

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17977

研究課題名(和文) システインの過剰摂取は動脈硬化を悪化させるのか

研究課題名(英文) Does excessive cysteine intake exacerbate the atherosclerosis?

研究代表者

橋本 良太 (Hashimoto, Ryota)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60433786

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)：マクロファージによる酸化LDL貪食は、動脈硬化発症に関わる重要な過程である。システインの代謝物であるシスチンは酸化LDL取込みを促進した。ERストレス誘導試薬の存在下では酸化LDL取込みが抑制されたが、シスチンが存在するとそれが認められなかった(*in vitro*)。酸化LDLを取込んだマクロファージではERストレスが生じるために酸化LDL取込み能が減弱するが、シスチン存在下では取込み能が維持される可能性が示唆された。一方*in vivo*では、シスチンを与えたマウスのマクロファージにおいて、酸化LDL取込み能に差異は認められなかった。今後*in vivo*でもERストレスとシスチンの関係を検証したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸の一種であるシステインは、色素沈着や二日酔いの改善などのサプリメントとして広く利用されている。In vitroの結果からは、システインの代謝物であるシスチンが酸化LDLによるERストレスを抑えることでマクロファージの酸化LDL取込みを促進する可能性が示唆された。今回、*in vivo*の結果からはシスチンが動脈硬化を増悪させるデータは得られなかった。しかし、ERストレスが生じている環境下では、シスチンが動脈硬化を増悪させる可能性は否定できない。また、過剰なシステイン摂取が糖尿病を悪化させる可能性が報告されていることを考慮すると、適度なサプリメント摂取が望ましいと考える。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis of oxidized LDL by macrophages is an important process in the development of atherosclerosis. Cystine, a metabolite of cysteine, enhanced the uptake of oxidized LDL by macrophages (*in vitro*). Macrophages treated with reagents inducing ER stress showed reduced uptake of oxidized LDL, whereas this was not the case in the presence of cystine (*in vitro*). These results suggest that macrophages that have taken up oxidized LDL might have reduced the capacity for oxidized LDL uptake due to ER stress, whereas macrophages that have taken up oxidized LDL might maintain their ability to uptake oxidized LDL in the presence of cystine. *In vivo*, however, no difference in uptake of oxidized LDL was observed in macrophages from cystine-fed mice. We would like to examine the relationship between ER stress and cystine *in vivo* in the near future.

研究分野：細胞生理学

キーワード：システイン シスチン マクロファージ 酸化LDL 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

非必須アミノ酸の一つであるシステインは、体内で合成できるため必ずしもそれ自体を摂取する必要はないが、メラニン色素の合成を抑制する作用、肝臓の解毒を高める作用などを有するため、色素沈着や二日酔いの改善などを目的とするサプリメントや医薬品として広く利用されている。世界保健機関 (WHO) によるシステインの推奨摂取量はあるものの (WHO technical report series; No. 935)、「摂取量の上限に関する指針とその科学的根拠」はほとんどない。しかし近年、過剰なシステイン摂取が糖尿病を悪化させる可能性 (Nakatsu et al. 2015)、即ちシステインの無計画な摂取が我々の身体にとって悪影響を及ぼす可能性が報告された。そして糖尿病以外の悪影響の有無について続報がない中、我々は *in vitro* の結果ながらシステインの代謝物であるシスチンが動脈硬化を増悪させる可能性を示すデータを得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 動脈硬化発症に関わる細胞の生理機能に対するシステインとシスチンの影響を *in vitro* で検証すること、および (2) 動脈硬化の増悪に対するシステインとシスチンの過剰摂取の影響を *in vivo* で評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化発症に関わる細胞の生理機能に対するシステイン、シスチンの影響 (*in vitro*)

動脈硬化の発症過程には ~ の 3 つのポイントがあり、システインおよびシスチンが - のそれぞれの過程に影響するかどうかを *in vitro* にて検証した。

「血管内皮細胞が障害される」 血管内皮細胞にシステインなどを添加し、死細胞染色の蛍光色素であるヨウ化プロピジウム (PI) で染色される細胞の割合をフローサイトメーターにて測定することで、細胞障害の程度を定量した。

「血液中の LDL コレステロールが内膜に入り込み、酸化を受ける (酸化 LDL の産生)」 LDL に対してシステインなどを添加した後、酸化 LDL を ELISA にて定量した。

「マクロファージが内膜中の酸化 LDL を貪食しコレステロールを貯めこむことで血管を肥厚させる」 マクロファージに対して蛍光標識された酸化 LDL コレステロールとシステインなどを添加した後、マクロファージ内の蛍光強度の増大をフローサイトメーターにて測定することで、酸化 LDL の取り込みを評価した。また、酸化 LDL 取り込みに関わるスカベンジャー受容体の発現量をフローサイトメトリー、ウェスタンブロットティングで定量した。

(2) 動脈硬化の増悪に対するシステイン、シスチンの過剰摂取の影響 (*in vivo*)

