

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 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790043

研究課題名（和文）植物ステロールによるコレステロール吸収抑制機構の解明と新しい吸収抑制方法

研究課題名（英文）Investigation into mechanism of inhibitive cholesterol absorption by plant sterols and the novel method

研究代表者

松岡 圭介（MATSUOKA KEISUKE）

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90384635

研究成果の概要（和文）：数種の植物ステロール/スタノール種の添加に伴うコレステロール低下機構をモデル腸液中で研究を行った。その植物ステロール/スタノール種の僅かな分子構造の違いはモデル腸液中でのコレステロールの溶解度に影響を及ぼした。その競争的可溶化の結果、コレスタノールが最もコレステロールの溶解度を低下させた。そのコレステロールの最大溶解度はコレステロールだけ溶解させた時に対して、35%まで低下する。コレステロールの溶解度低下効果は次の順であることが分かった。ブラシカステロール<スティグマステロール<フコステロール<カンペステロール<シトスタノール<シトステロール<コレスタノール。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of cholesterol lowering by the addition of several kinds of plant sterols/sterols was investigated in model intestinal solution. Slight differences in the molecular structures of a category of sterol/stanol species affect the solubility of cholesterol in a model intestinal solution. The results of competitive solubilization revealed that cholestanol has the largest cholesterol-lowering effect, decreasing cholesterol solubility to 35% of that in a single solubilizate system. The cholesterol-lowering effect increase in the order of < brassicasterol < stigmasterol < fucosterol < campesterol < sitostanol < sitosterol < cholestanol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：物理化学

1. 研究開始当初の背景

植物ステロール・スタノール類がコレステロールの吸収を妨げ、人体中の血清コレステロール濃度を低下させる効果は知られている。日本国内でも、その効果を利用した特保関連製品（料理用油やマーガリン等）が販売されている。コレステロール/植物スタノールの胆汁酸塩ミセルへの可溶化競争が、コレ

ステロール吸収低下機構の主要原因と推測している。コレステロールの可溶化量を効果的に減少させるには、胆汁酸塩ミセルへの可溶化に伴う自由エネルギーがコレステロールより低いことが必要条件であるかもしれない。また、コレステロールの胆汁酸塩中の可溶化位置を優先的に奪う事も必要かもしれない。この仮定を実証するには多くの可溶

化実験及び分子論的な考察を含めた NMR 測定が必要である。また、代表的な分子構造の物質を用いて、分子構造の違いに基づく新しいコレステロール吸収抑制方法を競争的可溶化の側面から実証したい。

2. 研究の目的

コレステロールは生体において必要不可欠な脂質であり、ステロイドホルモンや胆汁酸合成に使用され、また、細胞膜組成の一部として重要な役割を果たしている。一方、食生活の変化に伴い、過剰のコレステロール摂取は動脈硬化を招き、心疾患の原因の一つになっている (*Ann. Med.*, 2004, 36, 126)。その中でも、冠動脈性心疾患は死亡率増加の原因となり、世界的にも急速に増加している (*Lancet*, 1997, 349, 1269)。血漿コレステロールの増加は冠動脈性心疾患に関して危険因子と確認されてきた (*Am. J. Med.*, 1984, 76, 4)。今日、コレステロール量の低下は冠動脈性心疾患予防の必要不可欠な条件である。その予防対策の一つとして、食物としての植物ステロール (PS) の摂取は血漿中のコレステロールを減少させ、その必要な量を安定化させる働きがあると言われている。この効果を応用した食品として、植物油、マヨネーズ、マーガリンがあり、最近では特保食品の認定を受けたものもある。植物ステロールはコレステロールと分子構造が類似しており、側鎖配置等が異なる天然由来の化合物である。遊離型もしくは脂肪酸エステルタイプの植物ステロールを含む食事摂取は血漿中の低密度リポタンパク質コレステロール (LDL) を低下させるのに有効である (*Eur. J. Lipids Sci. Technol.* 2003, 105, 171)。その遊離型及びエステル型の植物ステロールによるコレステロール低下に関する主な機構作用は腸内でのコレステロールの吸収阻害である。また、混合ミセル中へのコレステロールの可溶化競争、不溶性の混合結晶を形成するコレステロールの共結晶化、リパーゼまたはコレステロールエステラーゼによる加水分解過程の阻止のような異なる機構が植物ステロールによって血清コレステロール濃度を低下すると信じられているが、正確な分子機構は未だ完全には解明されていない。

