

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32618

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650503

研究課題名(和文)機能性栄養素のアポ蛋白B48転写、合成、代謝に与える影響

研究課題名(英文)Effects of functional nutrients on the transcription, synthesis and metabolism of apolipoprotein B-48.

研究代表者

松島 照彦(Matsushima, Teruhiko)

実践女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：60199792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心血管リスク食後高脂血症の要素であるカイロミクロンについて、申請者らが樹立開発したApoB48モノクローナル抗体およびELISAを用いて研究を行った。ヒト腸管培養細胞系Caco-2を用いて極性培養し、脂質ミセルおよび食品成分を加えてカイロミクロンapoB48等の分泌を測定した。Curcumin, resveratrol, genisteinの添加により濃度依存性にapoB48分泌の抑制が見られ、一方、resveratrol, genisteinではトリグリセライドの分泌も抑制見られず、カイロミクロン粒子数の減少を反映していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the effects of food ingredients on chylomicron metabolism, which leads to postprandial hyperlipidemia a potent risk factor of cardiovascular diseases, we investigated the secretion of chylomicron triglyceride and apoB48, for which we have developed monoclonal ELISA, from human intestinal cell Caco-2.

研究分野：脂質代謝学、動脈硬化学

キーワード：apolipoprotein B48 intestine cell culture transcription APOBEC1 curcumin genistein resveratrol

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化発症の重要な因子である食後高脂血症の研究において、食事由来の腸管リポタンパクであるカイロミクロン (CM) の分泌・代謝の分析は重要である。CM の分析には必要な apolipoprotein (Apo) B-48 の測定が必要であるが、ApoB-48 は ApoB-100 と共通の遺伝子から翻訳される部分ペプチドである共通の遺伝子からなるため、単独で測定することは難しいと考えられてきた。しかし 1997 年我々は ApoB-48 の C 末端の合成 peptide を用いて ApoB-48 特異的モノクローナル抗体を作成し、ApoB-100 を認識しない抗体が樹立された。これによりを用いて Kinoshita らが ELISA 法として確立され開発し、ApoB-48 の定量測定が可能となった。

2. 研究の目的

種々の食品成分について脂質代謝や動脈硬化抑制への影響が推定されているが、ApoB-48 の分泌を検討した報告は少なく、ELISA 法を用いた報告はこれまでに研究はほとんどない。CM 分泌抑制を通じて動脈硬化予防に効果がある食品成分の探索をすることを目的として、本研究では、極性培養において吸収上皮様としての性質を示すヒト腸管細胞株 Caco-2 を用いて、食品成分が CM、ApoB48 および脂質代謝に関連した遺伝子に与える影響を検討することとした。

3. 研究の方法

多孔膜メンブレンをもつ二重底ディッシュにてヒト大腸癌由来の腸管細胞株 Caco-2 の極性培養の実験を行い、胆汁酸を加えて超音波処理した脂質ミセルを上部漕 (apical side) に添加し腸管細胞に吸収させ、その結果下部漕 (basal side) に分泌される CM カイロミクロンの ApoB-48 の定量を行った。脂質代謝に影響があると関心を集めてことが示唆されているスパイス成分、食品成分を中心とした網羅的検索の結果よりを行い、さらにワインポリフェノールの成分である resveratrol (Res)、大豆イソフラボンの成分である genistein (Gen)、ウコン (ターメリック) の成分の curcumin (Cur) の三成分についてさらに ApoB-48 分泌への濃度依存性を検討した。併せて、ApoB-100、ApoA-I、トリグリセライド (以下 TG) の定量を行った。また、Caco-2 細胞の遺伝子 (*apob*、*apobec1*、*a1cf*) を測定し、アポリポ蛋白遺伝子の転写発現について検討した。

1) 細胞の培養と二重底培養ディッシュへの播種

ヒト大腸癌細胞由来 Caco-2 細胞 (Passage number 43、理研バイオリソースセンターより譲渡 (RCB 0988)) は DMEM: ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」 (日本製薬株式会社) 10% ウシ胎児血清 (FBS、GIBCO) 10% NaHCO₃、0.5% Penicillin Streptomycin (GIBCO) を用いて、CO₂ インキュベーター (37、5% CO₂、95% 湿度) で培養した。セミコンフルエントになった細胞に適量の

