

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：22700778

研究課題名(和文) HDL を介した抗動脈硬化作用を有するポリフェノールの網羅的探索と制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism and exploration of polyphenol which has anti-atherogenic effect through HDL

研究代表者

近藤 春美 (Kondo, Harumi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：80401602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000 円、(間接経費) 480,000 円

研究成果の概要(和文)：HDLは動脈硬化巣マクロファージから余剰なコレステロールを引き抜いて肝臓へ戻すコレステロール逆転送作用を有する。我々は、コーヒーに含まれるポリフェノールであるフェルラ酸の他、アントシアニンにもコレステロール逆転送作用を有することをマウスを用いた実験で明らかにした。また、フェルラ酸はマウスよりもよりヒトに近いHDL組成を有するハムスターにおいてもコレステロール逆転送を促進することを示した。

研究成果の概要(英文)：Reverse cholesterol transport (RCT) is pivotal in the return of excess cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion in bile and eventually feces. RCT from macrophages is a critical anti-atherogenicity mechanism of HDL. Coffee polyphenol; ferulic acid and anthocyanin showed to increase macrophage RCT in mice. In addition, we found that ferulic acid enhanced it in hamsters which have lipoprotein profile like as human.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：コレステロール ポリフェノール HDL マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

わが国において、動脈硬化を基盤とした心血管疾患は癌と並ぶ主要な死因を占めている。動脈硬化は、酸化した低密度リポタンパク質 (LDL) をマクロファージが貪食・泡沫化して血管を肥厚させることにより発症および進展する。現在、動脈硬化性疾患の予防には肝臓でのコレステロール合成を阻害することによって LDL コレステロールを低下させる LDL 低下療法が最も有効とされているが、その効果は多くの疫学研究により 3 割程度に留まることが示されている。一方、HDL は多くの前向き疫学研究により高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールレベルと心血管疾患の負の相関を示すことから抗動脈硬化性リポタンパク質と考えられている。HDL の機能としては、コレステロール逆転送作用、抗酸化作用、抗炎症作用、血管内皮機能改善作用などが報告されているが、中でも動脈硬化巣マクロファージ中の余剰なコレステロールを引き抜き、肝臓へと戻して糞便中へと排出するコレステロール逆転送作用の機能が最も重要な機能と位置付けられている。細胞からのコレステロール引き抜き機構は、HDL の主要な担体タンパク質であるアポリポタンパク質 A-I (アポ A-I) は細胞膜に存在するトランスポーターである ATP 結合カセットトランスポーター (ABC) A1 を介しコレステロールを引き抜く。一方、HDL は ABCG1 およびスカベンジャー受容体クラス B タイプ I (SR-BI) を介して細胞中の余剰なコレステロールを引き抜いている。

2. 研究の目的

HDL コレステロールの量を増加させることに加えて HDL の質的および機能的な改善などが LDL 低下療法で予防出来ない残り 7 割のリスクを軽減させるものの 1 つとして盛んに研究されている。本稿では、動脈硬化性疾患を予防するために、HDL の機能であるコレステロール逆転送作用に着目し、効果的な食

事因子中でもコーヒー由来ポリフェノールを中心に著者らの得た結果を報告する。

3. 研究の方法

1) マクロファージ様細胞にポリフェノールを添加し、1) 放射性同位元素を用いたコレステロール引抜き能の測定、2) real time PCR 法を用いたコレステロール引抜き関連分子の遺伝子発現の検討、3) western blot 法を用いたコレステロール引抜き関連分子の蛋白発現レベルの検討、さらに 4) 上記遺伝子上流の核内受容体、転写制御因子の発現を検討する。

2) ポリフェノールを摂取した健常人の単核球をポリフェノール摂取前後の血清でマクロファージに分化させ、コレステロール引抜き能を *ex vivo* で検討する。

3) マウスに *in vitro* 実験で増強作用を有したポリフェノールを含む食餌を摂取させ、コレステロールトリチウム標識したマクロファージを腹腔内投与した後、糞便中および胆汁中のトリチウムをカウントすることにより、コレステロール引抜きを *in vivo* で評価する。

4. 研究成果

1) コーヒー由来ポリフェノールのコレステロール引き抜き作用

オランダで行われた疫学調査 Zutphen Elderly Study から、食事由来のフラボノイド摂取が高いほど、心血管疾患の発症リスクが低下することが示され、フラボノイドをはじめとしたポリフェノールの生理機能に対する関心が高まった。コーヒーの摂取と動脈硬化性疾患については、以前は動脈硬化惹起性に働く可能性が指摘されていた。しかし最近、喫煙など他の動脈硬化危険因子の影響を排除したより厳密な疫学調査により、コーヒーを摂取する群は摂取しない群に比較して脳梗塞や脳卒中発症リスクが低下することが報告され、そ

