

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700593

研究課題名 (和文) 動脈硬化における新規原因物質の解明と食品による抑制効果の探索

研究課題名 (英文) Elucidation of a novel causative factor and investigation of effective foods in atherosclerosis

研究代表者

市 育代 (ICHI IKUYO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：50403316

研究成果の概要 (和文)：酸化ストレスは動脈硬化発症と進展に深く関与している。セラミドはアポトーシスを誘導する生理活性脂質で、細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能していることが知られている。我々は以前、ヒトの血漿セラミドが動脈硬化の脂質マーカーと相関関係にあることを報告している。そこで本研究では、酸化ストレスにおけるセラミド代謝の変化を動物実験によって明らかにするために、四塩化炭素による劇症肝炎時に誘発される酸化ストレスが、肝臓だけでなく、他の臓器においてもセラミド代謝に影響をあたえるかについて調べた。組織のセラミドは、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した。次に、ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットにおいて、各臓器でセラミド代謝の変化がみられるか、またセラミドの蓄積が糖尿病の合併症に関与しているかについて検討した。肝臓のセラミドには変化はみられなかったが、血漿と腎臓のセラミドは糖尿病ラットで増加した。またセラミドの産生酵素であるスフィンゴミエリナーゼ (SMase) 活性は、血中の分泌型 SMase が有意に増加した。このように、酸化ストレスを介した過度のセラミド蓄積は動脈硬化の発症因子のひとつであることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： Oxidative stress has been implicated in the development and progression of atherosclerosis. Ceramide has been implicated in regulating cell cycle arrest, apoptosis, and cellular senescence, and serves as an intracellular second messenger in these processes. Our previous study showed that ceramide concentrations in human plasma had a significantly positive correlation with lipid markers that associated with atherosclerosis. In this study, due to reveal the association of oxidative stress and ceramide metabolism in animal, we examined that oxidative stress via CCl₄ administration induces the changes of ceramide metabolism in not only the liver but also other organs such as the kidney. Tissue ceramide levels were analyzed using electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Next, we investigated whether ceramide metabolism was altered in damaged tissues by STZ administration, and whether ceramide accumulation is correlated with the pathogenesis of diabetes-induced complications. Although no differences in hepatic ceramide levels were observed between the control and diabetic rats, plasma and renal ceramide levels were significantly increased by STZ administration. The activations of sphingomyelinases, which hydrolyze sphingomyelin into ceramide, induced the increase of ceramide during STZ administration in plasma. Thus, Our data support the view that the excess accumulation of ceramide via oxidative stress may play an important role in the pathogenesis related atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：動脈硬化、酸化ストレス、脂質

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は心疾患や脳血管疾患の原因であり、わが国の死因の上位を占めている。最近注目されているメタボリックシンドロームは動脈硬化発症を高める危険症候群であることから、その機構解明および新たな原因物質の探索は極めて重要である。

セラミドは細胞膜を構成しているスフィンゴ脂質で、細胞死や増殖、酸化ストレス亢進などに関与している。スフィンゴ脂質は長年、生体膜の構成成分としての機能しか知られていなかったが、近年様々な機能が明らかとなっている。動脈硬化発症には血管内皮細胞におけるアポトーシスと増殖のバランスの破綻が関係していることから、これらの作用に強いアポトーシス作用を持つセラミドが関与している可能性がある。そこで我々は生理活性脂質であるセラミドが、ヒトにおいて血漿セラミドと動脈硬化危険因子との関係について検討したところ、セラミドは血漿コレステロールや中性脂肪、収縮期血圧などの危険因子と相関関係にあり、血漿コレステロールとの相関が最も高かったことを明らかにしている。また動脈硬化モデル動物であるアポE欠損マウスを用いた実験でも、動脈硬化病変の進展に伴い、血漿セラミドが増加していることを報告している。

動脈硬化発症の主要因に酸化ストレスがある。細胞実験では、酸化ストレスとセラミド産生の亢進に関する報告が多数存在する。しかし、実際の生体において、酸化ストレスとセラミドとの関係を検討した報告は少なかった。

2. 研究の目的

生理活性脂質であるセラミドが酸化ストレスによって増加し、また動脈硬化の危険因子となる可能性について、実験動物を用いて明らかにする。

さらに動脈硬化の発症を抑制できる食品成分の探索を行う。

3. 研究の方法

動脈硬化の原因物質として、生理活性脂質であるセラミドに注目し、血漿コレステロール低下薬投与時のセラミド代謝の変化について、アポE欠損マウスを用いて検討した。また、動脈硬化の要因である酸化ストレスや糖尿病との関係について、モデル動物を用いて検証した。

セラミドはスフィンゴシンのアミノ基に

異なる脂肪酸が結合していることから (Fig. 1)、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、結合している脂肪酸別に特異的に測定を行った。

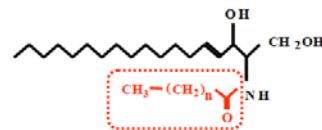


Fig. 1

4. 研究成果

(1) コレステロール低下薬がアポE欠損マウスのセラミド代謝に及ぼす影響

我々は以前、ヒトの血漿セラミドが動脈硬化の危険因子と相関関係にあり、特に血漿コレステロールと相関が高いことを報告している。そこで、動脈硬化モデル動物であるアポE欠損マウスにコレステロール低下薬を与え、血漿セラミドに及ぼす影響について検討した。血漿コレステロール低下薬として、プロブコールを4週間与え、血漿コレステロールの減少とセラミド代謝の変化について検討した。その結果、プロブコールによる血漿コレステロールの有意な減少とともに、血漿セラミドも低下した。コレステロール自体の生理活性はセラミドに比べると弱いと考えられることから、血漿コレステロール増加による動脈硬化作用にセラミドが関与している可能性が示唆された。

(2) 酸化ストレスモデル動物におけるセラミド代謝の変化

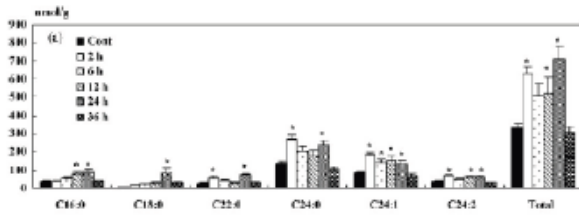
酸化ストレスは動脈硬化の大きな要因であることから、酸化ストレスのモデル動物を用いて、セラミド代謝の変化について検討を行った。四塩化炭素は肝臓のミクロソームおよびミトコンドリアにおいてトリクロロメチルラジカルに代謝され、肝臓の細胞に障害を起し、劇症肝炎を誘発することが知られている。また劇症肝炎時には肝臓だけでなく、脳や腎臓にも障害が起こることが知られているが、その原因は未だ不明である。

肝障害の指標は、四塩化炭素投与12時間後から有意に増加したが、肝臓のセラミドは投与後2時間という早い段階から増加した。また肝臓では、C24などの極長鎖脂肪酸の増加が顕著であった。血漿では24時間後から全て

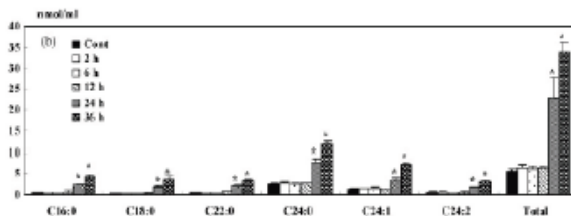
の分子種のセラミドが増加した。
また、腎障害のマーカーである血中の尿素窒素は、36時間後に増加していたことから、後期には腎障害が発症していることが分かった。

これらの結果から、四塩化炭素による過度の酸化ストレスにより、肝臓ではセラミドが増加し、その後障害を受けた肝臓から血中に移行していることが考えられた。また血中で増加したセラミドは、腎臓などの多臓器不全の原因になっている可能性が示唆された。

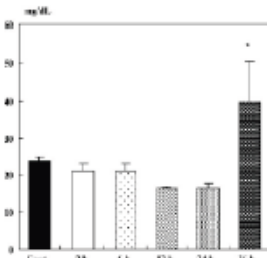
Liver ceramide



Plasma ceramide



BUN



(3) 糖尿病ラットにおけるセラミド代謝

糖尿病においても、酸化ストレスに関する多くの研究が報告されている。糖尿病における酸化ストレス亢進の機序として、高血糖を介した種々の代謝異常すなわちadvanced glycation end product (AGE)生成、グルコース自己酸化、ミトコンドリアよりスーパーオキシドの産生亢進などが報告されている。また糖尿病では合併症も大きな問題であるが、その原因物質については不明である。そこで、糖尿病ラットにおけるセラミド代謝の変化について検討した。

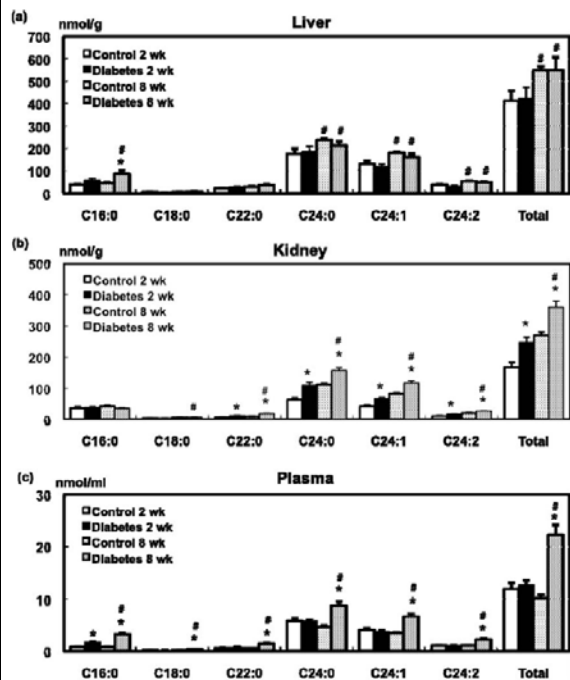
ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与して糖尿病の初期として2週目に、後期として8週目に解剖し、酸化ストレスの指標や

