

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300257

研究課題名(和文)メタボリック症候群・生活習慣病のバイオマーカーとしてのオゾン酸化コレステロール

研究課題名(英文)Ozone-oxidized cholesterol as biomarkers for metabolic syndrome and life-style related diseases

研究代表者

大島 寛史(Ohshima, Hiroshi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：80433209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール脂肪酸エステルのおゾン酸化物として、新規にエステル型セコステロール-A類とそれらのアルドール化により生成するセコステロール-B誘導体を同定した。さらに、LC-/MS法を用いる高感度分析法を用いて、健康なヒト血液から調製したLDLコレステロール中に微量のエステル型セコステロール類を検出した。この分析法をさらに改良し、生体試料中に存在するすべてのアルデヒド化合物を網羅的に分析する方法を開発した。現在、この方法を用いて、セコステロール類を含むアルデヒド化合物が酸化ストレスに関連する生活習慣病(動脈硬化症、神経変性症、がんなど)の発症において演じている役割について検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have newly identified fatty-acid ester forms of secosterol-A including 9-oxononanoate secosterol-A and their secosterol-B derivatives as ozone-oxidized cholesterol fatty acid esters. These ester forms of secosterols were detected by a highly sensitive and specific LC-ESI-MS/MS method at 10-20 pmol/LDL mg protein in human low density lipoproteins obtained from healthy subjects. We further improved our method to analyze comprehensively various reactive aldehydes and carbonyls present in biological samples. We are currently using the method to study roles of reactive aldehydes and carbonyls in the development of various life-style related diseases such as arteriosclerosis, neurodegenerative diseases and cancer and also validate these reactive aldehydes including secosterols and unknowns as biomarkers for oxidative stress related disorders.

研究分野：総合領域

キーワード：健康と食生活 オゾン酸化コレステロール 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病とは、食習慣、運動習慣、喫煙、飲酒などの生活習慣がその発症、進展に関与する疾患群である。生活習慣病の原因として、メタボリック症候群があり、中でも肥満が第一に重要である。肥満においては、肥大化した脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの作用により、血管や脂肪組織の慢性炎症が誘発され、これらの組織において様々な活性酸素・窒素種が高濃度に生成されている。活性酸素・窒素種は、タンパク質や核酸などの生体成分と反応することにより、その機能低下や突然変異などをもたらす、病的反応を惹起する。最近、Wentworthらは、ヒトの炎症組織において、非常に反応性の高いオゾン様活性酸素種の生成する可能性を報告し (Wentworth et al., Science, 298, 2195-2199, 2002; Babior et al., PNAS 100, 3031-3034, 2003) さらに、ヒト動脈硬化巣においてコレステロールのオゾン特異的酸化コレステロール (secosterol-A と secosterol-B: 図-1) の存在を明らかにした (Wentworth et al., Science, 302, 1053-1056, 2003)。secosterol -A と B は、コレステロールとスーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot-}$ )、ヒドロキシラジカル ( $HO\cdot$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などの活性酸素種の反応では生成されず、オゾンとの反応によってのみ特異的に生成する (Gumulka & Smith, JACS 105, 1972-1979, 1983) と報告されてきたことから、生体内においてオゾン様活性酸素が生成される可能性が示唆されている。しかし、この生体内におけるオゾン様活性酸素の生成機構については明らかでない点が多い (Nieva & Wentworth, Trend Biochem Sci 29, 274-278, 2004)。一方、オゾン様活性酸素とコレステロールの反応で生成する secosterol -A と B は、ヒト動脈硬化巣やアルツハイマー病患者の脳組織 (Wentworth et al., Science, 302, 1053-1056, 2003; Zhang et al., PNAS, 101, 4752-4757, 2004) やオゾンに曝露させたマウス肺組織 (Pulfer et al., JPharmacol Exp Ther, 312, 256-264, 2005) において検出されている。さらに、secosterol -A と B は、心筋や神経細胞に対して強い毒性やアポトーシス誘導性を有すること (Sathishkumar et al., FEBS Lett 579, 6444-6450, 2005; Free Radic Res 41, 82-88, 2007) また、amyloid や synuclein などのタンパク質と反応して凝集、異常折りたたみや線維化を誘導することが報告されている (Zhang et al., PNAS, 101, 4752-4757, 2004; Bosco et al., Nat Chem Biol 2, 249-253, 2006)。これらの結果は、炎症部位で生成するオゾン様活性酸素と生体成分の反応だけでなくコレステロールのオゾン酸