の効能としてコーヒーに含まれるポリフェノールであるクロロゲン酸に注目が集まっている。クロロゲン酸は速やかに代謝されて、生体内ではカフェ酸とフェルラ酸として存在している。したがって、著者らはカフェ酸とフェルラ酸がコレステロール引き抜きに及ぼす効果について、ヒト由来 THP-1 マクロファージ細胞を用いて検討した。トリチウム標識したコレステロールを取り込ませた THP-1 マクロファージ細胞にカフェ酸とフェルラ酸を作用させると、アポ A-I によるコレステロール引き抜きに変化は認めなかったが、HDL によるコレステロール引き抜きはコントロールと比べて用量依存的に増大した。

2) コーヒー由来ポリフェノールのコレステロール引き抜き機構

カフェ酸とフェルラ酸による HDL を介したコレステロール引き抜き増大作用に関わる分子機構を明らかにするために ABCG1 と SR-BI の遺伝子発現およびタンパク質発現を検討したところ、遺伝子発現とタンパク質発現ともに増加した。さらに、その発現増大機構を明らかとするために、転写阻害剤アクチノマイシン D (ActD) を用いて ABCG1 と SR-BI の遺伝子発現を測定したところ、ActD の有無にかかわらずカフェ酸とフェルラ酸は増加させたことから、転写制御ではなく mRNA の安定性に関与している可能性を示唆した。メッセンジャー RNA の安定性を制御している mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) が着目されていることから、ヒト ABCG1 および SR-BI の 3'UTR 領域を挿入したプラスミドベクターを作成し、RAW264.7 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行ったが、カフェ酸およびフェルラ酸による mRNA 安定性の増大は認められなかった。最近になり、mRNA の安定性には 5'UTR も関与しているという報告もあり、その他の機序については現在も検討中である。

3) コーヒーおよびフェルラ酸のコレステロール逆転送モデルマウスを用いた検討

細胞培養実験の検討よりカフェ酸とフェルラ酸はコレステロール引き抜き作用を促進することが明らかとなったが、動物実験においても実際にコレステロール引き抜きを有するか否か、Rader らによって確立されたコレステロール逆転送モデルマウスを用いて検討した。7 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 18 匹をコントロール、コーヒー (5 mg/kg/day)、フェルラ酸 (50 mg/kg/day) の 3 群に分けて飼育した。7 日後、これらのマウスにトリチウム標識したコレステロールを含む RAW264.7 細胞 0.5 ml を腹腔注射した。腹腔注射後 24 および 48 時間後に採血および糞便を回収し、肝臓と胆嚢を 4 時間の空腹期間のあと採取した。その結果、血清、肝臓、胆嚢中のトリチウムの放射活性に変化は認められなかったが、糞便中へのコレステロール排出はコントロール群に比べてコーヒー投与群で 14% 増加、フェルラ酸投与群では 37% の有意な増加が認められた。以上より、フェルラ酸はマクロファージ由来のコレステロールを糞便へ排出促進して、コレステロール逆転送を活性化することが明らかとなった。

4) ヒトを用いたコーヒー由来ポリフェノールのコレステロール引き抜き能の検討

細胞培養実験の検討よりカフェ酸とフェルラ酸はコレステロール引き抜き作用を促進すること、動物実験において実際にコレステロール逆転送を活性化することが明らかとなったが、われわれヒトにおいても同作用を有するか否かは重要な問題である。コーヒーの飲用を 3 日間中止した健康成人 8 名を対象に水飲用群とコーヒー飲用 (インスタントコーヒー 5g / 350mL) 群に分けてクロスオーバー試験を行った。採血は飲用前と最も血中コーヒーポリフ

ェノールの濃度は増加するとの報告されている飲用後 0.5 時間で行った。まず、飲用前後での被験者の血清中のポリフェノール濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で測定したところ、コーヒー飲用前に比べて飲用後でフェルラ酸 > カフェ酸 > フェルラ酸抱合体 > カフェ酸抱合体の順で有意な増加を認めた。次に、飲用前後に得た血液より Ficol/Hypaque 密度濃度勾配法により単球を採取し、飲用前後に得た自己血清 10% 含有 RPMI 培地で 10 日間培養することでマクロファージに分化させた後、トリチウム標識したコレステロールを取り込ませて HDL を添加した。その結果、コーヒー飲用前に比べて飲用後のカフェ酸やフェルラ酸を豊富に含む血清で単球から分化させたマクロファージでは、HDL によるコレステロール引き抜き能と ABCG1 と SR-BI の遺伝子発現およびタンパク質発現を増加することが明らかとなった。また、コーヒー飲用後の HDL そのものは HDL によるコレステロール引き抜き能に影響を及ぼさないことをあわせて報告した。この研究結果は、コーヒー摂取による抗動脈硬化作用の一部にコレステロール逆転送活性化作用が寄与する可能性を期待できるものと考えられた。