臓器障害の指標、セラミド代謝の変化を調べた。

血糖はSTZを投与した2週間後から糖尿病群で増加し、肝障害の指標も2週目から有意に高値を示した。また血中の尿素窒素も8週目で増加していたことから、STZ投与により、肝臓や腎臓の障害が誘発されていることが分かった。また血漿や各臓器では生体内の抗酸化物質であるビタミンCやEなどが有意に減少していた。

またセラミドについて、肝臓ではSTZ投与による変化は見られなかったが、血漿と腎臓では糖尿病群で有意に高かった。また、セラミド産生酵素であるスフィンゴミエリナーゼ (SMase) については、血中に存在する分泌型SMase活性が糖尿病群で高かった。

以上の結果から、STZ投与により、酸化ストレスを伴う臓器障害および分泌型SMaseによるセラミド蓄積がみられ、セラミドの増加・蓄積は糖尿病の進展や合併症に関与している可能性が考えられた。



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9件)

- Increase in plasma ceramide levels via secretory sphingomyelinase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. K.

- Kobayashi, I. Ichi*, T. Nakagawa, C. Kamikawa, Y. Kitamura, E. Koga, Y. Washino, Y. Hoshinaga, S. Kojo *, Med. Chem. Comm., (2011) in press.
2. Oxidative stress in the ischemic and non-ischemic parts of the rat liver after two-thirds ischemia/reperfusion. Y. Kitamura, Y. Washino, E. Koga, A. Ito, M. Kawagoe, C. Nakazaki, K. Kiso, I. Ichi, T. Matura, S. Kojo., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **74**, 979-983, (2010).
 3. Effect of nobiletin on lipid metabolism in rats. E. Nagata, I. Ichi, R. Kataoka, M. Matsushima, N. Adachi, Y. Kitamura, T. Sasaki, and S. Kojo, *J. Health Sci.*, in press (2010).
 4. S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. N. Takuwa, S. Ohkura, S. Takashima, F. Wang, T. Tanaka, K. Hirano, Y. Banno, M. Sasaki, I. Ichi, Y. Okamoto, K. Yoshioka, W. Du, M. Okamura, N. Sugimoto, K. Mizugishi, Y. Nakamura, I. Ishii, M. Takamura, S. Kaneko, S. Kojo, K. Satouchi, K. Mitumori, J. Chun, and Y. Takuwa, *Cardiovasc. Res.*, **85**, 484-493 (2010).
 5. Oxidative stress in the ischemic and non-ischemic parts of the rat liver after two-thirds ischemia/reperfusion. Y. Kitamura, Y. Washino, E. Koga, A. Ito, M. Kawagoe, C. Nakazaki, K. Kiso, I. Ichi, T. Matura, and S. Kojo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 979-983 (2010).
 6. Effect of celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on carbon tetrachloride intoxication in rats. Y. Washino, E. Koga, Y. Kitamura, C. Kamikawa, K. Kobayashi, T. Nakagawa, C. Nakazaki, I. Ichi, and S. Kojo, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 707-709 (2010).
 7. Neutral sphingomyelinase-induced ceramide accumulation by oxidative stress during carbon tetrachloride intoxication. I. Ichi, C. Kamikawa, T. Nakagawa, K. Kobayashi, R. Kataoka, E. Nagata, Y. Kitamura, C. Nakazaki, T. Matura, and S. Kojo, *Toxicology*, **261**, 33-40 (2009).
 8. The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. I. Ichi, H. Hori, Y. Takashima, N. Adachi, R. Kataoka, K. Okihara, K. Hashimoto, and S. Kojo, *J. Food. Sci.*, **74**, H127-H131 (2009).
 9. Effect of α -tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. C. Iida, K. Fujii, E. Koga, Y. Washino, Y. Kitamura, I. Ichi, K. Abe, T. Matura, and S. Kojo, *Arch. Toxicol.*, **83**, 477-483 (2009).
- [学会発表] (計 38 件)
1. 市 育代、上川千明、中川朋香、片岡亮子、永田絵里、北村佑子、中崎千尋、小林慧子、小城勝相
四塩化炭素中毒時の酸化ストレスを介したセラミド代謝の変化
日本栄養・食糧学会第 64 回大会 (2010)
 2. I. Ichi, C. Kamikawa, T. Nakagawa, R. Kataoka, E. Nagata, K. Kobayashi, S. Kojo
Carbon tetrachloride-induced oxidative stress and change of ceramide metabolism.
4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM 2009) Tokyo
 3. 市 育代
動脈硬化の新規危険因子としてのセラミド
レドックス生命科学第 170 委員会第 19 回研究会 (2008)

〔図書〕（計 1 件）

Antioxidants as biomarkers of oxidative stress, I. Ichi and S. Kojo, In *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications* (Ed., G. Aldini, K.-J. Yeum, E. Niki, and R. M. Russell) pp. 35-49, Wiley-Blackwell, Iowa, USA (2010).

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市 育代 (ICHI IKUYO)
研究者番号：50403317

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：