0.05% トリプシンを用いて添加後、37、約 5 分間のインキュベートにより剥離し、DMEM を添加後回収し、血球計数盤で細胞を数え細胞培養 90mm ディッシュに細胞懸濁液 2 ~ 5 × 10⁵ cells/ml となるように DMEM を加えて播種し、継代再び培養した。継代を繰り返して数日間 CO₂ インキュベーターで培養した後、多孔性メンブレンフィルター付きの二重底培養ディッシュ (6well plate、24mm insert polycarbonate membrane、多孔膜ポア半径 0.4μm、Costar) の basal side 下部漕下部槽に DMEM (FBS+) 2.6ml 分注した後、上部漕 apical side に細胞懸濁液 (3 × 10⁶ cells/ml) を 1.5ml 濃厚播種し 3 週間培養した。二重底培養ディッシュに播種する細胞懸濁液は DMEM (FBS-) を使用して調整した。電気抵抗測定装置 (Millicell ERS-2、MILLI PORE) を用いて、Caco-2 細胞単層膜の電気抵抗を測定し、十分な単層膜の形成を確認した。本実験では電気抵抗値は約 800 · cm² を基準とした。

2) 脂質ミセルの作成

100mM オレイン酸 9μl/well、25mM コレステロール 3μl/well、100mM 2 モノオレイルグリセロール、100mM フォスファチジルコリン 3μl/well、100mM リゾフォスファチジルコリン 3μl/well を必要な well 数の分量、滅菌処理した試験管内で混合し窒素下で乾燥した。DMEM (FBS-) を溶媒とし調整した胆汁酸 (24mM タウロコール酸: taurocholic acid sodium salt hydrate, SigmaUltra、C₂₆H₄₄NNaO₇S × H₂O) を 12μl/1well 分注し 10 分間超音波処理する。さらに 1well 当たり 1.5ml の DMEM (FBS-) を分注し、1 分間超音波処理し脂質ミセルを作成した。

3) 添加する食品成分の調製

Res (>99%、C₁₄H₁₂O₃、FW 228、SIGMA)、Gen (98%、C₁₅H₁₀O₅、FW 270.24)、Cur (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione、C₁₂H₂₀O₆、FW 368.38 SIGMA) の 3 成分で、添加する濃度を各々 20μM、80 μM、140 μM、200 μM とした。3 成分とも、dimethyl sulphoxide (DMSO) HYBRI-MAX (C₂H₆OS、FW 78.13、SIGMA) を溶媒として溶液を調整した。

4) 脂質ミセルと食品成分の添加、下部漕 basal side 培地の回収

1) において Caco-2 細胞単層膜の十分な形成を確認した二重底培養ディッシュの下部漕 basal side の DMEM (FBS+) を交換し、apical side 上部漕に 2) で調整した脂質ミセル入り DMEM (FBS-) 1.5ml を分注した後、3) で調整した食品物質の溶液を上部漕 apical side に各々 1.5μl 添加した。40 時間後に下部漕 basal side 培地を回収した。

5) ApoB-48 の測定

回収した下部漕 basal side 培地中の ApoB-48 を緩衝液で 10 倍希釈して サンドイッチ酵素免疫測定法 (Human ApoB-48 ELISA KIT (AKHB48J, Shibayagi, Gunma, Japan)) を

用いて、サンドイッチ酵素免疫測定法で測定した。測定後希釈倍率 10 を掛けて算出した。

6) トリグリセライド (TG) の測定

回収した下部漕 basal side 培地 2ml に 0.9% 生理食塩水 2ml を重層し、20,000 回転/分、30 分間の条件で超遠心処理分離 (Micro Ultracentrifuge CS150NX, HITACHI) した後、上澄み浮遊したカイロミクロン層を約 0.5ml 採取した。超遠心後採取した basal side 培地分画中の TG をトリグリセライドキットグリセロール-3-リン酸オキシターゼを用いた酵素法「トリグリセライド E-テストワコー」(GPO・DAOS 法) を用いて測定した。測定操作については kit のプロトコールに従って行ったが、検体量、発色試薬量は記載の 1/5 量で行った。測定後、測定した数値を以下の数式 (測定結果 × カイロミクロン分画後採取量 / 超遠心前培地量) で超遠心処理前の培地濃度に補正した。

TG 測定用に回収した basal side 培地は 2%NaN₃ (sodium azide)、100mM PMSF (phenyl methylsulfony fluoride) を各々培地あたり 1/100 量添加して、超遠心処理まで冷蔵保存した。

7) ApoB-100 の測定

Human ApoB-100 Assay Kit-IBL 96Well (Immuno-Biological Laboratories) を用いて、回収した basal side 培地中の ApoB-100 をサンドイッチ法による ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) で測定した。

8) ApoA-I の測定

回収した basal side 培地を 100 倍希釈し、ApoA-I を ELISA^{PRO} kit for Human apoA1 を用いて測定した。測定操作については kit のプロトコールに従って行った。測定後、100 倍して補正した。

9) 遺伝子測定

(1) 細胞の mRNA の抽出

回収した細胞を RNeasyPlus Mini Kit (50) (キアゲン) と QIAshredderTM (50) (キアゲン) を用いて mRNA を抽出した。

(2) cDNA の合成

抽出した mRNA 9 μ l (up to 9 μ l、または Nuclease-free を加え 9 μ l に調整) に 2 × RT Buffer Mix 10.0 μ l、20 × RT Enzyme Mix 1.0 μ l (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems) を加え混合し、Total per Reaction を 20.0 μ l とした。37 °C で 1 時間インキュベートし 95 °C で 5 分間加熱し反応を停止した。

(3) real-time PCR (polymerase chain reaction) による遺伝子測定

作成した cDNA を ABI PRISM7000 (Applied Bio systems) を用いて増幅させ定量し、 β -アクチンを内在コントロールとして $\Delta\Delta C_t$ 法により解析を行った。

4. 研究成果

Res, Gen, Cur の 3 成分とも濃度依存的に ApoB-48 の分泌が減少した (Fig.1) が、TG 分泌では micelle のみに比べ Cur の 140 μ M、

200 μ M において顕著な減少がみられた (Fig.2)。

TG と ApoB-48 の比では Res と Gen の添加で濃度依存的に増加した (data not shown)。3 成分のいずれの添加においても ApoB-100 の分泌は見られなかった。ApoA-I の分泌においては Res と Gen の添加で若干の濃度依存的な減少がみられ、Cur の添加では顕著な濃度依存的な減少が見られた (data not shown)。

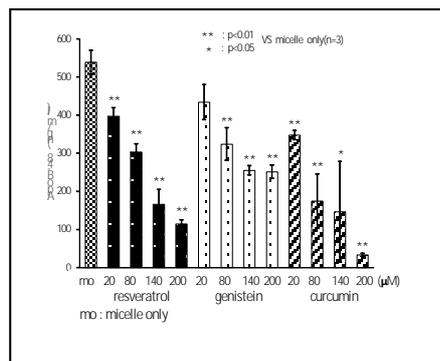


Fig.1 Resveratrol, genistein, curcumin が apoB48 分泌に与える影響の濃度依存性の検討 .

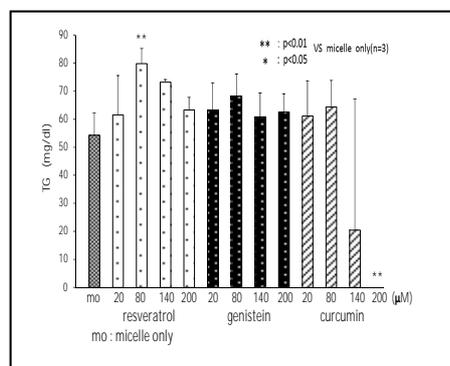


Fig.2 Resveratrol, genistein, curcumin がトリグリセライド分泌に与える影響の濃度依存性の検討 .

遺伝子の測定では *apob* (アポ蛋白 B)、*apobec1* (シチジンデアミナーゼ)、*alcf* (APOBEC1 相補因子 *apobec-1* complementation factor) の発現において三成分とも micelle のみ only に比べ減少が見られた (Fig.3, Fig.4, Fig.5)。そのうち、*apob* の Res, Gen と *apobec1* の Cur の以外の成分添加で減少に濃度依存性が見られた。

ApoB-48 は CM 粒子に対して 1 分子存在しているため、ApoB-48 の減少は CM の粒子数の減少を反映していると考えられる。Res と Gen 添加で TG の分泌量に変化がないことから、両者の添加により分泌される CM は、粒子数が減少する一方でサイズが大型化していると考えられる。

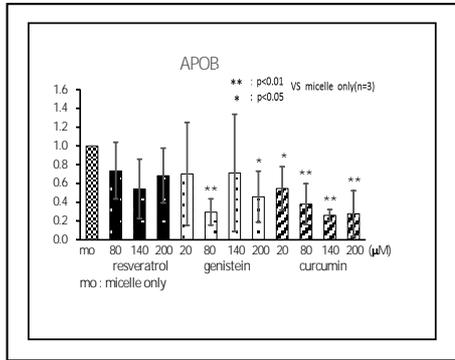


Fig.3 Resveratrol, genistein, curcumin が apob 遺伝子発現に与える影響の濃度依存性の検討 .

