

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05931

研究課題名(和文)小腸からのコレステロール排出促進による粥状プラーク形成の抑制

研究課題名(英文)Prevention of atherosclerosis by a low dose of plant sterols in mice

研究代表者

中野 貴成 (Nakano, Takanari)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20406474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血中コレステロール濃度を低下させずとも小腸コレステロール排出の促進によって動脈硬化モデルである粥状プラークの形成が抑制されるか否かを検証した。植物ステロールを動脈硬化モデルマウスに与え、粥状プラーク形成と動脈弓コレステロール蓄積を定量評価した。また腸管からのコレステロール排出は糞便中のコレステロールならびにその代謝産物の総量を、ガスクロマトグラフィーを用いて定量した。その結果、植物ステロール0.125%混餌では血中のコレステロール濃度を低下させずに動脈硬化を半減させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ステロールは小腸からのコレステロールの吸収を阻害することで動脈硬化を抑制していると考えられてきた。しかし、動脈硬化モデルマウスに吸収阻害を起こさない程度の低用量の植物ステロールを与えても、明かな動脈硬化抑制効果を示した。このことから植物ステロールには前述の機序では説明されない薬理効果があることを本研究は示した。この知見は少量の植物ステロールでも十分な効果が期待出来るという当初の期待に合致し、さらに本成分を予防医学的観点から活用する基盤を提供する成果を得た。この成果はその機序を解明し、機能性食品としてその安全性が信頼されるものになるような研究を促進させる起点となりえる。

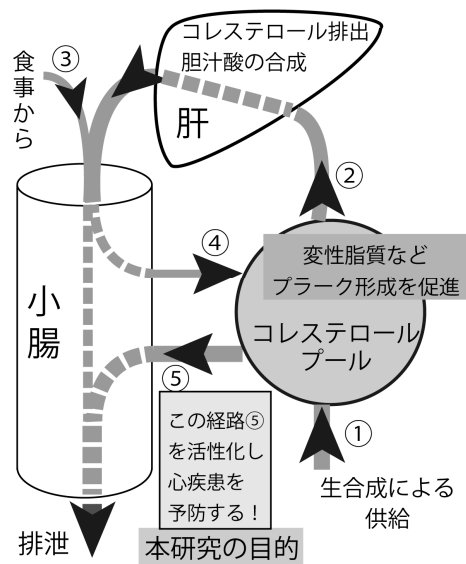
研究成果の概要(英文)：In this study, we tested whether the development of atherosclerotic plaque could be suppressed by promoting small intestinal cholesterol efflux even without lowering blood cholesterol concentrations. Plant sterols were fed to APOE-deficient mice, a model of atherosclerosis, and atherosclerotic plaque formation and arterial arch cholesterol accumulation were quantitatively evaluated. The total amount of cholesterol and its metabolites in the feces was determined by gas chromatography. The results showed that feeding 0.125% phytosterol in the diet reduced arterial cholesterol levels by half without decreasing blood cholesterol levels. Since there was no change in total cholesterol in the feces at this time, this effect was considered to be independent of cholesterol efflux from the small intestine, suggesting a novel mechanism for the favorable effect.

研究分野：脂質代謝

キーワード：植物ステロール 動脈硬化 APOE欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

コレステロール値を下げるためスタチンによる生合成経路 (右図) の障害がある。ただ、進行した動脈硬化に対するその治療効果には限界があり、心疾患リスクを低減する他の手段が模索されている。HDL によるコレステロール逆輸送の促進経路、食事経路の制限、小腸からの吸収経路の障害などのコレステロール低下作用の効果は弱い。一方で高コレステロール血症に伴う変性した脂質などが動脈硬化をなす粥状プラーク形成に関わることが知られている。これら因子を低く抑えることは、プラーク形成の抑制につながる。申請者らは経路の排出の機序を世界で初めて解明した (Nakano et al. Nutrients 2019, REVIEW)。簡単に述べると、小腸はコレステロールの吸収と排出という逆方向の輸送が行われる場である。吸収は Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)、排出は ATP-binding cassette (ABC) G5/G8 のステロール輸送タンパク質による。コレステロールは微絨毛内からそれら分子に供給される。微絨毛がステロール種の競合の場であり、吸収の障害は逆に排出の増加となる。