化物そのものが、動脈硬化症、認知症など様々な疾患の原因である可能性を示唆している。

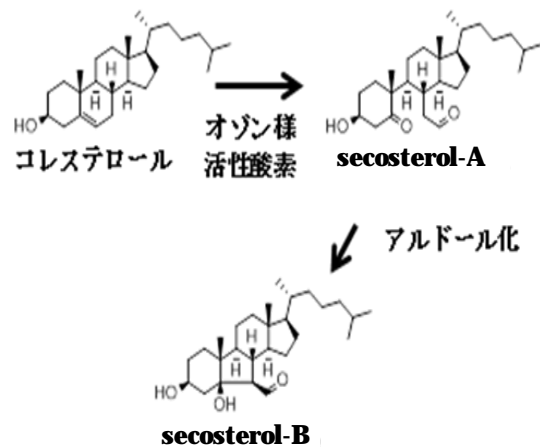


図 - 1 : オゾン様活性酸素によるコレステロールから secosterol-A と secosterol-B の生成

本研究室においては、平成 18-19 年度の特別推進研究費(基盤研究C 相当)(メタボリック症候群のバイオマーカーとしてのコレステロール炎症性酸化物の新規同定)及び平成 21 - 23 年度基盤研究 B (炎症部位におけるオゾン酸化コレステロールの生成機構の解明と生物活性、疾患への関与)の研究助成金を受けての先行研究により、secosterol-A 及び -B に関して、様々な興味ある結果を発表してきた。以下に要約する。(1) 標品や安定同位体を含む内部標準物質を合成し、dansylhydrazine (DH) や 2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) の誘導体の LC-MS/MS による高感度分析法の開発をおこなった (Tomono et al., Biochem. Biophys. Res Commun 383, 222-227, 2009; J Chromatogr. B, 879, 2802-2808, 2011)。(2) これらの分析方法を用いて、secosterol-A 及び -B が、試験管内において、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) と塩化物イオン ( $Cl^-$ ) の存在下、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の酵素反応により生成されることを見出した (Tomono et al., Biochem. Biophys. Res Commun 383, 222-227, 2009)。(3) フォルボールエステル (PMA) により活性化されたヒト好中球様分化 HL-60 細胞が、MPO 依存的に、オゾン様活性酸素を産生し、コレステロールを酸化して secosterol-A 及び B を生成すること、MPO 欠損マウスから調製した好中球は、PMA で活性化しても、secosterol-A 及び B を生成しないこと、また、野生型マウスの肝臓、肺などの組織ではリポ多糖 (LPS) 誘発炎症により secosterol 類の濃度が増加するのに対して、MPO 欠損マウスでは増加がみられないこと、さらに、secosterol-A 及び -B は、細胞内では速やかに代謝されて、アルデヒド基がカルボキシル基に酸化された代謝物 (secoA-COOH,

secoB-COOH ) 及び  $\alpha,\beta$ -unsaturated secosterol-B が新たに生成されることを見出し、それぞれの代謝物の LC-MS/MS による新規分析法を開発した (Tomono et al., J Lipid Res 52, 87-97, 2011)。しかしながら、生体内におけるオゾン様活性酸素および secosterol-A と B は、の生成機構、生物活性、疾病での役割等については、不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、オゾン酸化により生成する新規コレステロール酸化物 secosterol 類について、生体内での生成機構の解明、生物活性、疾患発症における役割に関する研究を通して、secosterol 類のメタボリック症候群・生活習慣病バイオマーカーとしての有効性を検討するものである。平成 24 年度からの 3 年間に於いて、主として、コレステロール及びエステル型コレステロールの酸化物である secosterol 類及びそれらの代謝物に関して、各種疾病モデル動物やヒトからの生体試料(血液、組織など)における存在量分析、疾病との関連、生体成分との反応及び生体機能への影響、生成予防のための食品成分の探索などについて研究を行う。

