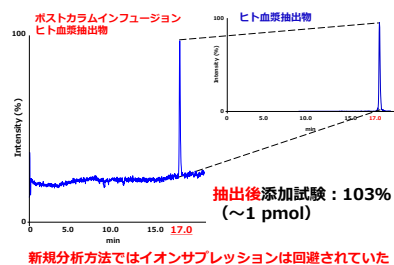


図 4 イオンサプレッションの回避

さらに、細胞、動物器官・臓器、ヒト血液・組織標本といった、生体サンプルからの過酸化脂質を抽出する回収率が抽出溶媒により依存することを明らかにし(図 5)、抽出方法を改良した。この結果、最少検出量 0.1pmol/ml の PCOOH の超高感度定量に世界で初めて成功した。

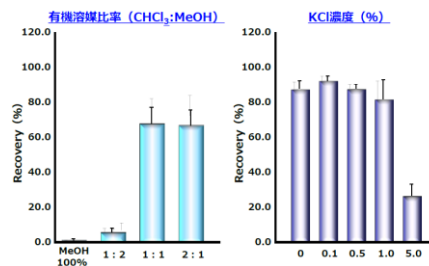


図 5 血漿 PCOOH の回収率は抽出溶媒に大きく依存する

本技術の応用により、糖尿病で生成する糖化リン脂質（アマドリ型ホスファチジルエタノールアミン、deoxy-D-fructosyl PE）とともに後期糖化産物であるカルボキシメチル PE とカルボキシエチル PE の LC-MS/MS 法による高感度・高選択性分析法を開発し、ヒト血中での糖化リン脂質存在を証明し、高血糖状態を把握できる一連の新マーカーを発見した（図 6）。

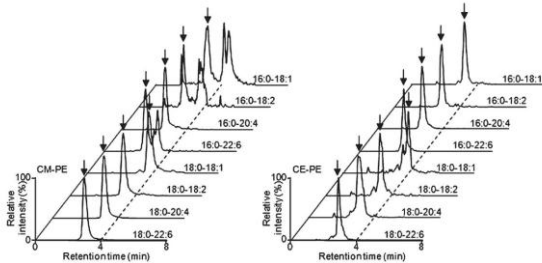


図 6 LC-MS/MS によるアマドリ-PE 分子種の同定

生活環境下の太陽光暴露でヒト皮脂が酸化され生ずる、スクアレンヒドロペルオキシド（SQOOH）についても、LC-MS/MS 法による定量法を開発し、ヒト皮膚から 6 種類のスクアレンが検出されることを明らかにし（図 7）、HaCaT ヒト角化細胞を用いた細胞実験で、SQOOH が皮膚老化と炎症に関わることを証明した。

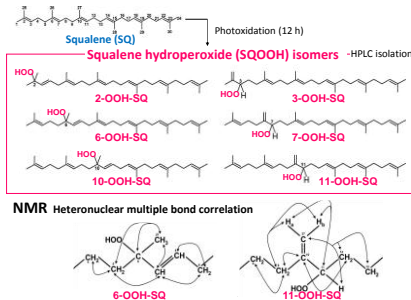
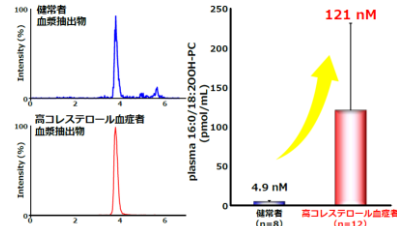


図 7 皮脂から検出されるスクアレンヒドロペルオキシド

(3) CL-HPLC 法および LC-MS/MS 法による臨床サンプルの過酸化脂質定量および機能性評価

LC-MS/MS 法によるヒト血漿、赤血球、皮脂などの過酸化脂質の分子種レベルの定量が可能になったことから、高脂血症（図 8）および糖尿病・動脈硬化症（図 9）患者の血漿過酸化脂質の測定を行い、これら患者において、リン脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）の顕著な蓄積を観察した。高脂血症患者における PCOOH の増加は、酸化 LDL の増加を意味し、これらの結果は、高脂血症からの動脈硬化症の進展に強く関わっていることを示している。



健康者の微量な 16:0/18:2OOH-PC を定量でき、高コレステロール血症者において高値になることを確認
図 8 高コレステロール血症者の 16:0/18:2OOH-PC 分析