植物ステロール摂取によるコレステロールの吸収抑制効果は、1950 年代より動物・人においても認識されてきたが、その摂取 (添加) 量の割には有効性が低かった。70 年代の後半に取り上げられている薬理学の本には 1 日あたり 3g のシトステロールの量を 3 回与えることが推奨されており、高価な Cytellin という製品は最大 30g/day である

(*Atherosclerosis*, 1977, 28, 325)。上記の例のように、その分子機構を解明しない限り、有効性のある予防や治療は確立されているとは言えず、また、植物ステロール以外の効果的な物質の選択にもつながらない。

胆汁酸塩ミセル系で競争的可溶化が生じる原因とその一般的法則を解明できればコレステロールの可溶化量、つまり、コレステロールの腸内での吸収量を効果的に制限することが可能になるはずである。

今回の研究は *in vitro* 系に限定し、胆汁酸塩ミセル溶液へのコレステロール/数種の植物ステロール類の競争的可溶化実験を行う。現時点で β -シトステロール、 β -シトスタノールに関する実験は終了している。最終的には 5 種類程度の植物ステロール/スタノール類や、特徴的な分子構造の化合物をコレステロールと共に可溶化実験を行う。その可溶化に伴う自由エネルギー変化を熱力学的に解析し、分子構造の違いによる可溶化の一般的法則や効果のある植物ステロールを探索する。また、NMR を用いた縦緩和時間測定及び ROESY 測定から、胆汁酸塩ミセルへの被可溶化物の可溶化位置を決定し、その位置の違いから選択的可溶化が生じる手がかりを探る。次に、リン脂質やトリアシルグリセロール等を添加したモデル腸液での *in vitro* 実験系を行い、より生体内に近いモデルで同様の研究を行う。そして最後に、代表的な分子構造の物質を用いて、コレステロールとの競争的可溶化実験を行い、競争的可溶化に関する一般的な法則を導くことを行う。

日本人の食生活の変化によるコレステロールの摂取量は増加しており、今後、体内で吸収されるコレステロール量の制御が可能になれば、高コレステロール起因の健康問題を根本から改善できるはずである。

3. 研究の方法

(1) 試薬

研究に用いたコレステロール、6種の胆汁酸塩、植物ステロール/スタノール、ホスファチジルコリン、モノオレイン、オレイン酸は SIGMA-ALDRICH 社より試薬として購入した。その他、 β -シトステロールはタマ生化学、グリチルリチン酸は主に長良サイエンスより購入した。定量に用いた放射性標識化合物 [4-¹⁴C] コレステロールは ARC より購入した。

(2) 溶液調整

溶媒はイオン交換水を用いて、0.15M NaCl、pH7.5 に Tris-HCl 緩衝溶液とした。モデル腸液は表1の組成と濃度で調整した。脂質膜の調整は逆相蒸発法を利用した。

表1 モデル腸液の組成

組成	濃度 / mM	モル比
可溶化剤		
混合胆汁酸塩	標準:10 (範囲0-25)	
グリコール酸ナトリウム		6
グリコケノデオキシコール酸ナトリウム		6
グリコデオキシコール酸ナトリウム		4
タウロコール酸ナトリウム		3
タウロケケノデオキシコール酸ナトリウム		3
タウロデオキシコール酸ナトリウム		2
L-α-ホスファチジルコリン		
	標準2 (range:0-10)	
オレイン酸		4
モノオレイン		2

