

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660100

研究課題名(和文)ポリフェノールの媒介する新規コレステロール代謝調節系の分子レベルでの解明と応用

研究課題名(英文)The clarification and application of a novel regulatory mechanism of cholesterol metabolism mediated by polyphenols.

研究代表者

長岡 利(Nagaoka, Satoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50202221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大変興味深いことに、HepG2細胞において、3、6、12、18時間のEGCG処理は、劇的な細胞外PCSK9 mRNAレベルの低下を誘導した。24時間のEGCG処理はLDL受容体の活性化を伴って、細胞外PCSK9レベルの有意な低下を誘導した。EGCGによるLDL受容体mRNAレベルの増加はERKまたはp38経路を介して起こる。我々は初めて、EGCGはLDL受容体の増加に伴って、PCSK9の減少を誘導することを発見した。EGCGによるLDL受容体の活性化やPCSK9レベルの低下はアネキシンA2と一部関連する。

研究成果の概要(英文)：Interestingly, EGCG treatment for 3, 6, 12 or 18 hours induced a drastic decrease in extracellular PCSK9 level without reduction of PCSK9 mRNA level in HepG2 cells. EGCG treatment for 24 hours induced a significant decrease in extracellular PCSK9 level accompanying with an up-regulation of LDL receptor. EGCG increased LDL receptor mRNA level through the extracellular signal-related kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathways. We found for the first time that EGCG induced a suppression of PCSK9 accompanying with an up-regulation of LDL receptor in HepG2 cells. Furthermore, EGCG induced an activation of LDL receptor or a decrease of PCSK9 level is partially mediated by Annexin A2.

研究分野：食品機能学

キーワード：ポリフェノール カテキン コレステロール 低密度リポタンパク質受容体 アネキシンA2 PCSK9 EGCG

1. 研究開始当初の背景

茶カテキンやブドウのレスベラトロールはコレステロール代謝を改善することが動物実験で報告されているが、その作用機構の分子レベルでの解明は不十分である。長岡はボストン大学医学部 Zannis 教授(研究協力者)の研究室で、アポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) や A-II 遺伝子転写調節機構を研究し、動脈硬化研究で最も権威ある学術誌に発表した (長岡ら、*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1456-69(1999))。この経験からポリフェノールであるレスベラトロールやエストロゲンの ApoA-I 遺伝子転写活性化機構をヒト肝臓細胞 HepG2 で研究し、興味深い発見[長岡発見 1]をした。なお ApoA-I は抗動脈硬化作用を発揮する血中タンパク質で、高密度リポタンパク質の主要アポリポタンパク質である。また、茶カテキンによるコレステロール代謝改善作用の分子機構の解明過程で、興味深い発見[長岡発見 2]をした。以上が挑戦的萌芽研究の学術的背景(申請の科学的根拠)である。[長岡発見 1] 世界で初めて、エストロゲン受容体 (ERs) α 発現プラスミドを導入した HepG2 細胞で、ApoA-I 遺伝子 (ApoA-I 遺伝子は従来型 ERs 結合配列欠損遺伝子である:*JBC.* 273, 9270-8(1998)) プロモーターのレスベラトロール応答配列を TGAACCCTTGACC (新規 ERs 結合配列) と特定した(長岡ら、日本農芸化学会講演要旨集 p. 174(2010))。しかも、レスベラトロールは ERs に対する結合親和性以上に、強力に新規 ERs 結合配列依存的に転写活性化することを発見した (H21~22 年度科研費挑戦的萌芽研究)。エストロゲンも新規 ERs 結合配列に結合するが、この高応答能の予想外の結果は ERs に対する従来の概念では説明不可能であり、未知情報伝達機構が存在するはずである。[長岡発見 2] 茶カテキン (EGCG) は HepG2 細胞で、LDL (低密度リポタンパク質) 受容体

(生体内コレステロール恒常性維持に必須) mRNA を著増させることを DNA アレイ解析で発見した (長岡ら、*Br. J. Nutr.* 197, 769-73(2012))。この mRNA 増加は JNK (c-Jun N-terminal kinase) 経路による mRNA 安定性増加に起因することを発見した (長岡未発表)。また新仮説として、Annexin A2 が EGCG 受容体である科学的証拠を得た (長岡未発表)。これらの結果から従来の EGCG 受容体経路 (laminin 受容体:*Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 380-1(2004)) とは別の新経路が存在するはずである。

