

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19648

研究課題名(和文) ビタミンB2の過剰摂取は動脈硬化を悪化させるのか

研究課題名(英文) Does excessive Vitamin B2 intake exacerbate the atherosclerosis?

研究代表者

橋本 良太 (Ryota, Hashimoto)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60433786

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)：マクロファージによる酸化LDL貪食は、動脈硬化発症に関わる重要な過程である。ビタミンB2は酸化LDL取込みを促進したが、酸化LDL取込みを担う主要なスカベンジャー受容体であるCD36とCD204(SR-A)の発現量に影響を及ぼさなかった(*in vitro*)。そこで別の機序解明を試みた。ビタミンB2は糖質コルチコイドの抗炎症作用を促進することが報告されているが、糖質コルチコイドは動脈硬化の増悪因子の一つであるため、酸化LDL取込みに対する糖質コルチコイドの作用を検証した。糖質コルチコイドはMAPK経路の活性化を介して酸化LDL取込みを促進した。今後、ビタミンB2とMAPK経路の関係を検証したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンB2(リボフラビン)は、肌あれ・にきび・口内炎などを改善するためのサプリメントや医薬品として広く利用されている。In vitroの実験からは、ビタミンB2が酸化LDL取込みを促進するデータが得られた。一方、in vivoの実験からはビタミンB2が動脈硬化を増悪させるデータは得られなかった。ビタミンB2が動脈硬化を増悪させる可能性は否定できないが、ビタミンB2に血中コレステロール濃度を下げる作用がある点および水溶性であることを考慮すると、ビタミンB2をサプリメントとして用いる際に動脈硬化に対して特段の注意を払う必要はないことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis of oxidized LDL by macrophages is an important process in the development of atherosclerosis. Vitamin B2 enhanced the uptake of oxidized LDL by macrophages (*in vitro*). However, vitamin B2 did not affect the expression levels of CD36 and CD204 (SR-A), the major scavenger receptors responsible for oxidized LDL uptake. Therefore, we attempted to elucidate other mechanisms involved in oxidized LDL uptake. Vitamin B2 has been reported to promote the anti-inflammatory effects of glucocorticoids, and since glucocorticoids are one of the exacerbating factors in atherosclerosis, we tested the effects of glucocorticoids on oxidized LDL uptake. Glucocorticoids enhanced oxidized LDL uptake via activation of the MAPK pathway. In the future, we would like to verify the relationship between vitamin B2, glucocorticoids, and the MAPK pathway.

研究分野：細胞生理学

キーワード：ビタミンB2 マクロファージ 酸化LDL 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B2 (リボフラビン) は、肌あれ・にきび・口内炎などを改善するためのサプリメントや医薬品として広く利用されている。血中コレステロール濃度を下げる作用もあるので、医薬品として高コレステロール血症の適応がある。しかし動脈硬化の原因になる高コレステロール血症を弱いながら改善するにも関わらず、調べた限りビタミン B2 が動脈硬化を改善するという報告はない。本研究では、「ビタミン B2 が動脈硬化を増悪させる何らかの作用を併せもつことで、コレステロール濃度降下による抗動脈硬化作用をマスクしているのではないか、ひいては動脈硬化を増悪させる一面があるのではないか」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

ビタミン B2 をサプリメントとして用いる際に「副作用の出にくい摂取量の提示」と「安全な使用」につなげることを目指して、本研究では、「ビタミン B2 が動脈硬化を増悪させるかどうか」を *in vitro* および *in vivo* で検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化発症に関わる細胞の生理機能に対するビタミン B2 の影響 (*in vitro*)

動脈硬化の発症過程には①～③の3つのポイントがあり、ビタミン B2 が①-③のそれぞれの過程に影響するかどうかを *in vitro* にて検証した。

①「血管内皮細胞が障害される」 血管内皮細胞にビタミン B2 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ーターにて測定することで、細胞障害の程度を定量した。

②「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)」 LDL に対してビタミン B2 を添加した後、酸化 LDL を ELISA にて定量した。

③「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」 マクロファージに対して蛍光標識された酸化 LDL コレステロールとビタミン B2 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ーターにて測定することで、酸化 LDL の取り込みを評価した。また、酸化 LDL 取り込みに関わるスカベンジャー受容体の発現量をフローサイトメトリー、ウェスタンブロットティングで定量した。

(2) 動脈硬化の増悪に対するビタミン B2 の過剰摂取の影響 (*in vivo*)

ビタミン B2 を加えた飲料水を、マウスに8週間自由飲水させた。骨髄マクロファージと腹腔マクロファージを単離し、蛍光標識された酸化 LDL コレステロールを添加した後、マクロファージ内の蛍光強度の増大をフローサイトメーターにて測定することで、酸化 LDL の取り込みを評価した。体内のビタミン B2 濃度の基準値は 52~110 ng/mL であり (第十七改正 日本薬局方医薬品情報、2016)、サプリメントの過剰摂取 (場合によっては普段の食生活) により到達する濃度として 100 ng/mL を想定して実験を行った。

4. 研究成果

ビタミン B1、B2、B3、B5、B6、B9 には血管内皮細胞を障害する作用、および LDL を酸化 LDL に変換させる作用はなかった。ビタミン B1、B3、B5、B6、B9 はマクロファージの酸化 LDL の取り込みには影響しなかったが、ビタミン B2 は取り込みを促進した (図 1)。このように *in vitro* の

結果ながら、ビタミン B2 が動脈硬化を増悪させる可能性を示すデータを得た。

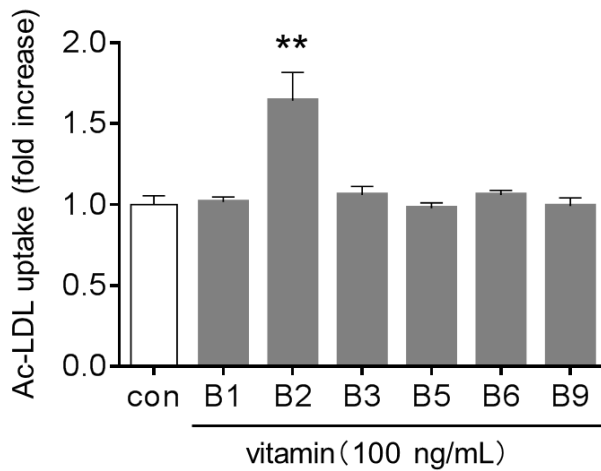
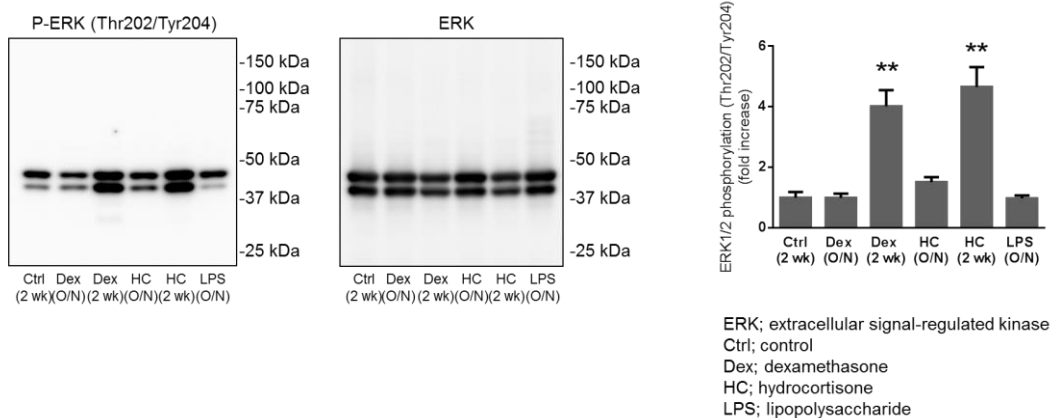


図1 ビタミン B2 は酸化 LDL 取込みを促進する (** P<0.01)