5) コーヒーポリフェノール以外の食事因子のコレステロール引き抜き作用
鮭や甲殻類などのピンク色の色素の元となるカロテノイドのアスタキサンチンは、RAW264.7 細胞においてアポ A-I および HDL によるコレステロール引き抜きを増大させ、ABCA1 および ABCG1 の mRNA およびタンパク質発現を増加させた。アスタキサンチンが ABCA1 および ABCG1 を転写制御している Liver X 受容体 (LXR) を介するか否かを検討するために、ヒト ABCA1 および ABCG1 プロモーターを含むベクターを RAW264.7 細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、アスタキサンチンは

LXR 非依存性に ABCA1 と ABCG1 の転写活性化によりこれらの発現を高めることが明らかとなった。これより、アスタキサンチンはコーヒー由来ポリフェノールとは異なる機序でマクロファージからのコレステロール引き抜きを促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- 1) 小倉正恒、綾織誠人、近藤春美、中家 和宏、滝口俊一、薬師寺恵美、佐々木 誠、小松知広、池脇克則：プロテアソーム阻害によるコレステロール逆転送系の活性化に関する研究：防衛医科大学校雑誌 39(1): 8-20, 2014
- 2) 近藤春美：食事因子と抗動脈硬化性リポ蛋白機能に関する研究：日本栄養・食糧学会誌 67(1): 3-8, 2014
- 3) Sasaki M, Terao Y, Ayaori M, Uto-Kondo H, Iizuka M, Yogo M, Hagiwara K, Takiguchi S, Yakushiji E, Nakaya K, Ogura M, Komatsu T, Ikewaki K. Hepatic Overexpression of Idol Increases Circulating Protein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 in Mice and Hamsters via Dual Mechanisms: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 and Low-Density Lipoprotein Receptor-Dependent Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; *in press.*
- 4) Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Ayaori M, Uto-Kondo H, Ikegawa M, Noguchi M, Wang KY, Izumi H, Tanimoto A. Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Micromini-pig Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet. *J Atheroscler Thromb.* 2014.Mar; 21(3): 186-203
- 5) Nakaya K, Ayaori M, Uto-Kondo H, Sotherton G M, Nishida T, Katamoto M, Miura Y, Takiguchi S, Yakushiji E, Iizuka M, Ogura M, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Adachi T, Maruyama C, Ikewaki K. Overexpression of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 in macrophages promotes reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831(8):1402-1411.
- 6) Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, Nakaya K, Takiguchi S, Yakushiji E, Sasaki M, Ikewaki K. The study of