種実類や植物油などに多く含まれる植物ステロールは、小腸におけるコレステロールの吸収を障害すると考えられてきたが、その主な作用が経路 (上図) の排出の促進によることがわかった (Nakano et al. Clin Biochem Nutr 2018)。すなわち植物ステロールは誰にでも簡単に摂取でき、いつでも始められる、動脈硬化にかかわる疾患のリスクを下げるのが可能な栄養成分として期待できる。植物ステロールによる血中コレステロール値の低下作用は弱いものの植物ステロールによる小腸からコレステロール排出は 1% 混餌でほぼ最大 (およそ 7 倍) に達する。しかし近年の疫学研究 (New England Journal of Medicine 2014) は、この促進効果が心疾患のリスクを半減しうる可能性を示し、その機序の解明と応用が望まれている。

2. 研究の目的

他の哺乳動物に比べ、ヒトは高いコレステロール値 (特に LDL 値) を示す。さらに高い持久力と活動性に比例して大きく発達した心臓の循環を、細い冠動脈に依存している。つまりヒトは生来的に動脈硬化のリスクを抱えた種といえる。たとえ血清脂質が正常であっても、動脈硬化は進行するため、その予防には積極的なアプローチが必要となる。本研究は、小腸からのコレステロール排出の促進と粥状プラーク形成の抑制効果との用量相関を、植物ステロールを用いて明らかにすることを目的とする。これまでの指標である血中コレステロール濃度によらない動脈硬化進展の抑制パラダイムを示すことで、若年期からの血管ケアを目指した新たな手段への注目が期待される。

3. 研究の方法

マウス

本研究では動脈硬化モデルマウスとして国内で見出された自然発症の APOE 欠損マウス B6.KOR-Apoesh1 を用いた。B6.KOR-Apoesh1 マウスは松島ら (1999) が見出した自然発症の ApoE 欠損マウスで、B6 系統に戻し交配されたものが販売されている。このマウスは LDL 高値で、7 ヶ月齢ですでに粥状プラークを大動脈部位に形成する (Matsushima et al. J Atheroscler Thromb 2001)。本系統を 7 週齢で入荷し、一週間の馴化後に実験に供試した。

植物ステロール混餌飼料

マウスモデルにおいて植物ステロール混餌 (1%, w/w) で小腸コレステロール排出促進はほぼ最大に達する (Brufau et al. 2011)。これを参考に混合量を 0%, 0.125%, 0.5%, 2.0% の 4 用量とし、それぞれの餌を作製した。8 週齢から生後 9 ヶ月まで摂餌させた。また NPC1L1 阻害薬エゼチミブ (0.00001%) を比較対照群とした。5 週ごとに尾採血を行い、コレステロール値を定量した。

小腸コレステロール排出の定量

小腸コレステロール排出はガスクロマトグラフィーをもちいて糞便に含まれる中性ステロールを定量した。

粥状プラーク形成の定量解析

評価の指標となる粥状プラーク形成量は 2 つの手法を用いた。マウスを灌流固定後に大動脈を摘出した。動脈弓はホモジナイズ後にコレステロールを定量した。また動脈弓以下の大動脈標本を Oil Red O で染色し、動脈硬化病巣を定量した。動脈硬化スコアとして全体の面積で割った百分率で示した。

血中コレステロール値の定量

血清または血漿中の総コレステロール値は EZScreen Total Cholesterol & Cholesteryl Ester Colorimetric Assay Kit(Abcam, Cat.no. K957-400) を用いた。