(3) 可溶化実験

コレステロールと下記の植物ステロール/スタノールの競争的可溶化実験を行い、定量化、可溶化に伴う熱力学的パラメーターの算出を行う。

実験系

被可溶化物：コレステロール/植物ステロール/スタノール類（コレスタノール、スティグマステロール、カンペステロール、ブラシカステロール、シトステロール、シトスタノール、フコステロール）

可溶化剤：タウロコール酸塩（ミセル会合数：比較的小[n=6]）

タウロデオキシコール酸塩（ミセル会合数：比較的大[n=16]）

モデル腸液（表1）

可溶化装置：自作装置使用（図1）

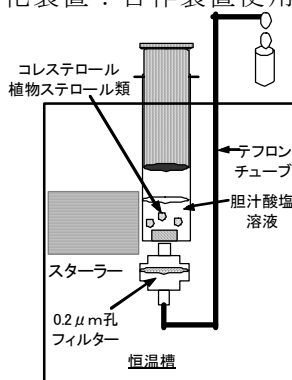


図1 可溶化装置

定量方法：

通常ステロール類の定量は酵素法を用いた。図1の装置で24時間攪拌して得た濾液をステロール定量キット（WAKO）に加えて、その吸光度を島津UV1800で測定した。コレステロール/植物ステロール混合系ではコレステロールのRI標識法（液体シンチレーションカウンタ）で決定した。

(4) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

モデル腸液中のコレステロールキャリアの観察はTEMを用いた。酢酸ウラニルを添加したネガティブ染色法と溶液を凍結してそのレプ

リカを観察する凍結レプリカ法の二つの方法を用いた。装置は花市電子顕微鏡研究所のJEM-2000FXを使用した。

(5) 動的光散乱方法

モデル腸液中のコレステロールキャリアのサイズは拡散係数の測定を動的光散乱測定法 (ALV-5000E) 行い、ストークス・アインシュタインの式に基づいて、平均流体力学半径を算出した。

(6) NMR測定法：

①緩和時間測定

日本電子AL-300を用いて胆汁酸溶液の縦緩和時間(T1)を測定した。この方法により可溶化により影響を受けている胆汁酸塩分子の水素を特定できる。測定的主要パラメーターは90°パルスは12.1ms, 180°パルスは24.2ms, 遅延時間は6秒とした。

②二次元NMR測定

測定機は日本電子アルファ500を用いて、ステロール類を可溶化した溶液のROESY測定を行った。ステロール類と直接的に相互作用している胆汁酸塩分子の位置を特定することができる。混合時間は300msで、標準パルスセットを用いた。

4. 研究成果

(1) 植物ステロール/スタノール種の分子構造の違いに基づくコレステロールの可溶化量低下に及ぼす影響

①胆汁酸塩水溶液系

最も単純な系として、胆汁酸塩のみの系において、代表的な植物ステロール/スタノール類の中で、分子構造の違いに基づくコレステロールの可溶化量低下に及ぼす影響を研究した。

図2に15mMのNaTDC水溶液系における各種植物ステロール/スタノールとコレステロールの最大可溶化量の測定結果を示すステロイド環側鎖に不飽和の二重結合をもつブラシカステロール、スティグマステロールの添加は2成分混合系でコレステロールの可溶化量の低下をもたらさず、逆に自身の可溶化量が減少した。研究に用いた6種のステロール/スタノール種の中ではコレスタノールが最もコレステロールの可溶化量の低下に効果的であったが、コレスタノールは残念ながら植物には含まれていない。そのため、コレステロールの可溶化の低下量は半分程度であるが、コレステロールの分子側鎖にメチル基、エチル基が付加した分子構造をもつカンペステロール、シトステロール、もしくはシトスタノールがコレステロールの可溶化量低下に有効であることが分かった。