以上のような背景から、研究結果や期間などの制限から、今回の研究ではポリフェノールに応答する新規受容体や新規情報伝達系を解明することを中心に研究を展開する。

2. 研究の目的

上記の背景を基盤にして、ポリフェノールに応答する新規受容体や新規情報伝達系を解明することを目的とする。具体的には、以下である。血漿低密度リポタンパク質 (LDL) レベルの上昇は、高 LDL コレステロール血症を誘導し、動脈硬化症の発症リスク増大につながる。血漿 LDL レベルは主に肝臓に発現している LDL 受容体 (LDLR) 及び LDLR の分解促進因子である proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) によって調節されている。従って、LDLR の活性化及び PCSK9 の低下を誘導する因子の探索及び作用機構解明が求められている。当研究室において、緑茶に含まれる主要なポリフェノールである Epigallocatechin gallate (EGCG) がヒト培養肝臓細胞 HepG2 において LDLR mRNA レベルを上昇させ、LDLR の活性化を誘導する因子であることを明らかにした (長岡ら、*Br. J. Nutr.* 197, 769-73(2012))。しかし、EGCG による LDLR 活性化機構及び PCSK9 に対する EGCG の作用は未だ不明な点が多いことから、本研究ではその作用機構解明を目指した。

3. 研究の方法

[実験 1] HepG2 細胞に JNK、ERK、p38 の各シグナル伝達経路の阻害剤及び EGCG を添加して 24 時間培養後、全 RNA を回収して LDLR mRNA、PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

[実験 2] HepG2 細胞に EGCG を 3、6、12、18 時間添加した後、全 RNA を回収して PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

[実験 3] HepG2 細胞に EGCG、Genistein、Resveratrol、Quercetin それぞれを 24 時間添加し、全 RNA を回収して LDLR mRNA 及び PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

[実験 4] HepG2 において、PCSK9 による LDLR の分解促進を阻害する因子である Annexin A2 (ANXA2) の mRNA レベル及びタンパク質レベルに対する EGCG の影響を検討した。

[実験 5] ANXA2 siRNA を導入した HepG2 において、LDLR、PCSK9 及び ANXA2 の mRNA レベル、タンパク質レベルに対する EGCG の影響を検討した。

4. 研究成果

[実験 1] EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用は ERK 及び p38 経路阻害剤により消失した。EGCG は培地の PCSK9 タンパク質レベルを著減させたが、PCSK9 mRNA レベルに減少はなく、阻害剤

の影響も見られなかった。

[実験 2] EGCG を 3、6、12、18 時間添加した場合においても、PCSK9 mRNA レベルに減少はなかったが、培地の PCSK9 タンパク質は EGCG のすべての添加時間帯で有意に減少した。

[実験 3] すべてのサンプルで Control と比較して LDLR mRNA レベルの有意な上昇が見られた。培地の PCSK9 タンパク質レベルは EGCG 及び Quercetin 添加で有意に減少したが、mRNA レベルの減少は見られなかった。以上より、EGCG は ERK、p38 経路を介して LDLR mRNA レベルを増加させることを発見した。さらに、EGCG は培地の PCSK9 タンパク質を早期に著減させることを明らかにした。また、Quercetin が EGCG と類似する作用を示すことを新たに発見した。PCSK9 を低下させる成分の探索は、コレステロール代謝改善成分の発見に有用である。

[実験 4] EGCG は ANXA2 の細胞外タンパク質レベルの低下を mRNA レベル及び細胞内タンパク質レベルの低下を伴わずに誘導した。

[実験 5] ANXA2 ノックダウンにより、EGCG は LDLR の活性化及び細胞外 PCSK9 タンパク質レベルの低下が部分的に抑制された。

以上の結果より、EGCG は細胞外 PCSK9 タンパク質レベルの低下、ERK 経路を介した LDLR mRNA レベルの上昇を誘導することにより、LDLR を活性化させることを解明した。また、EGCG による LDLR タンパク質レベルの上昇や細胞外 PCSK9 タンパク質レベルの低下は部分的に ANXA2 依存的であることを明らかにした。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. 北村幸平, 三島周平, 島田昌也, 長岡 利
「茶カテキン(EGCG)による LDLR 受容体活性化は PCSK9 や Annexin A2 が媒介する」
日本農芸化学会 中部支部第 168 回例会
講演要旨集 p. 33, 2013 年 10 月 12 日,
名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

2. Nagaoka, S., Kitamura, K., Mishima, S. and Shimada, M, “Epigallocatechin gallate and quercetin induce a suppression of PCSK9 accompanying with an up-regulation of LDL receptor in HepG2 cells. “The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference, 2014 年 9 月 2 日, Nagoya University (Aichi Prefecture, Nagoya City),

3. 北村幸平, 三島周平, 岡田雄大, 島田昌也, 長岡 利 「エピガロカテキンガラレートによる LDL 受容体活性化及び PCSK9 減少の分子機構」日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学 (神奈川県, 川崎市)

4. 北村幸平, 三島周平, 岡田雄大, 島田昌也, 長岡 利 「エピガロカテキンガラレートは Annexin A2 非依存的に LDL 受容体の増加及び PCSK9 の低下を誘導する」日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学 (岡山県, 岡山市)

[図書] (計 0 件)

[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 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 利 (NAGAOKA SATOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 50202221

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :