

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350133

研究課題名(和文) 食用植物油によるステロイドホルモン代謝異常の標的分子探索と安全性評価に関する研究

研究課題名(英文) Target molecules of vegetable oil-induced toxicity on steroid hormone metabolism

研究代表者

大原 直樹 (OHARA, Naoki)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20426422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)に、10w/w%の大豆油(対照群)またはカノーラ油を含む飼料を8週間与えた。カノーラ油は雄の血漿中テストステロン濃度を下げ、アルドステロン濃度を上げ、精巢のStAR、CYP11a1およびCYP17遺伝子発現を抑え、CYP11a1タンパク質発現を減じた。副腎のStAR、CYP11a1、3HSD遺伝子発現は変わらず、CYP11b2のそれは増大した。雌の血漿中テストステロンも低下したが、アルドステロンは変化しなかった。カノーラ油は雄の生存日数のみ顕著に短縮した。SHRSPでは精巢のCYP11a1が毒性標的分子の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：SHRSP of 5 weeks old were given AIN-93 diet containing 10w/w% soybean (control) or canola oil as the sole dietary fat for 8 weeks. They were then sacrificed and plasma steroid hormones, mRNA expressions for StAR and enzymes for steroid metabolism in the testis, ovary and adrenal gland, and of testicular StAR, CYP11a1 and CYP17 proteins were measured. In another series of experiment survival time was determined. Canola oil reduced plasma testosterone and increased aldosterone in the male. Canola oil depressed gene expressions of testicular CYP11a1. StAR and CYP17. CYP11a1 protein was also decreased. mRNA expressions for adrenal StAR, CYP11a1 and 3HSD were not affected, while mRNA for CYP11b2 was increased. The female showed decreased plasma testosterone without changes in aldosterone and CYP11b2 mRNA expression. Canola oil significantly shortened survival time only in the male. Thus, in SHRSP the testis is a target organ of the canola oil toxicity. CYP11a1 may be a target molecule.

研究分野：毒性学、脂質栄養学、薬理学

キーワード：植物油 カノーラ油 SHRSP 精巢 ステロイド代謝 毒性標的分子

1. 研究開始当初の背景

カノーラ油摂取は、雄性 SHRSP を短命化することが知られている。Ratnayake らは、摂取したステロールが蓄積しやすい SHRSP では、カノーラ油中の植物ステロールが細胞膜のコレステロールと置換して、血管をはじめとする多くの組織で細胞膜を脆弱化することが、この短命化の原因であると報じた。しかし、植物ステロール含量がごく少ないオリーブ油でも短命化が認められること、幾つかの植物油で検討すると、生存日数と植物ステロール含量には相関がないことから、カノーラやオリーブ油には植物ステロール以外の有害因子を含むことが疑われた。われわれは有害因子の分離・同定を試みたが成功しなかった。本研究では、カノーラ油摂取による SHRSP の生物学的反応を精査して毒性の標的を探索し、得られた結果から原因物質を同定する糸口を見出そうとした。具体的には、カノーラ油摂取が雄性 SHRSP の遺伝的背景病態(昇圧、腎臓、心臓、脳の血管傷害等)を増悪すること、血漿中アルドステロン濃度の上昇とともに、昇圧促進、血管組織傷害、インスリン抵抗性の発現が見られたため、短命化のプロセスにはアルドステロンが関与すると推測した。一方、精巣のテストステロン濃度が低下し、ミトコンドリアのコレステロール側鎖切断酵素 (CYP11a1) タンパク質の発現が減り、17 β -ヒドロキシラーゼ/17,20 リアーゼ (CYP17) 活性が低下することを見出したため、以下の目的を以って研究を展開した。

2. 研究の目的

(1) カノーラ油摂取によるステロイドホルモン代謝異常の作用点(標的臓器および標的分子)を明らかにする。

(2) 雄性 SHRSP で認められた変化が雌でも観察されるか否かを検討し、カノーラ油の有害作用における性差の有無を確認する。

(3) 培養ヒト細胞を用い、ヒトにおける有害効果の発現と、安全性確保につながる情報を得る。

3. 研究の方法

(1) ステロイド代謝関連酵素活性、酵素タ

ンパク質発現量および mRNA 発現量の測定

4 週齢の雌雄 SHRSP (Izm) をそれぞれ 1 群 10 匹からなる 2 群に分け、油脂成分として 10w/w% の大豆油またはカノーラ油だけを加えた飼料と水道水を 8 週間自由摂取させた。大豆油摂取群を対照群とした。