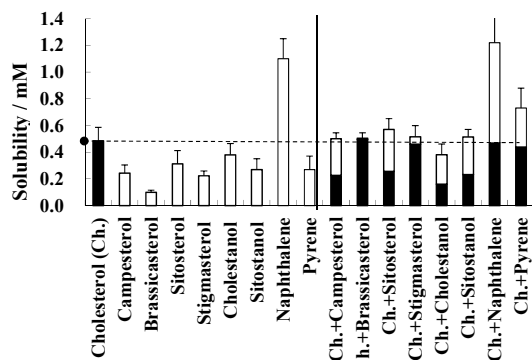


図 2 NaTDC (15mM)系におけるコレステロールと植物ステロール類の競争的可溶化(35°C).

熱力学的解析から、この競争的可溶化に関連する更なる情報を得ることができる。そのモデルと解析の詳細は割愛し、結果だけ示す。図 3 の左側の 1 成分可溶化系での結果を基に、第一段可溶化平衡定数 (\bar{K}_1) を求め、可溶化に伴う Gibbs の自由エネルギー変化 (ΔG^0) を求めた (図 3)。

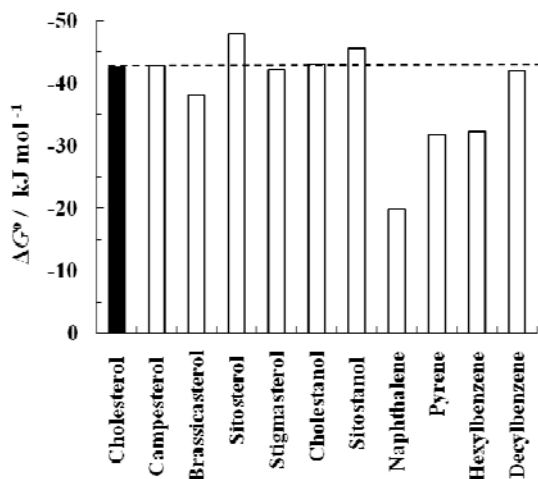


図 3 可溶化に伴う Gibbs の自由エネルギー変化

また、1 つの NaTDC ミセル (平均会合数 16) へ可溶化されている平均の被可溶化物の分子数 (\bar{R}) も併せて計算した。これらの結果は Table 1 に 2 章の結果も含めて示した。β-シトステロール、β-シトスタノールはコレステロールより ΔG^0 が小さく、両者の胆汁酸塩ミセル溶液中への可溶化はコレステロールよりエネルギー的に有利なことが分かる。しかしながら、コレステロールと数種の植物ステロール類に関しての ΔG^0 値に顕著な差はない。植物ステロール類がコレステロールに対して独占的に可溶化されないのは、この小さなエネルギー差と対応しているのかもしれない。一方、混合系でコレステロールの可溶化量を低下させることができなかったブラシカステロール、スティグマステロ

ール、芳香族化合物、アルキルベンゼンはコレステロールより ΔG^0 が大きいことが示されている (図 3)。また、 \bar{R} に着目すると、表 2 に示すコレステロールの場合、 $\bar{R} = 0.57$ なので、全ての NaTDC ミセルにコレステロールが可溶化されているのではなく、その割合は 2 つのミセルがあれば、1 つはコレステロールが可溶化されていないと想定される。2 成分混合系を想定した場合も、 $\bar{R} < 1$ が仮定されるため、空のミセルがあるにも関わらず、計算上、全てのミセル中で競争的 (選択的) な可溶化が起こってはいない。

