

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00847

研究課題名(和文)小胞体ストレス制御を基盤とした食品の新たな血管炎症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study on a new approach to suppress vascular inflammation by food factors targeting endoplasmic reticulum stress control

研究代表者

岸本 良美 (KISHIMOTO, Yoshimi)

お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・プロダクション・寄附研究部門准教授

研究者番号：70600477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がんや動脈硬化など、種々の疾患の進展に酸化ストレスが大きな影響を及ぼすことはよく知られているが、近年、様々な疾患において小胞体ストレスによる細胞機能の障害、炎症、細胞死が大きく関与していることが明らかになってきた。本研究は、動脈硬化の進展に重要な血管炎症に対して、小胞体ストレスがどのように関与しているのか、またどのような食品成分により改善されるのかを明らかにすることを目的とし、培養細胞(血管内皮細胞、単球系細胞)を用いた検討を行った。その結果、飽和脂肪酸であるパルミチン酸により小胞体ストレス関連因子の発現が増加すること、いくつかの食品成分が抑制効果を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の機能性研究において、酸化ストレスに対する抑制作用は多くの報告があるが、小胞体ストレスに着目した報告は少ない。ポリフェノール類は疫学研究などからも動脈硬化性疾患に対するリスク低減作用が示されている注目の成分であるが、小胞体ストレスとの関連も含めて更なる機能性の解明につながると期待される。我が国の死因の約4分の1を占める動脈硬化性疾患の予防には国民の関心も高いことから、社会的意義、インパクトも非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：It is well known that oxidative stress has a great influence on the progress of various diseases such as cancer and arteriosclerosis, but in recent years, endoplasmic reticulum (ER) stress-induced impairment of cell function, inflammation and cell death have been recognized to be also involved in various diseases. The aim of this study was to clarify how ER stress is involved in vascular inflammation, and whether some food factors can improve ER stress. According to the studies using cultured cells (vascular endothelial cells and monocyte cells), it was shown that palmitic acid, a saturated fatty acid, increased expression of ER stress-related molecules, and some food factors had the suppressive effects on it. These results may contribute to clarifying beneficial effects of some food factors to ameliorate ER stress-related diseases.

研究分野：食品機能学

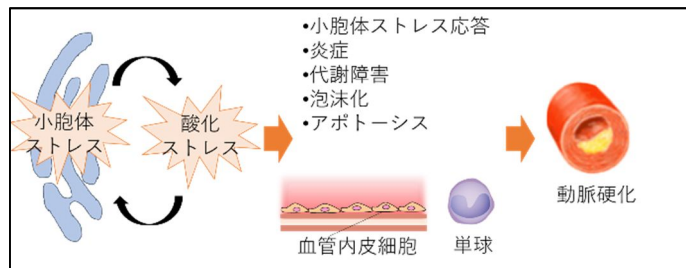
キーワード：小胞体ストレス 血管炎症 動脈硬化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は常に様々なストレスにさらされているが、細胞には多様なストレス応答機構が備わっており、外的・内的なストレスに対処、適応している。それゆえストレス応答機構の破綻は多くの疾患の原因となりうる。がんや動脈硬化など、種々の疾患の進展に酸化ストレスが大きな影響を及ぼすことはよく知られているが、近年、小胞体ストレスと疾患の関連に注目が集まっている。小胞体ストレスは異常なタンパク質がその合成の場である小胞体の内部に蓄積することで生じるもので、分子シャペロンの産生増加、タンパク質の翻訳抑制、異常タンパク質の分解といった反応が亢進し、細胞の恒常性を保つように働くが、維持できなくなると、アポトーシスやオートファジーといった細胞死が誘導される。小胞体ストレスは、糖尿病における膵細胞の機能不全や腎症などの合併症、パーキンソン病などの神経変性疾患などにも大きく関与していることが明らかにされつつあるが、本研究では特に動脈硬化における血管炎症との関連に着目した。

動脈硬化における小胞体ストレスの関連として、小胞体ストレスにより誘導される CHOP というタンパク質を欠損させたマウスでは、血管細胞と血球細胞の相互作用による血管炎症が抑制され、動脈硬化の進展が抑えられたとの報告がある (*Circulation*, 2011)。他にも、同じく小胞体ストレスで誘導される BiP というシャペロンタンパク質を血管内皮細胞でノックダウンすると、NF- $\kappa$ B の活性化や接着分子 (ICAM-1、VCAM-1) の発現が抑制されたとの報告がある (*PLoS One*, 2014)。このような報告から、血管炎症と小胞体ストレスは密接にリンクしており、血管炎症を抑制する食品成分の中には、小胞体ストレスにも抑制効果を発揮するものがあるのではないかと考えるに至った。これまで、小胞体ストレスを抑制する食品成分についての研究は、ほとんど行われておらず、活性型ビタミン D3 (1,25-ジヒドロキシビタミン D3) が血管内皮細胞や神経芽細胞において、小胞体ストレスを抑制するとの報告がなされたばかりである (*Free Radic. Biol. Med.*, 2016, *Food Chem. Toxicol.*, 2016)。一方、小胞体ストレスは、酸化ストレスが起因となり生じる場合もあるため、ポリフェノールやカロテノイドのような抗酸化成分においても、小胞体ストレスの抑制に働く可能性は十分に考えられる。



### 2. 研究の目的

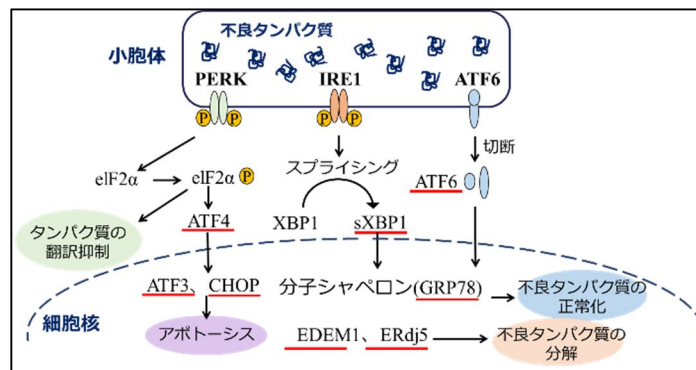
本研究では、動脈硬化の進展に重要な血管炎症に対して、小胞体ストレスがどのように関与しているのか、またどのような食品成分により改善されるのかを検討し、小胞体ストレスの制御を基盤とした食品による動脈硬化予防機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、飽和脂肪酸やグルコースの刺激により血管内皮細胞、単球、マクロファージで生じる小胞体ストレスに対して、ポリフェノールやカロテノイドなどの食品成分がどのようなメカニズムで抑制作用を發揮するのかを明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管内皮細胞における小胞体ストレスと炎症反応に関する検討

##### 飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス誘導条件の検討

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に飽和脂肪酸であるパルミチン酸 100-400  $\mu$ M を処理し、小胞体ストレス応答機構に関わる分子の発現変動について、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットにより検討した。比較として、小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin や、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  処理においても検討した。



#### 小胞体ストレスを抑制する食品因子の探索

小胞体ストレスを改善する食品成分の候補として、複数のポリフェノール、カロテノイドならびに食品抽出物を検討した。

#### 酸化ストレス、炎症との関連の検討

活性酸素種 (ROS) 産生は蛍光指示薬を用いて検出し、炎症性サイトカインや接着分子、抗酸化酵素の発現はリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで測定した。HUVEC への単球接着について、蛍光標識した THP-1 細胞を添加し、接着した細胞の増減を検討した。

## 作用機序の検討

作用機序の検討として、炎症に関連する調節因子である MAPK、NF- $\kappa$ B、STAT3、小胞体ストレスの調節因子として知られる RERK、eIF2 $\alpha$ 、IRE1 などの阻害剤を用いた検討を行った。

### (2)単球系細胞における小胞体ストレスと炎症反応に関する検討

#### 飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス誘導条件の検討

ヒト単球系細胞 THP-1 に飽和脂肪酸であるパルミチン酸 100-400  $\mu$ M を処理し、小胞体ストレス応答機構に関わる分子の発現変動について、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットにより検討した。しかし、小胞体ストレスマーカーに対する影響が顕著でなかったため、小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を使用して評価を行うこととした。Thapsigargin 1 nM を処理し、小胞体ストレス応答機構に関わる分子の発現変動について、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットにより検討した。

#### 小胞体ストレスを抑制する食品因子の探索

小胞体ストレスを改善する食品成分の候補として、複数のポリフェノールならびに食品抽出物を検討した。

#### 酸化ストレス、炎症との関連の検討

活性酸素種 (ROS) 産生は蛍光指示薬を用いて検出し、炎症性サイトカインや抗酸化酵素の発現はリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで測定した。