飼育期間終了後、動物を麻酔し、採血後に放血屠殺して剖検した。主な臓器の重量を測定し、肉眼的観察を行った。副腎および精巣はステロイドホルモン代謝関連酵素活性、酵素タンパク質発現量および遺伝子発現量測定まで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。それ以外の臓器は 10% ホルマリン・リン酸緩衝液で固定し、パラフィン包埋後に薄切して染色し、組織を鏡検した。

血液を遠心して血漿を得、ステロイドホルモン濃度を LC-MS/MS で測定した(株式会社あすか製薬メディカルに委託)。

副腎、精巣、卵巣の組織から抽出した total RNA から cDNA を作製し、TaqManTM Assays プライマー (ABS 社の Rn00580695_m/StAR; Rn00568733_m1/CYP11a1;

Rn00562601_m1/CYP17; Rn01789220_m1/3 β -hydroxyl steroid dehydrogenase (3 HSD); Rn01767818_g1/CYP11b2;

Rn01775763_g1/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); Rn00667869_m1/ β -actin) を用いて、StAR、CYP11a1、CYP17、

3 HSD および CYP11b2 の mRNA 発現を GAPDH または β -actin のそれらに対する相対値としてリアルタイム PCR 法で定量した。精巣組織からミトコンドリア (StAR、CYP11a1、CYP11

b2 を含む) 画分およびマイクロソーム (CYP17、3 HSD を含む) 画分を得、StAR、CYP11a1 および CYP17 のタンパク質発現量をウェスタン

ブロット法で測定した。使用一次抗体: 抗ラット StAR mAb および β -actin mAb (8449 および 8457 Cell Signaling), CYP11a1 pAb (ABS235 Millipore)、CYP17 pAb (66850 Santa Cruz), 3 HSD mAb (515120 Santa Cruz)。

(2) SHRSP における有害効果の性差確認

1. と同様の実験を雌性 SHRSP で実施した。加えて、本研究開始前に雄性動物で観察してあった、血圧、心拍数、血小板数への影響、病理観察を調べた。観察期間中は毎週、体重および摂餌量を測定するとともに、2、4 および 8 週目に尾動脈血圧を非観血式血圧計で測

定した。7~8週目に糖負荷実験を行った。具体的には、動物を18時間絶食させた後、グルコース3g/kgを経口投与し、投与前および投与後30分~150分後まで30分ごとに尾静脈採血し、グルコース濃度およびインスリン活性を測定した。さらに、4週齢のSHRSP雌雄各24匹を、それぞれ1群12匹からなる2群に分け、8週間摂取の実験と同様に飼料と飲水を与えて飼育し、生存日数を調べた。雄では、われわれを含め幾つかのグループによって短命化が確認されているが、雌では全くデータがないことと、雄の結果には、研究施設間でバラつきが認められたので、両性を同じ同一施設で再検討した。

(3) 培養ヒト副腎皮質由来細胞におけるステロイドホルモン産生に及ぼす影響

(本項目は、助成期間中に終了しなかった。現在進行中である。)

ヒト副腎皮質由来のH295R細胞(ATCC)を培養し、培地にアルブミンと混和した大豆油またはカノーラ油を添加し、一定時間培養後、培地中に生成するステロイドホルモン濃度をLC-MS/MSで測定する。また、細胞を回収して洗浄し、ステロイド代謝関連酵素タンパク質および遺伝子の発現量を、ウェスタンブロットおよびPCR法で測定する。