4. 研究成果

血中コレステロールの測定から植物ステロール摂取において 0.5%植物ステロール混餌より用量依存的に血中コレステロール値の低下を認めたと 0.5%では統計的有意差はなく ($p = 0.09$)、また 2%では試験数が少なく統計的パワーが足りなかったため有意差を認めなかった (図 1 左)。また腸管からのコレステロール排出も同じく 0.5%植物ステロール混餌より用量依存的に有意な増加を認めた (図 2)。一方、動脈硬化の指標である動脈弓のコレステロール含量は 0.125%植物ステロール混餌で半減していた。なお、Oil Red O 染色により病巣面積比では低下傾向を示したものの、統計的有意差には達しなかった ($p = 0.07$)。一方、陽性試験薬として用いたコレステロール吸収阻害薬エゼチミブ (10mg/kg 混餌) を摂取させた群では有意なコレステロール値の低下と顕著な動脈硬化抑制を示した。これらのことから植物ステロールは血中のコレステロール値の低下や腸管からのコレステロール排出増加に依存しない、新たな動脈硬化抑制能を有することが示された。

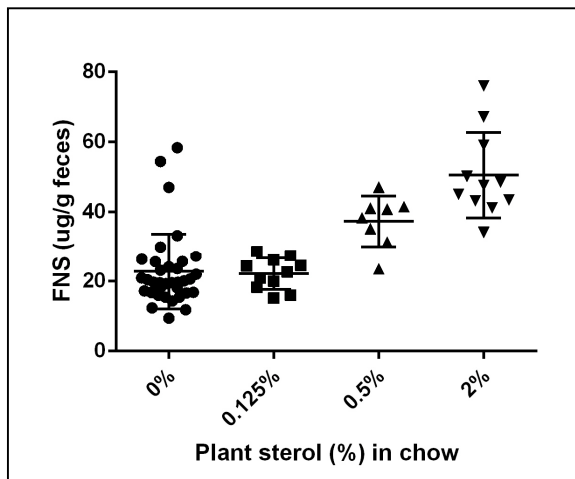
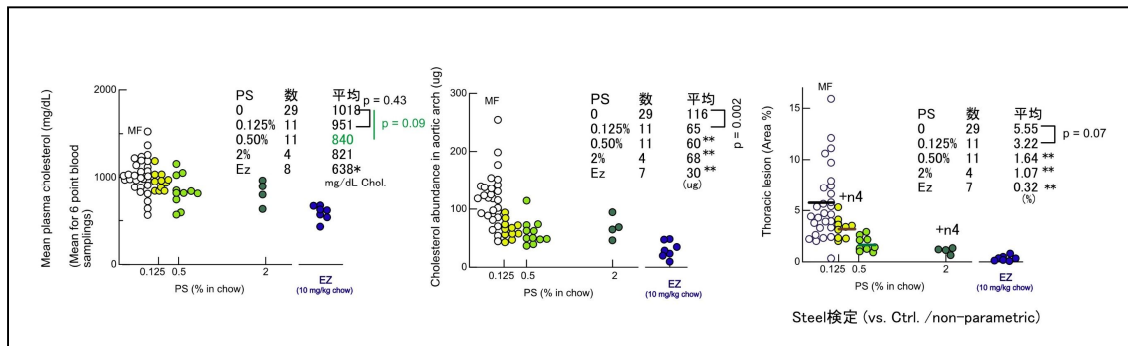


図 1(上)左より、血中コレステロール濃度の平均値、動脈弓のコレステロール含量、胸大動脈部の病巣部比率(%)。各ポイントはマウス 1 個体を示す。図内に使用したマウスの匹数、平均値、並びに統計量を示す。

図 2(左)腸管からのコレステロール排出マーカーである糞便中中性ステロール総量の植物ステロール混餌含量による比較。0.5%以上で統計的有意に増加を認めた(0.5%PS で $p = 0.0075$, 2%PS で $p < 0.0001$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	青地 英和 (Aochi Hidekazu) (40646478)	埼玉医科大学・医学部・助教 (32409)	
研究分担者	井上 郁夫 (Inoue Ikuo) (60232526)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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