

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500969

研究課題名(和文)ポリフェノールによるコレステロール消化管吸収抑制機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of the effect of polyphenols on the inhibition of intestinal cholesterol transport and for their clinical applications

研究代表者

小林 彰子 (Kobayashi, Shoko)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90348144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管に発現するコレステロールトランスポーター(Niemann-pick C1 Like 1, NPC1L1)を阻害するポリフェノールをスクリーニングし、その阻害機構を明らかにすることを目的とした。小腸上皮吸収モデル細胞であるCaco-2におけるコレステロールの輸送性を速度論的に解析し、スクリーニングによりルテオリンとケルセチンを選抜した。NPC1L1強制発現HEK293T細胞においてもこれらのフラボノイドはコレステロールの輸送を阻害した。ラットを用いたin vivo試験においても、これらのフラボノイドはコレステロール摂餌に起因する血中コレステロールの上昇を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Niemann-pick C1-Like 1 (NPC1L1) mediates cholesterol absorption, and ezetimibe is a potent NPC1L1 inhibitor applicable for medication of hypercholesterolemia. Epidemiological studies demonstrated that consumption of polyphenols correlates with a decreased risk for atherosclerosis, and we hypothesized that polyphenols inhibit intestinal transport of cholesterol. We elucidated the kinetic parameters of intestinal cholesterol absorption using Caco-2 cells and screened 34 polyphenols. Luteolin and quercetin inhibited cholesterol absorption by Caco-2 cells and human embryonic kidney 293T cells expressing NPC1L1. Serum cholesterol levels significantly decreased more in rats fed both cholesterol and luteolin (or quercetin), than in those observed in the cholesterol feeding group. These results suggest that luteolin and quercetin reduce high blood cholesterol levels by specifically inhibiting intestinal cholesterol absorption mediated by NPC1L1.

研究分野：食生活学

キーワード：コレステロールトランスポーター ルテオリン ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

近年、先進諸国において高コレステロール血症患者が増加している。コレステロールは生体にとって必要不可欠な成分であるが、高コレステロール血症は、アテローム性動脈硬化や心筋梗塞に繋がる。現在、日本人の死因の約 26.5% は動脈硬化が原因となる心疾患および脳血管疾患であり (厚生労働省, 21 年度人口動態統計年報) これらの疾患予防の観点から高コレステロール血症の予防は急務とされている。

血中コレステロール濃度は、腸管吸収、肝臓での合成、および体内循環系によって保たれている。近年高コレステロール血症治療薬として新たに開発されたエゼチミブは、腸管に発現するコレステロールトランスポーター (Niemann-pick C1 Like 1, NPC1L1) を特異的に阻害する医薬品であり、肝臓におけるコレステロール合成律速酵素の阻害剤 (スタチン系薬物) との併用により高い効果を発揮する。小腸におけるコレステロールは、食事由来コレステロール (約 250~500mg/日) と食後小腸へと排出される胆汁由来コレステロール (約 1,000mg/日) の総和であり、肝臓から腸管へ胆汁として排泄されたコレステロールの吸収を抑制することは体内コレステロール量の減少に繋がる。NPC1L1 はヒトでは小腸上皮細胞と肝細胞の頂端膜側に発現しており、クラスリン依存型でエンドサイトーシスされると報告されているが、その取り込み機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

エゼチミブは医薬品であるため、高コレステロール血症の患者に処方される。日々摂取する食品により腸管からのコレステロール吸収を阻害することができれば、高コレステロール血症の予防、ひいては動脈硬化や心筋梗塞の予防が期待できる。ポリフェノールには、フレンチパラドックスのような動脈硬化予防効果が示唆されているため、我々は予備検討としてポリフェノールをスクリーニングしたところ、数種のポリフェノールがヒト腸管上皮モデル細胞 Caco-2 においてコレステロールの取り込みを有意に阻害した。

本研究では、Caco-2 細胞を用いて腸管における詳細なコレステロール取り込み機構を明らかにした上で、同様の系を用いてポリフェノールを広くスクリーニングし、新たなコレステロール吸収阻害成分を同定すること、およびその詳細な阻害機構を明らかにすると共に臨床応用に繋げるために *in vivo* における効果を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小腸におけるコレステロール吸収機構の速度論的解析

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞および $[^3\text{H}]$ コレステロールを用いてコレステロールの輸