4. 研究成果

(1) ステロイドホルモン代謝酵素発現への影響

カノーラ油摂取により、雌雄のSHRSPで血漿中テストステロン濃度の低下、アルドステロン濃度の上昇が認められた(図1)。

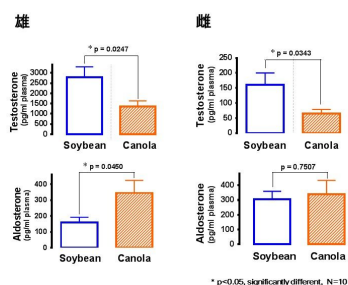


図1 血漿中テストステロンおよびアルドステロンへの影響

精巣組織では、プレグネノロン、デヒドロエピandroステロンの低下が認められた。雌雄とも、血漿中プレグネノロン、プロゲステ

ロン、デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロン濃度には有意な変化が見られなかった。雌ではテストステロン濃度の低下を反映してエストラジオール濃度の有意な低下が見られたが、雄で認められたアルドステロン濃度の上昇は認められなかった。これらの結果から、SHRSPでは、カノーラ油摂取により、雌雄を問わずテストステロン産生が抑制されるが、アルドステロンの上昇は雄のみで認められることが明らかになった。

精巣におけるStAR、CYP11a1およびCYP17のmRNA発現は、カノーラ油摂取で顕著に抑制されたが、副腎におけるStARおよびCYP11a1のmRNA発現は増大傾向を示し、CYP11b2のmRNA発現は有意に増大した(図2)。

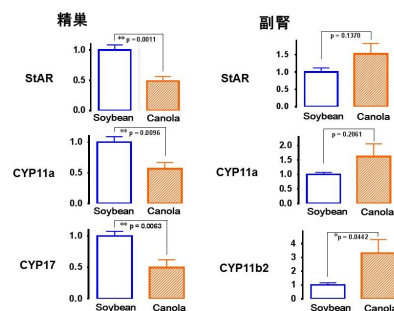


図2 雄SHRSPにおけるmRNA発現

この発現増大は雌では認められなかった。精巣では3HSDのmRNAも抑制されたが、副腎では逆に増大傾向が見られた。一方、卵巣のStARおよびCYP11a1のmRNA発現は影響を受けず、CYP17のmRNA発現が低下した。さらに、精巣とは対照的に3HSDのmRNAの発現増大が認められた。以上の結果から、カノーラ油摂取がテストステロン産生系におよぼす影響は、ミトコンドリアへのコレステロールの取り込みに始まり、デヒドロエピandroステロンが生成するまでの段階、さらに、17-OHプレグネノロンから17-OHプロゲステロン、デヒドロエピandroステロンからandroステンジオンに至る経路でそれぞれに関わる酵素の遺伝子レベルでの抑制を伴うことが明らかになった。性腺と副腎皮質におけるステロイド産生経路は、少なくともコレステロールの取り込みからプレグネノロン産生までは同じであることが知られているが、カノーラ油摂取による影響が副腎では認められなかったことから、カノーラ油の毒性標

臓器は性腺であることが明らかになった。性腺組織全体に対する毒性であるか否かは明らかでないが、少なくとも精巢の組織観察ではカノーラ油摂取による目立った影響は確認されなかった。(雌は卵巣の病理観察をしていない。)雄の副腎においては CYP11b2 の mRNA 発現のみが有意に増大した。したがって、血中アルドステロン濃度の増大は遺伝子レベルの変化であることが示唆された。血中アルドステロン濃度の増大は、少なくとも雄ではカノーラ油摂取による有害効果と関連していることが強く疑われた。雌では、CYP11b2 の mRNA 発現、血漿中アルドステロン濃度がともに影響を受けなかったため、CYP17 の mRNA 発現抑制が卵巣におけるテストステロン産生の低下にかかわることが考えられるが、テストステロン産生の低下がアルドステロン産生上昇を伴うか否かが、雌雄での大きな違いであることが明らかになった。

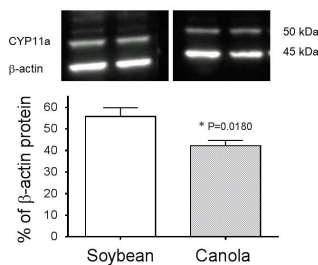


図3 精巢におけるCYP11a タンパク質の発現

カノーラ油摂取により、精巢では CYP11a1 タンパク質の発現が有意に抑制され(図 3)、CYP17 タンパク質は抑制傾向を示したが、StAR タンパク質の発現には影響が見られなかった。以上の結果から、SHRSP 精巢の CYP11a1 は、カノーラ油による毒性の標的分子の一つであることが示唆された。雌でも雄同様にテストステロン産生が抑制されたにも関わらず、血漿中アルドステロンには変化がなく、CYP11b2 も影響を受けなかったことを考慮すると、雄では CYP11b2 もカノーラ油による毒性の標的分子の一つである可能性があるが、詳細は不明である。テストステロンによるアルドステロン産生の抑制が、ラットの一次培養副腎皮質細胞において報告されていることから、テストステロンとアルドステロンの間に、これまでは知られてい