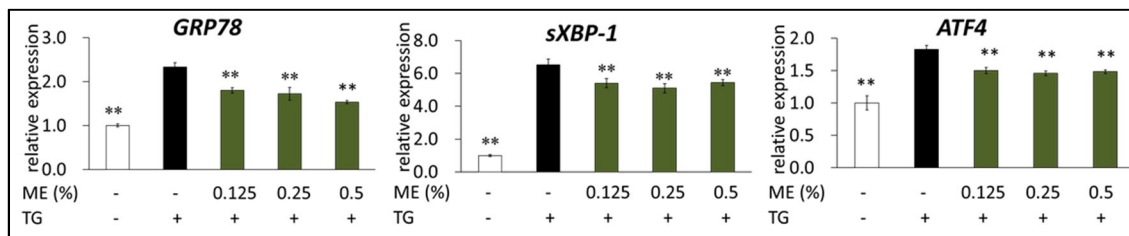
## 4. 研究成果

### (1)血管内皮細胞における小胞体ストレスと炎症反応に関する検討

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC において、パルミチン酸処理により、炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-6、IL-8 や接着分子 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) などの発現増加に加えて、小胞体ストレスマーカーである glucose-regulated protein (GRP78) spliced x-box binding protein 1 (sXBP1) activating transcription factor (ATF) 3、ATF4、C/EBP homologous protein (CHOP) の発現増加が認められた。PERK のリン酸化、eIF2 $\alpha$  のリン酸化、ATF4 の核移行について、ウェスタンブロットにて確認し、これらの阻害剤や siRNA によるノックダウンの影響を検討した。また、小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を添加した場合にも、小胞体ストレスマーカーとともに、炎症性サイトカインや接着分子の発現増加が認められた。Thapsigargin 添加による小胞体ストレスマーカーの発現増加をいくつかのポリフェノールが抑制したが、それらはパルミチン酸添加による小胞体ストレスマーカーの発現増加には抑制効果を示さなかった。このことより、パルミチン酸は thapsigargin とは異なる経路で小胞体ストレスを惹起する可能性が示唆された。パルミチン酸による炎症反応には MAPK、NF- $\kappa$ B、STAT3 等の活性化が関与していることが知られているため、小胞体ストレスに対するこれらの因子の関与について、阻害剤を用いた検討を行い、興味深いデータを得ることができた。また、抗酸化酵素である heme oxygenase 1 (HO-1)が小胞体ストレスを抑制するという新たな知見をふまえ、HO-1 の発現を誘導することを知られているポリフェノールであるクルクミンの影響を検討したところ、炎症性サイトカインや接着分子、GRP78 の発現減少が認められた。

### (2)単球系細胞における小胞体ストレスと炎症反応に関する検討

ヒト単球系細胞 THP-1 細胞における検討では、thapsigargin (TG) により誘導された小胞体ストレスマーカー GRP78、sXBP1、ATF3、ATF4、ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1 (EDEMI) DnaJ heat shock protein family member C10 (ERdj5) の mRNA 発現量が、抹茶抽出液 (ME) ならびに主要なポリフェノールである epigallocatechin gallate (EGCG) により抑制された。さらに炎症性サイトカインや活性酸素種産生の減少が認められた。



### (3)総括

血管内皮細胞ならびに単球系細胞において、パルミチン酸や thapsigargin は炎症指標とともに、小胞体ストレス応答を惹起し、動脈硬化進展と関連する可能性が示唆された。それに対し、いくつかのポリフェノールや食品抽出物において改善作用が認められた。これらの成果より、小胞体ストレス制御を基盤とした食品の新たな動脈硬化予防機構の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwashima Tomomi, Kudome Yuki, Kishimoto Yoshimi, Saita Emi, Tanaka Miori, Taguchi Chie, Hirakawa Satoshi, Mitani Nobu, Kondo Kazuo, Iida Kaoruko	4. 巻 63
2. 論文標題 Aronia berry extract inhibits TNF- $\alpha$ -induced vascular endothelial inflammation through the regulation of STAT3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food & Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29219/fnr.v63.3361	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 -

1. 著者名 Kishimoto Yoshimi, Kondo Kazuo, Momiyama Yukihiko	4. 巻 20
2. 論文標題 The Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Atherosclerotic Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3628-3628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20153628	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9件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 竹内郁恵、岸本良美、田中未央里、岩島知未、才田恵美、田口千恵、近藤和雄
2. 発表標題 単球系細胞における小胞体ストレスマーカー発現に及ぼす抹茶の影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi Ikue, Kishimoto Yoshimi, Tanaka Miori, Iwashima Tomomi, Taguchi Chie, Saita Emi, Kondo Kazuo
2. 発表標題 Effect of Matcha on endoplasmic reticulum stress markers in monocytic cells
3. 学会等名 XVIII International Symposium on Atherosclerosis（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内郁恵、岸本良美、岩島知未、田中未央里、田口千恵、近藤和雄
2. 発表標題 小胞体ストレス応答機構に対する抹茶ならびにEGCGの影響
3. 学会等名 第16回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本良美、才田恵美、田口千恵、谷真理子、近藤和雄
2. 発表標題 パルミチン酸刺激による血管内皮障害に対するクルクミンの抑制作用機序の検討
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸本良美、才田恵美、田口千恵、谷真理子、近藤和雄
2. 発表標題 培養血管内皮細胞においてクルクミンは飽和脂肪酸による炎症反応を抑制する
3. 学会等名 第15回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kishimoto Yoshimi, Takeuchi Ikue, Iwashima Tomomi, Taguchi Chie, Kondo Kazuo
2. 発表標題 Effect of Matcha green tea on endoplasmic reticulum stress in monocytic cells
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----