システインまたはシスチンを加えた飲料水を、マウスに 8 週間自由飲水させた。骨髄マクロファージと腹腔マクロファージを単離し、蛍光標識された酸化 LDL コレステロールを添加した後、マクロファージ内の蛍光強度の増大をフローサイトメーターにて測定することで、酸化 LDL の取り込みを評価した。体内のシステイン濃度は健康人ではおよそ 300 μM であり、透析患者では 500~900 μM であることから (Nakanishi et al. 2003) サプリメントの過剰摂取により到達しうる濃度として 1 mM を想定して実験を行った。

4. 研究成果

システインおよびシスチンは血管内皮細胞を障害する作用、および LDL を酸化 LDL に変換させる作用はなかった。システインはマクロファージの酸化 LDL の取込みには影響しなかったが、シスチンは取込みを促進した (図 1)。この酸化 LDL 取込み促進作用は、シスチントランスポーターの阻害薬処理により認められなくなった。このように *in vitro* の結果ながら、システインの代謝物であるシスチンが動脈硬化を増悪させる可能性を示すデータを得た。

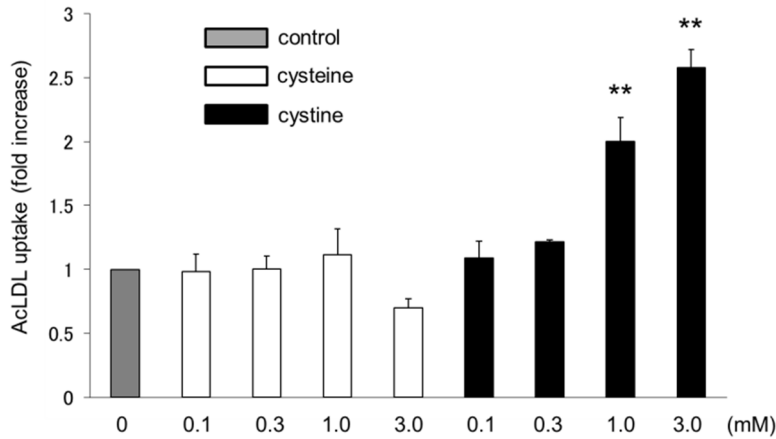


図1 シスチンはAcLDL取込みを促進する ** P<0.01 vs control (n=4)

次に、システインまたはシスチンを添加した水を自由飲水させた群と添加しない水を自由飲水させた群とで酸化 LDL 取込み能を検証した。骨髄マクロファージでは両者に差異は認められなかった。同様に、腹腔マクロファージでも両者に差異は認められなかった。以上の結果より、酸化 LDL 取込みについて *in vitro* の結果と *in vivo* の結果が一致しないことが分かった。

この矛盾を説明できる手がかりを探るために、マクロファージの酸化 LDL 取込みを増大させるシスチンの作用機序解明を *in vitro* で試みた。スカベンジャー受容体は酸化 LDL などの変性リポタンパク質を認識する。マクロファージの泡沫細胞化に主要な役割を果たすスカベンジャー受容体は CD36 と CD204 (SR-A) であるが、システインおよびシスチンはこれらスカベンジャー受容体の発現量に影響を及ぼさなかった (図 2)。

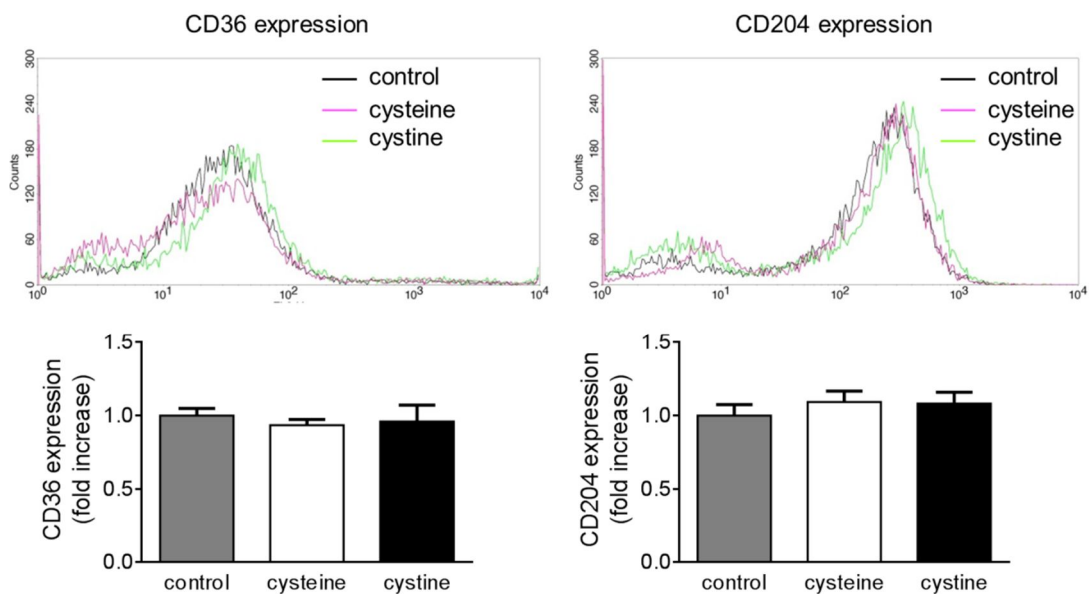


図2 システインおよびシスチンはスカベンジャー受容体の発現量に影響を及ぼさない (n=4)