ない調節機構が存在する可能性がある。それが生体で起こっているとすれば、定常状態ではテストステロンが抑制的に制御していたアルドステロン産生が、カノーラ油の精巢毒性によるテストステロン低下によって制御を解除された結果、CYP11b2 mRNA の発現が増し、血漿中アルドステロン濃度が上昇して背景病態を増悪したとも考えられる。

(2) 有害効果の性差 生存日数への影響

カノーラ油摂取による短命化は雌雄ともに認められたが、統計学的には雄の短命化がより顕著であった(図 4)。生存日数の中央値は、雄のカノーラ摂取群が 282 日、大豆油摂取群が 385 日、雌のカノーラ摂取群が 354 日、大豆油摂取群が 374 日であった。

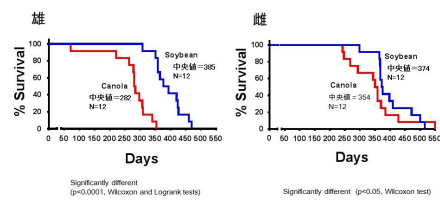


図 4 生存日数への影響

血圧、心拍数への影響

摂取 8 週目の雄の収縮期血圧および心拍数は、大豆油群に比べカノーラ油群で有意に上昇したが、雌では群間差が認められなかった(表 1)。

		Soybean	Canola
心拍数 (beats/min)	雄	470 ± 11	501 ± 7*
	雌	488 ± 5	473 ± 7
収縮期血圧 (mmHg)	雄	230 ± 5	267 ± 7***
	雌	209 ± 4	207 ± 4

* p<0.05, *** p<0.001, significantly different from soybean group, N=10

表 1 血圧、心拍数への影響

その他の有害効果

雄では、8 週間のカノーラ油摂取後に血小板数が有意に減少した。このような変化は雌で

は認められず、16週目の計測でも大豆油摂取群との間に差が見られなかった。また、糖負荷実験の結果、大豆油摂取群とカノーラ油摂取群の血中インスリン濃度推移には差が見られなかったが、カノーラ油摂取群では血糖が有意に高値を維持した。雌では、インスリン濃度および血糖の推移のいずれにも群間差は見られなかった。一方、病理学的所見で顕著だったのはカノーラ油摂取群雄における、心および腎の組織傷害であった。特に腎では、糸球体硬化および再生尿細管の増多が目立った。雌では変化が見られなかった。また、精巣に顕著な組織傷害は見られなかった。このほかの知見として、カノーラ油摂取により、肝および腎でグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)活性が上昇した。これは高血圧自然発症ラット(SHR)の肝および赤血球において既に報告しているが、今回、精巣組織でもG6PD活性が上昇するとともに Na^+, K^+ -ATPaseが阻害されることを確認した。このような現象はWardenerらによって1980年代から報告されていたものであり、G6PD活性上昇が内因性ジギタリス様物質の遊離マーカーになることを示唆する結論は得ていたものの、内因性ジギタリス様物質の研究が展開した今もG6PD活性上昇との関連は話題になっていない。これについては、SHRSPの病態における内因性ジギタリスの関与を探る研究として、今後も検討していく。

(3) 培養ヒト副腎皮質由来細胞におけるステロイドホルモン産生に及ぼす影響
本項目は、助成期間中に終了しなかった。現在進行中である。

(4) 結論

本研究の結果から、カノーラ油摂取による有害効果はSHRSPの背景病態の増悪であること⁽³⁾が確認された。カノーラ油はSHRSPを雌雄問わず短命化するが、その影響は雄において顕著である。雄においては、昇圧、血小板数の減少、末梢組織への糖取り込み不全、心および腎における組織傷害等が認められ、血漿中テストステロン濃度の低下とアルドステロン濃度の上昇が認められた。血漿中アルドステロン濃度の上昇は有害効果の一因であると考えられる。カノーラ油の毒性標的器官は性腺であり、少