糖尿病・動脈硬化症で高 PCOOH 値
図 9 冠動脈狭窄と血漿の高 PCOOH 値

上記結果を踏まえ、動脈硬化症発症への過酸化脂質の関与を証明するため、血管内皮細胞をもちいた試験を行い、PCOOH が単球の血管内皮 ICAM-1 への接着を引き起こし、動脈硬化発症の要因になる機構を解明した。すなわち PCOOH は、血管内皮細胞において VEGF 依存性の血管新生作用を強く亢進させ、動脈硬化の原因になる炎症を強く惹起する物質であることを発見した（図 10）。

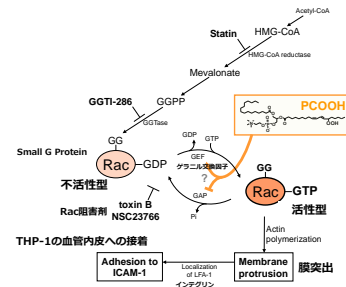


図 10 PCOOH による単球の血管内皮接着機構

(4) 食品成分による生体過酸化脂質の生成の抑制と老化性疾病预防の可能性

生体内の脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制できる食品成分として、緑茶カテキン、ポリフェノール類、スルフォラファン、ビタミン E 類（トコフェロールとトコトリエノール）、カロテノイドについて、ヒト試験、動物試験、培養細胞試験で明らかにした。これらはとくに高脂血症、糖尿病、動脈硬化などの血中過酸化脂質の増加の抑制に効果的であると考えられた。また、血管内皮における抗炎症作用も観察されたので、これら障害の進行予防に役立つと考えられた（図 11）。

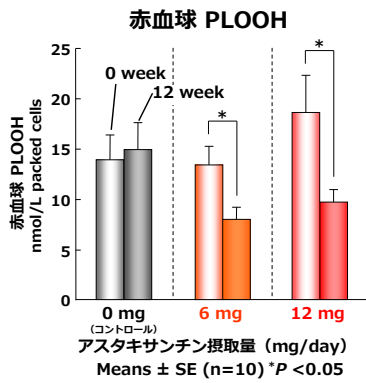


図 11 アスタキサンチン摂取による赤血球過酸化脂質低下

認知症に関しては、血中に特徴的に出現する老化赤血球（PLOOH 多含赤血球：酸化ヘモグロビンからの酸素分子の解離が阻害され神経細胞への酸素供給能が低下した状態の赤血球を意味する）の生成蓄積を予防できるキサントフィルの抗酸化機能とアミロイドβによる赤血球膜脂質の過酸化機構を明らかにした(図 12)。

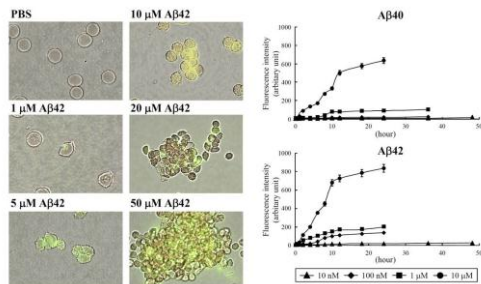


図 12 認知症に特徴的なアミロイドβによる赤血球膜脂質の過酸化と凝集

このように本研究は、ヒトの体内とくに生体膜脂質の過酸化が生活習慣病などに関与するとの仮説を基に、過酸化脂質の生成と高脂血症、糖尿病、認知症などの疾病との関係を化学的定量的に究明することを目的として、過酸化脂質標品の調製法の検討、CL-HPLC 法による過酸化脂質定量法の改良および、LC-MS/MS 法による高感度定量法開発、動脈硬化症、糖尿病、認知症における過酸化脂質の分析、皮脂スクアレン過酸化物（一重項酸素酸化産物）の生成の検証、そして、食品抗酸化成分（アスコルビン酸、トコフェロール、トコトリエノール、カロテノイド、キサントフィル、ポリフェノール類）による生体脂質過酸化の抑制効果を動物試験とヒト試験を実施し、上記のような成果を得ることができた。

日本を含む多くの先進諸国で、長寿と老化予防、疾病予防への食品の果たす役割の解明が社会的な大きな関心事のひとつになっている。本研究により、「生体の老化や疾病に生体膜リン脂質の過酸化が関与することをヒトについて実証し、この予防に役立つ食品お

よび食品成分を、最先端の機器分析と分子レベルの研究によって明らかにする」という目標は達成された。

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 48 件)

1. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Shimasaki, S., Nagai, R., Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis, *Amino Acids*, **42**: 1163-1170 (2012) (査読有り) doi: 10.1007/s00726-010-0772-3.
2. Kiko T., Nakagawa K., Tsuduki T., Suzuki T., Arai H., Miyazawa T. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.*, **28**: 593-600 (2012). (査読有り) doi: 10.3233/JAD-2011-111493
3. Eitsuka T., Nakagawa K., Ono Y., Tatewaki N., Nishida H., Kurata T., Shoji N., Miyazawa T. Amador-glycated phosphatidyl ethanolamine up-regulates telomerase activity in PANC-1 human pancreatic carcinoma cells. *FEBS Lett.*, **586**: 2542-2547 (2012) (査読有り) doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.027.
4. Kiko T., Nakagawa K., Satoh A., Tsuduki T., Furukawa K., Arai H., Miyazawa T. Amyloid β levels in human red blood cells. *PLoS One*, **7**: e49620 (2012) (査読有り) . doi: 10.1371/journal.pone.0049620.
5. Nakagawa K., Kiko T., Miyazawa T., Burdeos G.C., Kimura F., Satoh A., Miyazawa, T. Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *Brit. J. Nutr.*, **105**: 1563-1571 (2011). (査読有り) doi: 10.1017/S0007114510005398
6. Asai A. Okajima F., Nakajima Y., Nagao M., Nakagawa K., Miyazawa T., Oikawa S. Involvement of Rac GTPase activation in phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to ICAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**: 273-277 (2011). (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.032
7. Nakagawa, K., Kiko, T., Miyazawa Taiki, Sookwong, P., Tsuduki, T., Satoh, A., Miyazawa, T. Amyloid β-induced

- erythrocytic damage and its attenuation by carotenoids. *FEBS Lett.*, **585**: 1249-1254 (2011). (査読有り) doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.060
8. Nakagawa K., Shibata A., Saito T., Sookwong P., Kato S., Tsudoku T., Matsubara K., Miyazawa T. Phosphatidyl choline hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**: 1205-1211 (2011). (査読有り) doi:10.1016/j.bbagen.2011.08.018
 9. Shoji N., Nakagawa K., Asai A., Fujita I., Hashiura A., Nakajima Y., Oikawa S., Miyazawa T., LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxy-ethylated phosphatidylethanolamines in human erythrocytes and blood plasma. *J. Lipid Res.*, **51**, 2445-2453 (2010) (査読有り)
 10. Shibata A., Nakagawa K., Sookwong P., Tsudoku T., Asai A., Miyazawa T., α -Tocopherol attenuates the cytotoxic effect of δ -tocotrienol in human colorectal adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 214-219 (2010) (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.087.
 11. Shibata A., Nakagawa K., Yamanoi H., Tsudoku T., Sookwong P., Higuchi O., Kimura F., Miyazawa T., Sulforaphane suppresses UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice. *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 702-709 (2010) (査読有り) doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.007.
 12. Nakagawa K., Shibata A., Maruko T., Sookwong P., Tsuzuki T., Nakayama K., Nishida H., Miyazawa T., γ -Tocotrienol reduces squalene hydroperoxide-induced inflammatory responses in HaCat keratinocytes. *Lipids*, **45**, 833-841 (2010) (査読有り) doi: 10.1007/s11745-010-3458-4.
 13. Miyazawa T., Shibata A., Sookwong P., Kawakami Y., Eitsuka T., Asai A., Oikawa S., Nakagawa K., Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 79-86 (2009) (査読有り) doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.09.003.
 14. Asai A., Okajima F., Nakagawa K., Ibusuki D., Tanimura K., Nakajima Y., Nagao M., Sudo M., Harada T., Miyazawa T., Oikawa S., Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.*, **50**, 957-965 (2009) (査読有り) doi: 10.1194/jlr.M800582-JLR200.
 15. Nakagawa K., Kiko T., Hatade K., Sookwong P., Arai H., Miyazawa T., Antioxidant effect of lutein towards phospholipid hydroperoxidation in human erythrocytes. *Brit. J. Nutr.*, **102**, 1280-1284 (2009) (査読有り) doi: 10.1017/S0007114509990316.
 16. Ibusuki D., Nakagawa K., Asai A., Oikawa S., Masuda Y., Suzuki T., Miyazawa T., Preparation of pure lipid hydroperoxides. *J. Lipid Res.*, **49**, 2668-2677 (2008) (査読有り) doi: 10.1194/jlr.D800034-JLR200.
 17. Shibata A., Nakagawa K., Sookwong P., Tsuzuki T., Tomita S., Shirakawa H., Komai M., Miyazawa T., Tocotrienol inhibits secretion of angiogenic factors from human colorectal adenocarcinoma cells via suppressing hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Nutr.*, **138**, 2136-2142 (2008) (査読有り) doi: 10.3945/jn.108.093237
 18. Nakagawa K., Kiko T., Hatade K., Asai A., Kimura F., Sookwong P., Tsuzuki T., Arai H., Miyazawa T., Development of a high-performance liquid chromatography-based assay for carotenoids in human red blood cells: Application to clinical studies. *Anal. Biochem.*, **381**, 129-134 (2008) (査読有り) doi: 10.1016/j.ab.2008.06.038.
 19. Shibata A., Nakagawa K., Sookwong P., Tsuzuki T., Oikawa S., Miyazawa T., Tumor anti-angiogenic effect and mechanism of action of δ -tocotrienol. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 330-339 (2008) (査読有り) doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.017.
 20. Miyazawa T., Ibusuki D., Yamashita S., Nakagawa K., Analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in the plasma of healthy subjects and diabetic patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1126**, 291-294 (2008) (査読有り) doi: 10.1196/annals.1433.033.