表 2 可溶化パラメーター

Solubilize	Aqueous solubility mol dm ⁻³	\bar{R}	\bar{K}_1 mol ⁻¹ dm ³	ΔG^0 kJ mol ⁻¹
Cholesterol	3.7×10^{-8} , 3.2×10^{-8}	0.57	1.6×10^7	-42.4
Campesterol	1.6×10^{-8}	0.29	1.8×10^7	-42.7
Brassicasterol	$4.3 \pm 2.2 \times 10^{-8}$	0.12	2.9×10^6	-38.2
β-Sitosterol	2.8×10^{-9} , 5.0×10^{-9}	0.37	1.3×10^8	-47.9
Stigmasterol	$1.9 \pm 1.1 \times 10^{-8}$	0.26	1.4×10^7	-42.0
Cholestanol	$2.3 \pm 1.3 \times 10^{-8}$	0.45	1.9×10^7	-43.0
β-Sitostanol	5.8×10^{-9c}	0.32	5.5×10^7	-45.7
Naphthalene	3.7×10^{-4}	0.86	2.4×10^3	-19.9
Pyrene	1.1×10^{-6}	0.32	2.5×10^5	-31.8
Hexylbenzene	6.6×10^{-6}	2.1	3.1×10^5	-32.4
Decylbenzene	5.0×10^{-9}	0.46	1.3×10^7	-42.0

②モデル腸液系

7 種の植物ステロール/スタノール種を用いて、モデル腸液系で前出と同じ競争的可溶化実験を行った。その結果を図 4 に示す。なお、モデル腸液の組成はすでに表 1 に示してあり、その腸液の特徴は次の (2) の章に記載した。その結果、コレステロールや植物ステロール類の可溶化量は単純な NaTDC15mM 水溶液系と比較して、3 倍程度も可溶化量が増加する。しかしながら、2 成分混合系の可溶化において、コレステロールの最大可溶化量を低下さ

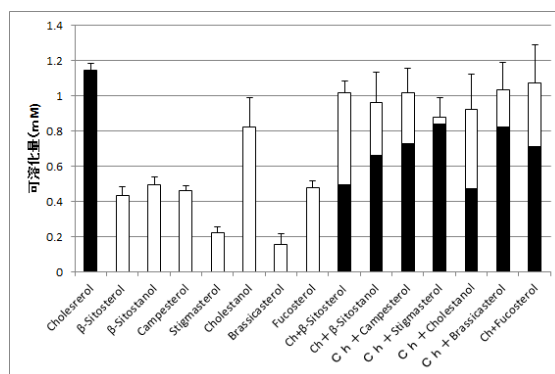


図 4 モデル腸液系におけるコレステロールと植物ステロール類の競争的可溶化(35°C).

せる植物ステロール種の順位などは単純系と大きくは異なる。この場合もコレスタノールやβ-シトステロールが効果的である

ことが分かった。

(2) モデル腸液中の胆汁脂質の組成変化に伴うコレステロールと β -シトステロールの競争的可溶化

基準としたモデル腸液の濃度においては、図5のTEM写真に示すように主に平均で半径70nm程度の大きさのリポソーム構造の会合体が多分散状態で存在している。胆汁酸塩(10mM)のみでは数nm程度の小ミセルを形成する。その系にリン脂質(2mM)が加わると、半径4nm程度の混合ミセルが形成し、脂肪類(計6mM)の添加でも半径4nm程度のエマルジョン構造を形成する。故に、全ての成分の混合によって比較的大きなリポソーム会合体が形成される。



図5 モデル腸液中の会合体のTEM写真

その特徴的な会合体へのコレステロールと β -シトステロールの競争的可溶化の結果を図6に示した。モデル腸液の成分の増減は溶解度に大きく影響を及ぼしており、脂肪の添加はステロール類の可溶化量を大きく増加させる。しかし、コレステロールと β -シトステロールの間の可溶化選択性はモデル腸液の成分に基づく会合体の種類の影響を受けておらず、その溶解度比はほぼ1:1であった。故に、コレステロールと β -シトステロールの間において、会合体の種類に基づく可溶化の選択性は変わらないだけでなく、