## 3. 研究の方法

標品の合成: secosterol-A と-B、それらの酸化代謝物 (secoA-COOH、secoB-COOH、 $\alpha,\beta$ -unsaturated secosterol-B) 飽和及び不飽和脂肪酸 CE をオゾン酸化した際に生成するエステル型 secosterol 類、9-oxononanyl cholesterol 及び 9 oxononanoate secosterol-A と-B 及び安定同位体を含む内部標準物質については、当研究室において合成、精製した。

secosterol 類の分析: secosterol 類は、当研究室において開発した、DH、HMP や PA 誘導体として LC-MS/MS により高感度分析する方法 (Tomono et al., Biochem. Biophys. Res Commun 383, 222-227, 2009; Tomono et al., J Chromatogr. B, 879, 2802-2808, 2011) を用いて分析した。

分析試料: 当研究室において、-80 で保存している疾病動物モデル(肥満マウス、糖尿病モデルマウス)などの血漿を用いた。

ヒトの血液試料の分析については、倫理委員会の承認を得たのち、共同研究者から提供を受けた。

secosterol 類と反応するタンパク質の同定: secosterol 類を培養細胞に添加して反応させた後、沈殿凝集したタンパク質を定法のプロテオミクス解析により、タンパク質の同定を行った。

## 4. 研究成果

生体内においては、コレステロールの多くは、コレステロール脂肪酸エステル(CE)として存在しているが、CE のオゾン酸化物に関

する報告は全くされていない。そこで、CE のオゾン酸化物の合成、構造決定、分析法の開発、細胞毒性に関して検討し、パルミチン酸コレステロール(C16:0-CE)などの飽和脂肪酸 CE のオゾン酸化により、ステロイド骨格の 5,6 位の 2 重結合が開裂したエステル型 secosterol 類が生成すること、一方、リノール酸コレステロール(C18:2-CE)及びオレイン酸コレステロール(C18:1-CE)をオゾン酸化すると、既に報告されている 9-oxononanyl cholesterol に加えて、今回新規に 9-oxononanoate secosterol-A とそのアルドール化により生成する 9-oxononanoate secosterol-B の生成されることを見出した。さらに、上記 DH 誘導体化法を用いてエステル型 secosterol-A 及び-B の分析法を確立し、健康なヒト血液(n=6)から調製した LDL を分析したところ、全試料から、10~20 pmol/LDL mg protein のエステル型 secosterol-A 及び B (遊離型 secosterol 類の 1/2~1/5 の濃度)を検出した(Miyoshi et al., Free Radic. Biol. Med., 60, 73-79, 2013)。

コレステロールのオゾン酸化で生成する secosterol-A を、仔牛血清を含む細胞培養液に添加すると、速やかに、アルドール化されて secosterol-B に変化することを見出した。このアルドール化を促進させる血清成分について検討したところ、血清中に存在する遊離アミノ酸、特にシステインに強いアルドール化促進能を見出し、システインによる secosterol-A の secosterol-B へのアルドール化促進の分子機構を新たに提唱した(投稿準備中)。