[学会発表] (計 169 件)

1. Teruo Miyazawa, Amadori-glycated,

- carboxy-methylated and carboxyethylated phosphatidyl-ethanol-amines in human erythrocytes and plasma. 11th International Symposium on the Maillard Reaction (フランス ナンシー, 2012, 9/16-20)
2. 仲川清隆, 加藤俊治, 宮澤陽夫, 血中過酸化リン脂質のMS/MS分析における注意点と解決法. 第12回基準油脂分析試験法セミナー (東京, 2012, 11/26-27)
 3. Taiki Miyazawa, Takehiro Kiko, Kiyotaka Nakagawa, Hiroyuki Arai, Teruo Miyazawa, Lutein and astaxanthin prevent lipid oxidation in erythrocyte membrane as being characteristic alzheimer disease. New Developments in Carotenoids Research (アメリカ合衆国 ポストン, 2011, 3/11-12)
 4. 宮澤陽夫, 過酸化脂質研究からみた食品機能成分. 日本食品科学工学会第58回大会 (仙台, 2011, 9/9-11)
 5. 仲川清隆, 生体過酸化脂質の生成と食品成分による制御. 第64回日本栄養・食糧学会大会 (徳島, 2010, 5/21-23)
 6. 仲川清隆, 生活環境下の太陽光暴露でヒト皮膚に生じるスクアレン過酸化物による皮膚炎症惹起の分子機構. 日本油化学会第49回年会 (函館, 2010, 9/15-17)
 7. Teruo Miyazawa, Overview of lipid peroxidation in food and biological systems. The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai 2009 (Sendai, 2009, 11/4-6)
 8. Teruo Miyazawa, Ion-trap tandem mass spectrometric analyses of blood plasma phosphatidylcholine hydroperoxides and skin squalene hydroperoxides. A Biochemical Society Focused Meeting (Exeter, UK, 2008, 4/2-3)
 9. 宮澤陽夫, 指宿大悟, 山下慎司, 仲川清隆, 脂質ハイドロパーオキシドの網羅的分子種解析. 第50回日本脂質生化学会 (徳島, 2008, 6/5-6)
 10. 宮澤陽夫, 仲川清隆, 指宿大悟, 浅井明, 及川眞一, LC-MS/MSによる脂質ヒドロペルオキシドの網羅的解析と定量. 第33回日本医用マスペクトル学会年会. (東京, 2008, 9/25-26)

[図書] (計8件)

1. Taiki Miyazawa, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa. Chapter 12 Liquid

- Chromatography-based Assay for Carotenoids in Human Blood. Food and Nutritional Components in Focus No.1. Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects, Edited by Victor R. Preedy. The Royal Society of Chemistry, 184-203 (2012)
2. 宮澤陽夫, 生体内における抗酸化作用. 食品機能素材 IV, 太田明一監修, シーエムシー出版, 25-30 (2010)
 3. 宮澤陽夫, 脂質グリケーション産物のLC-UV/MSとLC-MS/MS, 糖化による疾患と抗糖化食品・素材, シーエムシー出版 ISBN978-4-7813-0294-2, 105-113 (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubun/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20157639

(2) 研究分担者

仲川 清隆 (NAKAGAWA KIYOTAKA)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80361145

都築 毅 (TSUDUKI TSUYOSHI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00404848

(3) 連携研究者

及川 眞一 (OIKAWA SHINICHI)

研究者番号：30142946

日本医科大学・医学部・教授

岡 芳知 (OKA YOSHITOMO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70175256

荒井 啓行 (ARAI HIROYUKI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30261613

下瀬川 徹 (SHIMOSEGAWA TOORU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90226275

木村ふみ子 (KIMURA FUMIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50321980