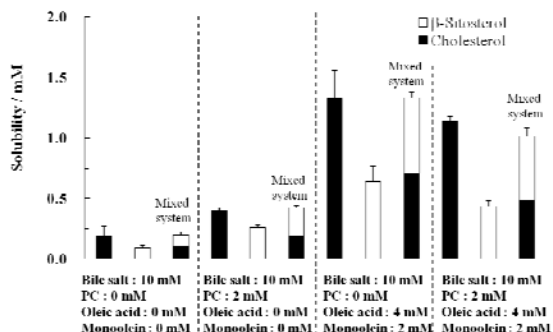


図6 モデル腸液中でのコレステロールと β -シトステロールの競争的可溶化

また、胆汁酸塩とリン脂質の濃度を変化させても、その選択性に大きな変化はなかった。

モデル腸液への可溶化に伴う自由エネルギー変化(ΔG^θ)はコレステロールと β -シトステロールではそれぞれ -46 kJ mol^{-1} と -50 kJ mol^{-1} であることが分かった。

(3) NMRを用いた植物ステロール、難水溶性物質の胆汁酸塩ミセル中における可溶化位置

図2に示したように、コレステロール/ β -シトステロール間では競争的可溶化となっているが、コレステロール/芳香族化合物間では若干の芳香族化合物の可溶化量の低下は見られるが、コレステロールの可溶化量は殆ど変化していない。この現象は化合物の分子構造の違いに由来し、胆汁酸塩ミセルへの可溶化位置の違いに基づくものではないかと推測される。NMRを用いて、この分子論的な考察を行った。

図7の縦軸は15mMのNaTDC溶液中で各種可溶化物を最大に可溶化させて測定した時の T_1 値を可溶化させていない純粋なミセル溶液の T_1 で割った数値である。つまり、その数値が1以上であれば、可溶化によって水素の動的な自由度が増加し、1以下であれば、逆に運動性が低下すると解釈する。ステロール類と芳香族化合物類ではNaTDCミセルへ与える影響が異なることが図7から読み取れる。芳香族化合物類の可溶化では18, 19, 21位のメチル基の T_1 が1より大きくなっている。つまり、可溶化によるミセルの構造変化がステロール類とは大きく異なり、疎水面にあるメチル基の動的な自由度が増したことが間接的に読み取れる。

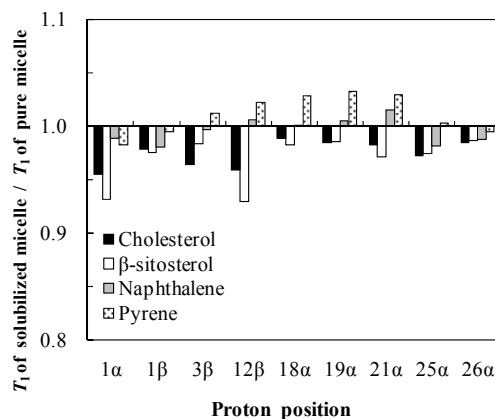


図7 被可溶化物を可溶化した T_1 と純粋なミセルの T_1 の可溶化比

また、純粋なミセル溶液(NaTDC 15mM)と可溶化溶液の2次元のH-ROESYスペクトル測定を行い、ミセル中・ミセル間の水素の相互作用を測定した。その結果を表3に示すが、ステロールを可溶化した溶液は純粋なミセル溶液の交差ピークのパターンとあまり変わ

らなかったが、芳香族化合物では大きく異なっていた。NaTDC の 19 位のメチレン基は芳香族化合物と相互作用の交差ピークが得られた。この結果より、ピレンはミセル中のパリセード層に可溶化されている可能性が高い。ステロール類の可溶化の場合、胆汁酸塩と分子構造が類似しているため、その可溶化位置を直接的に決定することは難しい。また、小会合体である胆汁酸塩ミセルの構造が正確にイメージできないことも原因の一つである。今回の研究から可溶化物の種類によって、ミセル中の可溶化位置が異なることは判明したが、その詳細な場所の特定までは、NMR によるアプローチでも到達できるレベルには至らなかった。

表 3 NaTDC 溶液の ROESY 測定結果

Pair of cross-correlation peak for saturated solubilize of NaTDC solution					
Pair	Pure micelle	Cholesterol	β -Sitosterol	Naphthalene	Pyrene
3 β -7 α	-	+	+	-	-
5 α -18CH ₃	-	-	-	+	+
5 α -19CH ₃	-	-	-	+	-
5 α -21CH ₃	+	-	-	+	-
6 α -17 α	-	-	-	-	+
7 α -16 β	-	+	-	-	-
11 α -19CH ₃	-	-	-	+	-
11 α -18CH ₃	-	-	-	-	+
12 β -18CH ₃	+	-	-	+	+
12 β -21CH ₃	+	+	+	+	+
18CH ₃ -19CH ₃	+	+	+	+	+
18CH ₃ -21CH ₃	+	+	+	+	+
19CH ₃ -21CH ₃	+	-	-	-	-
19CH ₃ -7.8ppm	-	-	-	+	-
19CH ₃ -8.1ppm	-	-	-	-	+

(4) 結論

今回、紙面の都合で重要な結果のみ記載をした。植物ステロールの摂取による生体内のコレステロールの吸収低下の現象が、生体外におけるコレステロール/植物ステロール/胆汁酸塩の系における競争的可溶化の現象と関連づけられることは大変興味深い。胆汁酸塩のみの単純系からモデル腸液まで含む実験結果から、7 種の植物ステロール類の添加において、その分子構造に起因してコレステロールの可溶化量の低下に大きく影響を及ぼしている。コレスタノールが最も効果があり、コレステロールの可溶化量が約半分以下の量まで低下する。可溶化は会合体と被可溶化物の疎水的相互作用に基づくため、より胆汁酸塩ミセルへ適合する物質があれば、植物ステロール類以外にもコレステロール可溶化量を低下させることができるはずである。今後新規の物質の開拓が研究の課題でもある。

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 4 件)

①Keisuke Matsuoka, Rie Ebisawa, Saori Yui, Chikako Honda, Kazutoyo Endo. Competitive

solubilization of cholesterol and β -sitosterol with changing biliary lipid compositions in model intestinal solution. 査読有

Chemistry and Physics of Lipids, 165(1), 7-14, 2012.

DOI:10.1016/j.chemphyslip.2011.10.004

②Keisuke Matsuoka, Eriko Kajimoto, Maho Horiuchi, Maho, Chikako Honda, Kazutoyo Endo. Competitive solubilization of cholesterol and six species of sterol/stanol in bile salt micelles. 査読有 *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(4-5), 397-402, 2010.

DOI:10.1016/j.chemphyslip.2010.03.006

③松岡圭介、植物ステロール/スタノールによるコレステロールの吸収抑制機構に関する研究. 査読無 *オレオサイエンス*, 11, 119-125, 2011.

<http://www.jocs-office.or.jp/mokuji/backnumber.html>

④松岡圭介、胆汁酸塩ミセルへのコレステロール及び植物ステロール/スタノールの競争的可溶. 査読無 *Colloid and interface communication*, 34, 14-15, 2009.

http://colloid.csj.jp/news_letter/sub_guide.html

[学会発表] (計 3 件)

①松岡圭介、モデル腸液中の胆汁脂質の組成変化に伴うコレステロールと β -シトステロールの競争的可溶化、日本化学会コロイド及び界面化学部会、2011 年 9 月 9 日、京都大学 (京都) .

②松岡圭介、植物ステロール/スタノールによるコレステロールの吸収抑制機構に関する研究、日本油化学会、2010 年 9 月 15 日、北海道大学 (函館) .

③松岡圭介、タウロデオキシコール酸ナトリウム溶液へのコレステロールと 6 種の植物ステロール/スタノールの競争的可溶化、日本化学会年会、2010 年 3 月 27 日、近畿大学 (大阪府) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 圭介 (MATSUOKA KEISUKE)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：90384635