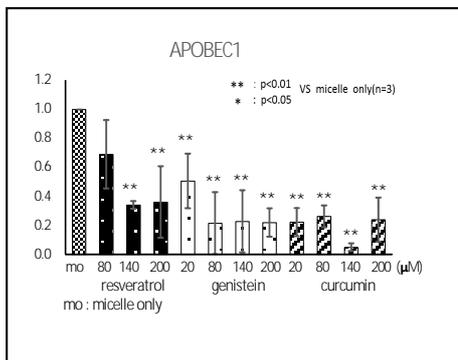


Fig.4 Resveratrol, genistein, curcumin が apobec1 遺伝子発現に与える影響の濃度依存性の検討 .

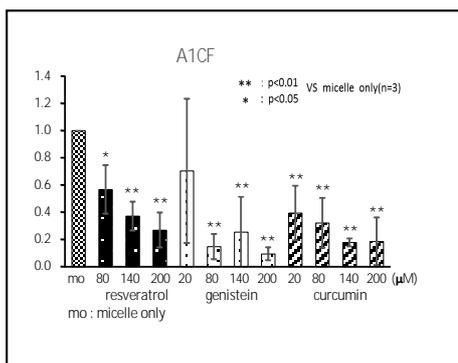


Fig.5 Resveratrol, genistein, curcumin が a1cf 遺伝子発現に与える影響の濃度依存性の検討 .

CM は 1 粒子当たりのサイズが大型化しても、体内では、リポ蛋白リパーゼの活性が正常であれば、カイロミクロントリグリセライドの水解は、非飽和的に進行すると考えられるので、水解の後は、サイズが正常の、少数のカイロミクロンレムナント粒子が産生されると考えられる。カイロミクロンレムナントは粒子状のアポ蛋白 E を介して肝臓のレムナント受容体に結合し、通常、速やかに代謝されるが、代謝が遅滞して粒子数が増える

と、動脈内膜のマクローファージの B48 受容体に結合し、コレステロール蓄積の要因となることが知られている。これらの食品成分は、カイロミクロンレムナント粒子数の減少を介し動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆された。一方 ApoA-I 分泌では Cur の添加において濃度依存的減少が見られたが、その減少の細胞生物学的機序や個体に対する影響は明らかではない。

ApoB-48 分泌の減少については遺伝子の解析より Res、Gen、Cur の添加による遺伝子 *apob* の減少とさらに *apob* を B48mRNA に編集する転換酵素 APOBEC の減少によるものと考えられるが、ApoB-48 の濃度依存的減少を説明するには十分ではない。APOBEC は単独では十分な ApoB48 mRNA 編集活性をもたず、効率的な編集には APOBEC1 相補因子 A1CF の結合を必要とする。*a1cf* の発現には濃度依存的な減少がみられ(Fig.7)、ApoB-48 の分泌の濃度依存的減少は *a1cf* の発現の濃度依存的減少を反映するものと考えられる。

本研究の結果は、Res、Gen、Cur の食品 3 成分が培養細胞における ApoB48 の分泌を減少させ、またそれが遺伝子転写レベルで ApoB-48 の産生を抑制していることを明らかにしたものである。今後、組織、動物や人体などの個体でのさらなる検証が期待されると共に、これらの成分が食事性高脂血症による動脈硬化に対し抑制的に作用する可能性が示唆されるところである。

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 1 件)

培養腸管細胞からのカイロミクロン ApoB-48 の合成、分泌に対し curcumin が与える影響. 富重慶子, 中川靖枝, 細川優, 松島照彦. 日本臨床栄養学雑誌 第 37 巻 (採択済み)

〔 学会発表 〕 (計 2 件)

1) 培養腸管細胞におけるカイロミクロン ApoB-48 の分泌に対し栄養素、食品成分等が与える影響の検討. 富重慶子, 松島照彦. The 4th International Symposium on Chylomicron Diseases. (2014.3, 東京)

2) Effects of spice ingredients on apolipoprotein B48 secretion by Caco-2 intestinal cell line. Tomishige K, Minato A, Nakagawa Y, Matsushima T. The 20th International Congress of Nutrition. (2013.9. Granada, Spain)

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島照彦 (MATSUSHIMA Teruhiko)
実践女子大学 生活科学部・教授
研究者番号：60199792

(2) 研究分担者 なし