マクロファージの酸化 LDL 取込みを増大させるビタミン B2 の作用機序解明を *in vitro* で試みた。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。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は CD36 と CD204 (SR-A) である (Kunjathoor et al., 2002; Chistiakov et al., 2016) が、ビタミン B2 はこれらスカベンジャー受容体の発現量に影響を及ぼさなかった。既知の経路ではビタミン B2 の作用機序を説明できなかったため、マクロファージの酸化 LDL 取込みに関わる別の機序解明を試みた。ビタミン B2 は糖質コルチコイドの抗炎症作用を促進することが報告されている (Menezes et al., 2017)。そして糖質コルチコイドは動脈硬化の増悪因子の一つであるため、酸化 LDL 取込みに対する糖質コルチコイドの作用を検証した。糖質コルチコイドを 2 週間処理されたマクロファージは、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路の活性化を介して (図 2)、酸化 LDL 取込み能が亢進していた (図 3)。今後、ビタミン B2、糖質コルチコイドおよび MAPK 経路の関係を検証したい。



ERK; extracellular signal-regulated kinase
 Ctrl; control
 Dex; dexamethasone
 HC; hydrocortisone
 LPS; lipopolysaccharide

図2 糖質コルチコイドは MAPK 経路を活性化する (** P<0.01)

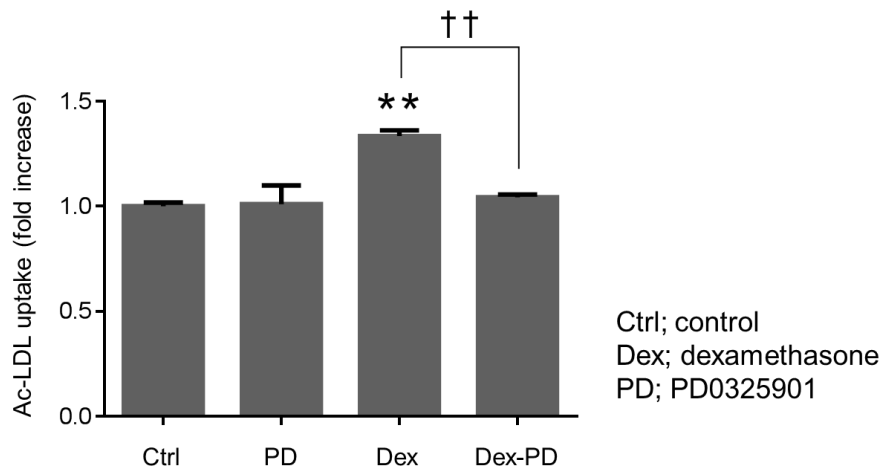


図3 糖質コルチコイドの酸化 LDL 取込み促進作用は MAPK 経路阻害薬で抑制される (** P<0.01)

次に、ビタミン B2 を添加した水を自由飲水させた群と添加しない水を自由飲水させた群とで酸化 LDL 取込み能を検証した。骨髄マクロファージでは両者に差異は認められなかった。同様に、腹腔マクロファージでも両者に差異は認められなかった。以上の結果より、酸化 LDL 取込みについて in vitro の結果と in vivo の結果が一致しないことが分かった。今後 in vivo において、ビタミン B2 と糖質コルチコイドの組合せで酸化 LDL 取込みを検証したい。

今回、in vivo の結果からはビタミン B2 が動脈硬化を増悪させるデータは得られなかった。糖質コルチコイドの濃度に応じてビタミン B2 が動脈硬化を増悪させる可能性は否定できないが、ビタミン B2 に血中コレステロール濃度を下げる作用がある点および水溶性であることを考慮すると、ビタミン B2 をサプリメントとして用いる際に動脈硬化に対して特段の注意を払う必要はないことが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Ryota, Gupte Sachin A.	4. 巻 144
2. 論文標題 G6PD is a critical enabler of hypoxia-induced accumulation of macrophages and platelets in mice lungs and contributor to lung inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 106976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vph.2022.106976	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 該当する

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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