- reverse cholesterol transport by coffee polyphenol. *J Natl Def Med Coll.* 2013; 38(1):1-15.
- 7) Sotherden G M, Uto-Kondo H, Ayaori M, Ikewaki K. Effects of nutraceuticals and botanicals on macrophage cholesterol efflux: Implications for atherosclerosis. *J Nutr Ther.* 2013; 1(2):96-106.
- 8) Iizuka M, Ayaori M, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Nakaya K, Hisada T, Sasaki M, Komatsu T, Yogo M, Kishimoto Y, Kondo K, Ikewaki K. Astaxanthin enhances ATP-binding cassette transporter A1/G1 expressions and cholesterol efflux from macrophages. *J Nutr Sci Vitam.* 2012; 58(2):96-104.
- 9) Ayaori M, Yakushiji E, Ogura M, Nakaya K, Hisada T, Uto-Kondo H, Takiguchi S, Terao Y, Sasaki M, Komatsu T, Iizuka M, Yogo M, Uehara Y, Kagechika H, Nakanishi T, Ikewaki K. Retinoic acid receptor agonists regulate expression of ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1821(4):561-572.
- 10) Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Hisada T, Uehara Y, Ogura M, Sasaki M, Komatsu T, Horii S, Uehara Y, Mochizuki S, Yoshimura M, Ikewaki K. Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR /LXR pathway: findings from *in vitro* and *ex vivo* studies. *Atherosclerosis.* 2011; 219(1):141-50.
- 11) Ogura M, Ayaori M, Terao Y, Hisada T, Iizuka M, Takiguchi S, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Nakaya K, Sasaki M, Komatsu T, Ozasa H, Ohsuzu F, Ikewaki K. Proteasomal inhibition promotes ABCA1 and ABCG1 expressions and cholesterol efflux from macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(9):1980-1987.
- 12) Terao Y, Ayaori M, Ogura M, Yakushiji E, Uto-Kondo H, Hisada T, Ozasa H, Takiguchi S, Nakaya K, Sasaki M, Komatsu T, Iizuka M, Horii S, Ikewaki K. Effect of sulfonyleurea agents on reverse cholesterol *in vitro* and *in vivo*. *J Atheroscler Thromb.* 2011; 18(6):513-530.
- 13) Nakaya K, Ayaori M, Uto-Kondo H, Hisada T, Ogura M, Yakushiji E, Takiguchi S, Terao Y, Ozasa H, Sasaki M, Komatsu T, Ohsuzu F, Ikewaki K. Cilostazol enhances macrophage reverse cholesterol transport *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis.* 2010; 213(1):135-141.
- 14) Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, Nakaya K, Ito M, Suzuki A, Takiguchi S, Yakushiji E, Terao Y, Ozasa H, Hisada T, Sasaki M, Ohsuzu F, Ikewaki K. Coffee consumption enhances HDL mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circ Res.* 2010; 106(4):779-787.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 近藤春美、綾織誠人、余郷麻希子、佐々木誠、小松知広、Grace Megumi
Sotherden、池脇克則：コーヒーポリフェノールがコレステロール逆転送作用に及ぼす影響 - ハムスターにおける検討 第45回日本動脈硬化学会、2013年7月、東京
- 2) 近藤春美、綾織誠人、佐々木誠、余郷麻希子、小松知広、Grace Megumi
Sotherden、池脇克則 ハムスターにおけるフェルラ酸のコレステロール逆転送作用に及ぼす影響、第66回日本栄養・食糧学会、2013年5月25日、愛知
- 3) Harumi Kondo, Makoto Ayaori, Makiko Yogo, Kazuhiro Nakaya, Makoto Sasaki, Maki Iizuka, Shunichi Takiguchi, Emi Yakushiji, Tomohiro Komatsu, Ikewaki Katsunori.
Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in Golden Syrian hamsters. 第44回日本動脈硬化学会、2012年7月、福岡
- 4) 近藤春美、綾織誠人、余郷麻希子、佐々木誠、滝口俊一、薬師寺恵美、飯塚麻貴、池脇克則 コレステロール負荷/吸収阻害が血清脂質およびコレステロール逆転送作用に及ぼす影響 ハムスターにおける検討、第65回日本栄養・食糧学会、2012年5月、宮城

- 5) **Harumi Kondo**, Makoto Ayaori, Kazuhiro Nakaya, Shunichi Takiguchi, Maki Iizuka, Takanori Tsuda, Emi Yakushiji, Yoshio Terao, Makoto Sasaki, Tomohiro Komatsu, Shunpei Horii, Ikewaki Katsunori. Anthocyanin enhances macrophage reverse cholesterol transport in mice. 第43回日本動脈硬化学会、2011年7月、北海道
- 6) **近藤春美**、綾織誠人、小倉正恒、中家宏、滝口俊一、薬師寺恵美、寺尾吉生、小笹英樹、井上弥絵、大鈴文孝、池脇克則：シトルリンはマクロファージからのコレステロール搬出を促進する、第65回日本栄養・食糧学会、2011年5月、東京

〔図書〕(計 5件)

- 1) 綾織誠人、**近藤春美**、池脇克則：抗動脈硬化性リポ蛋白としてHDLを考察する：real or fake?、*Vascular Medicine*、10巻1号:24-30、2014年
- 2) **近藤春美**、池脇克則：French Paradox、*動脈硬化予防*、13巻1号(3月):76-77、2014年
- 3) **近藤春美**、綾織誠人：コーヒー摂取による抗動脈硬化作用、*日本臨床*、71巻3号:684-688、2013年
- 4) 綾織誠人、小倉正恒、**近藤春美**：HDLコレステロールが低い症例、*臨床栄養*、122巻6号:865-870、2013年
- 5) **Harumi Kondo**, Makoto Ayaori, Katsunori Ikewaki. Is Coffee the Next Red Wine?: Coffee polyphenol and cholesterol efflux. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. 227-231 Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), NY, 2012.3

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 春美 (Kondo, Harumi)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：80401602