Secosterol 類は、タンパク質と共有結合して付加体を生成し、タンパク質の凝集、異常な折り畳み、繊維化などを誘導し、タンパク質を変性させることが知られている。そこで、secosterol 類により変性する細胞タンパク質の同定を試みた。ヒト白血病細胞 HL-60 から作製した細胞抽出物に、secosterol-A および-B、あるいはその他の過酸化脂質由来のアルデヒド (4-hydroxynonenal, malondialdehyde, acrolein) を添加し反応させた。不溶化したタンパク質は、SDS-PAGE で分離し、さらにプロテオミクスの方法を用いて MALDI-TOF-MS で分析した。その結果、secosterol 類を反応させたときに特異的に不溶化するタンパク質の一つとして、ankyrin repeat domain-containing protein 6 (diversin) を同定した。この diversin は、Wnt シグナル経路を抑制的に調節しているタンパク質であり、secosterol 類による diversin の変性は、発がんの促進や脳における新生ニューロンの産生阻害などの影響を及ぼす可能性がある(投稿準備中)。

secosterol 類は、強い細胞毒性を示し、慢性炎症などの強い酸化ストレス下でその存在量が著しく増加することを明らかにしてきた。

同様に、酸化ストレス下で高濃度に生成する活性酸素・窒素種は不飽和脂肪酸やアミノ酸を酸化し、多種多様なアルデヒド類を生成する。そこで、secosterol類のHPLC-MSによる分析法をさらに改良し、生体内に存在するすべてのアルデヒド・カルボニル化合物を網羅的に分析する方法を開発した(Tomono et al., J Chromatography B, 988, 149-156, 2015)。続いて、ヒト血漿中に存在するアルデヒド類の種類・濃度と大腸がん発症との関連について検討するため、開発した方法を用いて、正常及び肥満体重の健常者及び大腸がん患者の血漿(合計約40試料)についてアルデヒド類の網羅的分析を行った。現在結果を解析中である。一方、多層カーボンナノチューブは、環境発がん物質であるアスベストと同様に、肺に吸入されると、肺内で慢性炎症を引き起こし、肺がん、中皮腫などの悪性腫瘍を引き起こす可能性が危惧されている。そこで、多層カーボンナノチューブを肺内投与したラット肺試料について、カルボニル化合物を網羅的に分析解析した。多層カーボンナノチューブの投与により、未知のアルデヒドを含めて、多くのアルデヒドが肺内において生成・存在することが明らかになった。secosterol類を含むこれらのアルデヒド類は、生体成分であるタンパク質・核酸と反応して付加体を生成し、タンパク質の機能不全を誘発し、また核酸付加体は修復されないと突然変異の原因となることから、酸化ストレスに関連する生活習慣病(動脈硬化症、神経変性症、がんなど)の発症において重要な役割を演じているものと考えられる。

#### 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 9件)

Miyoshi N, Yonemochi T, Tomono S, Fukutomi R, Nakamaura Y, Ohshima H. Development and application of a method for identification of isothiocyanate-targeted molecules in colon cancer cells. *Anal. Biochem.* 429, 124-131, 2012.

Lai YL, Aoyama S, Ohata M, Otuka N, Shiokawa H, Tomono S, Fujiwara Y, Kanazawa H, Miyoshi N, Ohshima H. Dysregulation of dimethylargininemethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway in rat type II diabetic nephropathy. *J Clin. Biochem. Nutr.*, 51, 143-149, 2102.

Mabuch R, Kurita A, Miyoshi N, Yokoyama A, Furuta T, Goda T, Suwa Y, Kan T, Amagai T, Ohshima H. Analysis of N<sup>ε</sup>-ethyllysine in human plasma proteins by gas chromatography-negative ion chemical ionization spectroscopy as a biomarker for exposure to acetaldehyde and alcohol.

*Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 1013-1020, 2012.

Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H. Inhibition of endothelial- and neuronal-type, but not inducible-type, nitric oxide synthase by the oxidized cholesterol metabolite secosterol aldehyde: Implications for vascular and neurodegenerative diseases. *J Clin. Biochem. Nutr.*, 50, 84-89, 2012.

Miyoshi N, Iwasaki N, Tomono S, Higashi T, Ohshima H. Occurrence of cytotoxic 9-oxononanoyl secosterol aldehydes in human low density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 73-79, 2013.

Tomono S, Yasue Y, Miyoshi N, Ohshima H. Cytotoxic effects of secosterols and their derivatives on several cultured cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 651-653, 2013.

Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol oxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 446, 702-708, 2014.

Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H. Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. *J Chromatography B*, 988, 149-156, 2015.

Wada S, Matsushita Y, Tazawa H, Aoi W, Naito Y, Higashi H, Ohshima H, Yoshikawa T. Loss of p53 in stromal fibroblasts enhances tumor cell proliferation through nitric-oxide-mediated cyclooxygenase 2 activation. *Free Radic Res.*, 49, 269-278, 2015.

[学会発表](計 27件)

大島寛史, 伴野勸, 頼盈伶, 三好規之 オゾン酸化コレステロール:生成機構、生理活性および生活習慣病発症における役割 第65回日本酸化ストレス学会 2012年6月7-8日 徳島

三好規之, 長澤友樹, 田中卓司, 若林敬二, 大島寛史 肥満マウスモデルKK-Ayにおける山薬及びジオスゲニンの大腸発がん予防分子機構解析 がん予防学会 2012年6月22-23日 岐阜

三好規之 オゾン酸化コレステロール secosterol-A、-Bの生体内生成機構と生理活性 第4回レドックス・ライフイノベーション 第170委員会 2012年8月 栃木県那須

三好規之, 松田知成, 大島寛史 糖尿病モデルラット肝におけるDNA付加体の網羅的解析 第71回日本癌学会 2012年9月19-21日 札幌

山田雄二, 三好規之, 大島寛史 Dehydrogenase/reductase member 2 (DHRS2)におけるアセトアルデヒド修飾はMdm2との

結合絵生減少させる 第 71 回日本癌学会  
2012 年 9 月 19-21 日 札幌

米持巧、中村宣督、大島寛史、三好規之 ヒ  
トがん細胞におけるイソチオシアネート結  
合分子の網羅的解析 第 17 回日本フードフ  
ァクター学会 2012 年 11 月 10-11 日 静岡

平田隼、三好規之、新井英一、大島寛史 ジ  
オスゲニンおよび山薬による食後高トリグ  
リセライド血症の抑制効果 第 17 回日本フ  
ードファクター学会 2012 年 11 月 10-11 日  
静岡

Ohshima H, Nagasawa T, Asai N, Miyoshi  
N, Wakabayashi K, Tanaka T.  
Chemoprevention of mouse colon  
carcinogenesis by Japanese yams and their  
phytosterols. The 1<sup>st</sup> International  
Conference of Pharma-Food, 15-16 November,  
2012, Shizuoka

馬淵良太、三好規之、横山顕、諏訪芳秀、  
栗木清典、合田敏尚、雨谷敬史、大島寛史 飲  
酒およびアセトアルデヒド曝露のバイオマ  
ーカーとしてのタンパク質中 N<sup>ε</sup>-エチルリ  
ジンの有用性 第 41 回日本環境変異原学会  
2012 年 11 月 29-30 日 静岡

三好規之、米持巧、伴野勤、中村宣督、大  
島寛史 がん予防食品因子イソチオシアネ  
ート結合タンパク質の網羅的探索法 第 85  
回日本生化学会 2012 年 12 月 14-16 日 博  
多

伴野勤、村田晴美、大畑美幸、三好規之、  
大島寛史 LC-ESI-MS/MS を用いた脂質過酸  
化物由来アルデヒド化合物の網羅的解析法  
の開発 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月  
14-16 日 博多

長澤美沙、伴野勤、三好規之、大島寛史 神  
経細胞様分化 PC-12 への amyloid-β 曝露に  
よって生成されるアルデヒド類の網羅的解  
析 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11-13  
日 横浜

伴野勤、長澤美沙、村田晴美、真田俊介、  
三好規之、大島寛史 LC-ESI-MS/MS による肥  
満・糖尿病モデルマウス (ob/ob) 血漿中ア  
ルデヒドの網羅的解析 第 86 回日本生化学  
会 2013 年 9 月 11-13 日 横浜

Miyoshi N, Tomono S, Ohshima H.  
Cholesterol aldehydes: The mechanism of  
their formation and pathological roles in  
oxidative stress related disorders. The 3<sup>rd</sup>  
European Network for Oxysterol Research  
19-20 September, 2013, Swansea, UK

Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H.  
Comprehensive analytical method for  
lipophilic reactive carbonyl compounds in  
biological samples. 23-25, September,  
2013, Athene Greece.

真田俊介、蛭川頌子、大島寛史、三好規之  
ob/ob マウス糞便抽出物の分析によるメタボ  
リック症候群新規診断バイオマーカーの探  
索 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年  
3 月 仙台

蛭川頌子、真田俊介、大島寛史、三好規之  
飲酒によって変動するマウス糞便中化合物  
の探索 日本農芸化学会 2013 年度大会  
2013 年 3 月 仙台

三好規之、平田隼、新井英一、大島寛史 食  
後の血中脂質に対するヤムイモおよびその  
含有成分ジオスゲニンの効果 日本農芸化  
学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 仙台

坂野太研、三好規之、池本裕之、今井伸二  
郎、大島寛史 青大豆に含まれる植物ホルモ  
ン様ペプチド leginsulin の解析 第 17 回日  
本フードファクター学会 2013 年 11 月 東京

三好規之、佐々木香、三浦信司、大島寛史  
KK-Ay マウスにおける山薬および有効成分ジ  
オスゲニンの血中トリグリセライド低下作  
用 日本農芸化学会 2014 2014 年 3 月 東  
京

坂野太研、伴野勤、大島寛史、三好規之 植  
物ホルモン様ペプチド leginsulin の動物細  
胞に対する機能性解析 日本農芸化学会  
2014 2014 年 3 月 東京

真田俊介、大島寛史、三好規之 ob/ob マウ  
ス糞便に含まれる起炎症性分子の探索 日本  
農芸化学会 2014 2014 年 3 月 東京

伴野勤、三好規之、徐結荀、津田洋幸、大  
島寛史 多層ナノチューブ肺内投与によっ  
て生じる活性カルボニル化合物の網羅的解  
析 第 67 回日本酸化ストレス学会 2014 年  
09 月 4-5 日、京都

大石美月、大島寛史、三好規之  
Lipopolysaccharide 構成分子 lipid A の  
LC-MS 分析 第 87 回日本生化学会大会 2014  
年 10 月 京都

坂野太研、大島寛史、三好規之 大豆ペプ  
チド leginsulin ホモログの発現分布解析  
とインスリン様活性 第 19 回日本フードフ  
ァクター学会 2014 年 11 月 鹿児島

大石美月、吉川悠子、大島寛史、三好規之  
グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の  
LC-MS 分析法の確立 日本農芸化学会 2015  
2015 年 3 月 岡山

三好規之 食品成分と内因性分子による  
生活習慣病の促進メカニズムと予防に關す  
る生物化学分析 日本農芸化学会 2015  
2015 年 3 月 岡山

〔図書〕(計 3 件)

永井竜児・大島寛史 編著 「基礎生化学  
Biochemistry-健康・疾病とのつながり」ア  
イ・ケイコーポレーション

Hiraku Y, Kawanishi S, Ohshima H  
CANCER AND INFLAMMATION MECHANISMS  
Chemical, Biological and Clinical Aspects  
John Wiley & Sons, 2014

大島寛史、三好規之、伴野勤  
酸化ストレスの医学 pp385-395 診断と治療  
社 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://sfns-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島寛史 (OHSHIMA HIROSHI)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：80433209

### (2) 研究分担者

三好規之 (MIYOSHI NORIYUKI)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教  
研究者番号：70438191

合田敏尚 (GODA TOSHINAO)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：70195923

伴野勸 (TOMONO SUSUMU)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・客員研究員  
研究者番号：60554011

糠谷春雄 (MIYOSHI NORIYUKI)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・客員教授  
研究者番号：00094342