なくともCYP11a1は標的分子の一つであることが明らかになった。有害効果における性差から、雄では、テストステロンとアルドステロンの間に何らかの相互制御機構が存在する可能性が示唆された。

(5) 本研究の限界

血漿中アルドステロンレベルの「正常値」を確認していない。雄とは異なり、雌の血漿中アルドステロン濃度には大豆油、カノーラ油摂取群間で差がなかったが、雌の大豆油摂取群における血漿中アルドステロン濃度は、雄の大豆油摂取群のそれより高く、雄のカノーラ油摂取群と同等であった。ヒト細胞における有害性の検討が終了しなかった。

<引用文献>

Huang MZ, Watanabe S, Kobayashi T, Nagatsu A, Sakakibara J, Okuyama H., Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lipids*, 32(7), 1997, 745-751

Ratnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, Trick K., Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Journal of Nutrition*, 130(5), 2000, 1166-1178

Ohara N, Naito Y, Nagata T, Tatematsu K, Fuma SY, Tachibana S, Okuyama H., Exploration for unknown substances in rapeseed oil that shorten survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Effects of super critical gas extraction fractions, *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 2006, 952-963

Kau MM, Lo MJ, Wang SW, Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Yeh JY, Lin H, Shum AY, Fang VS, Ho LT, Wang PS., Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats, *Metabolism*, 48(9), 1999, 1108-1114

Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M, Okuyama H., Different effects of 26-week dietary intake of

rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats, Food and Chemical Toxicology, 46(7), 2008, 2573-2579

Millett JA, Holland SM, Alaghband-Zadeh J, de Wardener HE., Na-K-ATPase-inhibiting and glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity of plasma and hypothalamus of the Okamoto spontaneously hypertensive rat, Journal of Endocrinology, 108(1), 1986, 69-73

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

Okuyama H, Langsjoen PH, Ohara N, Hashimoto Y, Hamazaki T, Yoshida S, Kobayashi T, Langsjoen AM, Medicines and vegetable oils as hidden causes of cardiovascular disease and diabetes. Pharmacology, 査読有, 98, 2016, 134-170
〔学会発表〕

金森 裕未, 夏目 沙矢香, 角屋 美帆, 花井 仁美, 八木 聡美, 内藤 由紀子, 立松 憲次郎, 大原 直樹, 奥山 治美, 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) における植物油摂取によるステロイド代謝系の変化とその性差, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 - 27 日, 仙台

夏目 沙矢香, 二宮 理紗子, 西川 真衣, 内藤 由紀子, 立松 憲次郎, 大原 直樹, 奥山 治美, SHRSP におけるカノーラ油摂取による有害効果の探索, 日本脂質栄養学会第 25 回大会, 2016 年 9 月 16 - 17 日, 秋田

西川 真衣, 八木 聡美, 大原 直樹, 立松 憲次郎, 内藤 由紀子, 奥山 治美, カノーラ油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) のステロイドホルモン代謝に及ぼす影響, 日本毒性学会第 43 回年会, 2016 年 6 月 29 日 - 7 月 1 日, 名古屋

S Yagi, M Nishikawa, H Hanai, S Suzumura, Y Naito, K Tatematsu, D Miyazawa, Y Hashimoto, A Yamamura, H Ohnishi, N Ohara, H Okuyama, Changes by canola (rapeseed) oil ingestion of steroid hormone

production in SHRSP, 日本薬理学会第 89 回年会, 2016 年 3 月 9 - 11 日, 横浜

西川 真衣, 高木 彩菜, 寺町 仁那, 内藤 由紀子, 立松 憲次郎, 宮澤 大介, 橋本 洋子, 山村 彩, 大西 浩之, 大原 直樹, 奥山 治美, SHRSP のステロイドホルモン代謝に関するいくつかの酵素の mRNA 発現に対するカノーラ油摂取の影響, 日本脂質栄養学会第 24 回大会, 2015 年 8 月 28 - 29 日, 佐賀

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 直樹 (OHARA, Naoki)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 20426422

(2) 研究分担者

内藤 由紀子 (NAITO, Yukiko)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 80426428

太田 亮 (OHTA, Ryo)

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部・部長
研究者番号: 70426427