送性解析を行った。実際の消化管での存在形態をシミュレートしてホスファチジルコリンおよびタウロコール酸と共にミセル化させた $[^3\text{H}]$ コレステロールを Caco-2 細胞に添加し、一定時間インキュベート後、液体シンチレーションカウンタで細胞内取り込み量を測定した。経時的、濃度依存的、温度依存的検討により、 J_{max} 、 K_t 、 k_d 等の速度論的パラメータを算出した。

(2) コレステロール腸管吸収阻害成分の探索

Caco-2 を用いた上記 (1) と同様の取り込み試験により 34 種のポリフェノールをスクリーニングした。

(3) ポリフェノールのコレステロール腸管吸収阻害メカニズムの解析

(2) のスクリーニング時は、Caco-2 細胞をポリフェノールとプレインキュベーションした後に、ポリフェノール存在下で取り込み試験を行ったため、ポリフェノールの作用する側がコレステロールミセルか細胞側であるか不明であった。そこで Caco-2 細胞とポリフェノールをプレインキュベートした後にポリフェノールを除いた状態でコレステロール取り込み試験を実施した。またポリフェノールが NPC1L1 に与える影響を確認するため、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に *hNPC1L1* を一過的に導入した NPC1L1 強制発現細胞を作製し、ポリフェノール添加時の細胞内コレステロール取り込み量を測定した。

(4) ラットにおけるポリフェノールの高コレステロール血症改善効果

7 週齢 Wistar 雄性ラットを 4 群に分け、正常食群 (AIN93G、NC)、0.5% 高コレステロール食群 (HC)、および高コレステロール食にルテオリン (HL) またはケルセチン (HQ) を胃ゾンデによって経口投与する群を 9 日間飼育した。0、6、および 9 日目に尾採血を行い、血中コレステロール濃度を測定した。

(5) ポリフェノールが NPC1L1 発現に与える影響

(4) の動物実験の解剖で得られたラットの十二指腸の上皮から total RNA を抽出し、NPC1L1 の mRNA 発現量を qRT-PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) 小腸におけるコレステロール吸収機構の速度論的解析

Caco-2 におけるコレステロールの取り込みは経時的な直線増加を示し (図 1A)、濃度依存的な飽和性を示した (図 1B)。また、Eadie-Hofstee plot により輸送は一相性を示し (図 1C)、顕著な温度依存性 (図 1D)、および NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブの処理

により顕著な取り込み抑制がみられたことから (図 1E)、小腸におけるコレステロール吸収には NPC1L1 の寄与が高いことが示唆された。

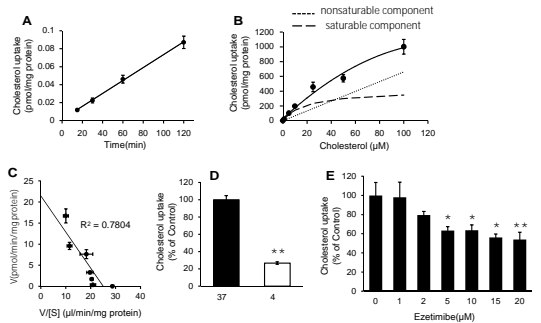


図 1. Caco-2 におけるコレステロール吸収機構の解析. A, 時間依存性; B, 濃度依存性; C, Eadie-Hofstee plot; D, 温度依存性 E, エゼチミブによる阻害効果.

(2) コレステロール腸管吸収阻害成分の探索

スクリーニングの結果、11種のフラボノイドが有意にコレステロール吸収を阻害した。中でも阻害活性が高く、かつ含まれる食品が多様な、ルテオリン (フラボン) とケルセチン (フラボノール) を選抜した (図 2)。これらのフラボノイドの阻害効果は添加後 120 分まで有意に持続した (図 3)。

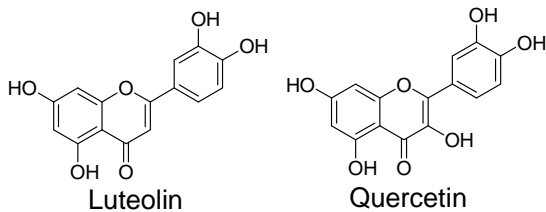


図 2. 活性成分の化学構造式.

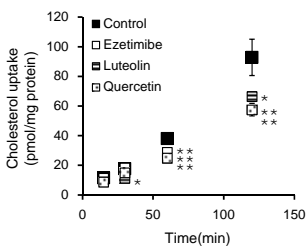


図 3. ルテオリン、ケルセチン、およびエゼチミブの阻害持続性試験.

(3) ルテオリンおよびケルセチンのコレステロール腸管吸収阻害メカニズムの解析

Caco-2 細胞とルテオリンおよびケルセチンをプレインキュベートした後にこれらのフラボノイドを除いた状態でコレステロール取り込み試験を行ったところ、取り込みはフラボノイド濃度依存的に抑制され、小腸上皮に作用しコレステロール吸収を調節する

ことが示された (図 4)。NPC1L1 強制発現細胞を用いた検討では、フラボノイドの添加によりコレステロールの取り込みは Mock 細胞と同レベルまで抑制された (図 5)。以上より、ルテオリンとケルセチンは小腸上皮の NPC1L1 輸送機構を阻害することにより腸管のコレステロール吸収を阻害することが示された。

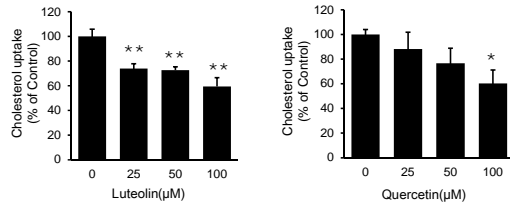


図 4. 細胞とのインキュベーションによるケルセチンおよびルテオリンの抑制効果.

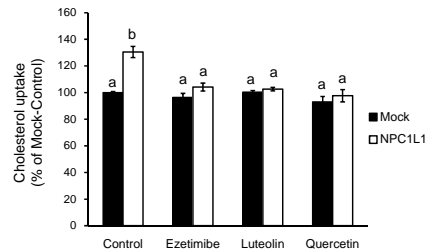


図 5. NPC1L1 強制発現細胞におけるルテオリンおよびケルセチンの効果.

(4) ラットにおけるルテオリンおよびケルセチンの高コレステロール血症改善効果

血中コレステロール濃度は HC 群において 9 日目で C 群に比べて有意に上昇したのに対し、HL および HQ 群では NC 群と同等にまで血中コレステロールの上昇を抑制した (図 6)。

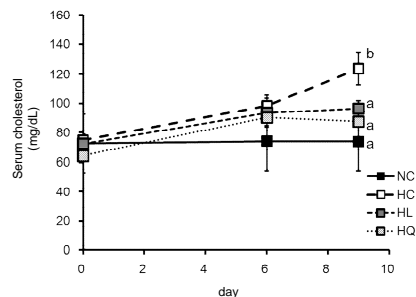


図 6. ラットを用いた in vivo 試験におけるルテオリンおよびケルセチンの効果.

(5) ルテオリンおよびケルセチンが NPC1L1 発現に与える影響

動物実験での腸管上皮における NPC1L1 の mRNA 発現量は、NC 群に対し HC 群で上昇傾向を示し、HQ 群で有意な減少、HL 群で低下傾向がみられた。これにより、ルテオリン及びケルセチンの in vivo における血中コレステロール低下作用のメカニズムの 1 つとして、

NPC1L1 発現抑制が示唆された。

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 5 件)

- 1) Tamura T, Ozawa M, Kobayashi S, Watanabe H, Arai S, Mura K. Inhibitory effect of oligomeric polyphenols from peanut-skin on sugar digestion enzymes and glucose transport. *Food Sci Technol Res*. 査読有 (2015) 21, 111-115. doi:http://doi.org/10.3136/foodstr.21.111
- 2) Kobayashi S, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K. Anti-allergenic Activity of Polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *J Funct Foods*. 査読有 (2015) 13, 100-107. doi: 10.1016/j.jff.2014.12.029
- 3) Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K, Kobayashi S. Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats. *PLoS One* 査読有 (2014) 23;9(5), e97901. doi: 10.1371/journal.pone.0097901
- 4) Kobayashi S, Shinohara M, Nagai T, Konishi Y. Transport mechanisms for soy isoflavones and microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes. *Biosci Biotechnol Biochem* 査読有 (2013) 77 (11) 2210-2217. doi: http://doi.org/10.1271/bbb.130404
- 5) Idota Y, Harada H, Tomono T, Morimoto K, Kobayashi S, Kakinuma C, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T. Alginate enhances excretion and reduces absorption of strontium and cesium in rats. *Biol Pharm Bull* 査読有 (2013) 36(3):485-491. http://doi.org/10.1248/bpb.b12-00899

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 穴戸 駿, 豊田 集, 瀧口 毅, 篠原もえ子, 小野賢二郎, 山田正仁, 阿部啓子, 小林彰子. Tg2576 マウスにおけるロスマリン酸による脳内 A 凝集抑制効果のトランスクリプトミクスによる解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015/3/29, 岡山大学.

- 2) 小川真奈, 山梨義英, 高田龍平, 阿部啓子, 小林彰子. フラボノイドがコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015/3/28, 岡山大学.
- 3) 鈴木千尋, 安岡顕人, 近藤 隆, 石井剛志, 阿部啓子, 小林彰子. 大豆イソフラボンの腸管輸送因子の探索, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015/3/28, 岡山大学.
- 4) 石井剛志, 竹内由紀, 安井美奈, 保田倫子, 下位香代子, 小林彰子, 越阪部奈緒美, 中山 勉. テアフラビン類の難吸収性に影響する因子の解析, 第 11 回日本カテキン学会年次学術大会, 2014/11/22, 昭和大学.
- 5) 石井剛志, 竹内由紀, 安井美奈, 小林彰子, 保田倫子, 下位香代子, 越阪部奈緒美, 中山 勉. テアフラビン類の脂質膜における分子挙動, 第 19 回日本フードファクター学会, 2014/11/9, 鹿児島大学.
- 6) 横山 博, 鈴木 淳, 船隈奈緒子, 小林彰子. クロマグロの筋肉寄生ムツボシクドアの毒性試験, 日本食品微生物学会, 2014/9/19, 大阪府立大学.
- 7) 小林彰子. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, シンポジウム「食事脂質と栄養機能に関する研究のトピックス」コレステロールの腸管吸収機構とポリフェノールによるその制御」2014/6/1. 招待講演, 酪農学園大学.
- 8) 多田篤生, 小川真奈, 加藤久典, 小林彰子. コレステロール酸化物(COP)がラットの代謝に与える影響, 日本農芸化学会, 2014/03/28, 明治大学.
- 9) 小川真奈, 高田龍平, 阿部啓子, 小林彰子. フラボノイドが胆汁酸およびコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響, 日本農芸化学会, 2014/03/29, 明治大学.
- 10) 小林彰子. 植物色素研究会第 25 回集会「フラボノイドによるコレステロール腸管吸収阻害」2013/11/17. 招待講演, つくば市.
- 11) 猫橋茉莉, 小川真奈, 中澤京子, 加藤久典, 三坂巧, 荻原琢男, 阿部啓子, 小林彰子. フラボノイドのコレステロール腸管吸収阻害機構の解析, 日本農芸化学会, 2013/03/27, 東北大学.

12) 小川真奈, 猫橋茉莉, 中澤京子, 加藤久典, 荻原琢男, 阿部啓子, 小林彰子. フラボノイドの胆汁酸腸管再吸収阻害機構の解析, 日本農芸化学会, 2013/03/27, 東北大学.

13) 鈴木千尋, 勝山真多, 中井雄治, 阿部啓子, 小林彰子. 多継代 Caco-2 のトランスクリプトミクスによる形質変化解析, 日本農芸化学会, 2013/03/27, 東北大学.

14) 小林彰子. 第 91 回 日本栄養・食糧学会 関東支部大会 シンポジウム「腸管吸収研究の最近の話題」「ポリフェノールの腸管吸収および栄養食品成分吸収との相互作用」2013 年 2 月 16 日. 招待講演, 東京大学.

〔図書〕(計 1 件)

1) 小林彰子. 骨の健康・骨粗鬆症予防成分 / 活性酸素と抗酸化成分, わかりやすい食品機能学(森田英利・田辺創一 編), p44-51 / p65-67, 三共出版 (2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 小林 彰子 (KOBAYASHI, Shoko)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90348144

(2) 研究分担者 石丸 喜朗 (ISHIMARU, Yoshiro)

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号: 10451840

(3) 連携研究者 なし