このように既知の経路ではシスチンの作用機序を説明できなかったため、マクロファージの酸化 LDL 取込みに関わる別の機序解明を試みた。その成果の一つが、酸化 LDL 取込みによって ER からの Ca 放出が減少することである（投稿準備中）。そこで、酸化 LDL 取込みと ER が何かしらの関係があると仮説を立て、酸化 LDL 取込みに対する ER ストレスの影響とシスチンの影響を調べた。ER ストレスの誘導試薬を処理されたマクロファージでは、酸化 LDL 取込みが抑制されたが、シスチン存在下ではそれが認められなかった（in vitro、図 3）。酸化 LDL を取込んだマクロファージでは ER ストレスが生じるために酸化 LDL 取込み能が減弱するが、シスチン存在下では酸化 LDL 取込み能が維持される可能性が示唆された。酸化 LDL 取込みに対するシスチンの作用が in vitro と in vivo とで一致しないが、我々の条件では in vivo において ER ストレスが生じていないことが原因かもしれない。今後 in vivo でも ER ストレスとシスチンの関係を検証したい。

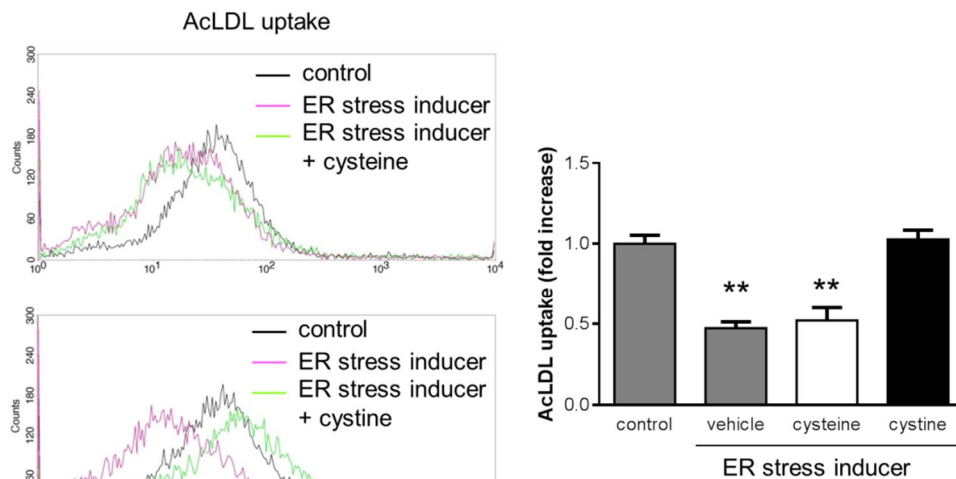


図3 ERストレスの誘導試薬を処理されたマクロファージの酸化LDL取込み ** P<0.01 vs control (n=4)

今回、in vivo の結果からはシステインの代謝物であるシスチンが動脈硬化を増悪させるデータは得られなかった。しかし、ER ストレスが生じている環境下では、シスチンが動脈硬化を増悪させる可能性は否定できない。また、過剰なシステイン摂取が糖尿病を悪化させる可能性が報告されていることを考慮すると、適度なサプリメント摂取が望ましいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Ryota, Kakigi Ryo, Miyamoto Yuki, Nakamura Kyoko, Itoh Seigo, Daida Hiroyuki, Okada Takao, Katoh Youichi	4. 巻 871
2. 論文標題 JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172940 ~ 172940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryota Hashimoto, Hiroyuki Daida, Takao Okada, Youichi Katoh	4. 巻 5
2. 論文標題 A simple method to increase the proportion of bone marrow-derived macrophages positive for M-CSFR using the reducing agent dithiothreitol (DTT)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 1540-1548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2018.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryota Hashimoto, Ryo Kakigi, Kyoko Nakamura, Yuki Miyamoto, Hiroyuki Daida, Takao Okada, Youichi Katoh
2. 発表標題 Glucocorticoid decreases uptake of Ac-LDL through suppression of JAK-STAT pathway in macrophages
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryota Hashimoto, Yuki Miyamoto, Ryo Kakigi, Kyoko Nakamura, Hiroyuki Daida, Takao Okada, Youichi Katoh
2. 発表標題 Glucocorticoid decreases uptake of Ac-LDL through suppression of JAK-STAT pathway in bone marrow-derived macrophages
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------