

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05488

研究課題名（和文）適度なアルコール摂取による動脈硬化予防効果の分子メカニズム基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of molecular mechanism for moderate alcohol intake to prevent atherosclerosis

研究代表者

臼井 真一（USUI, Shinichi）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50346417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：エタノールを摂取したラットでは、血清HDL-コレステロール濃度が低下し、HDLが遊離コレステロールに富む粒子へと変化することが明らかになった。これらのHDLの量的・質的变化は、肝臓においてHDL受容体として機能するSR-BIの遺伝子発現増加が関与している可能性が考えられた。エタノール摂取によるSR-BIの発現増加はコレステロール逆転送系の活性化を介して動脈硬化抑制的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適度な飲酒は動脈硬化のリスク低減に関連し、抗動脈硬化作用の一つにHDL-コレステロールの増加が知られている。しかし、今回のラットの実験ではエタノール摂取により肝臓のHDL受容体の遺伝子発現が増加し、HDL-コレステロールが減少した。HDL受容体の発現増加はコレステロール逆転送系の活性化を引き起こす可能性が考えられ、本研究で得られた成果は動脈硬化の予防・治療法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We showed that serum HDL-cholesterol levels decreased in rats fed ethanol and their HDL changed to free cholesterol-rich particles. The quantitative and qualitative changes in HDL may be associated with the increased mRNA expression of scavenger receptor class B type I, which functions as an HDL receptor in the liver. It was suggested that the increase in SR-BI expression by ethanol intake may work to suppress atherosclerosis through activation of the reverse cholesterol transport system.

研究分野：臨床化学

キーワード：エタノール HDL受容体 コレステロール トリグリセリド リポ蛋白代謝

1. 研究開始当初の背景

適度な飲酒は動脈硬化のリスク低減に関連することが多くの疫学研究で示されており、アルコールによる抗動脈硬化作用の一つに善玉 HDL-コレステロールの増加が知られている。その一方で HDL-コレステロールを増加させる薬剤(コレステリルエステル転送蛋白阻害薬など)により動脈硬化の予防・治療を目指す試みがなされているが臨床的有用性はこれまでに示されていない。このことは、HDL-コレステロールの増加が必ずしも動脈硬化予防につながらないことを示しており、HDL はコレステロール量だけでなく、HDL のクオリティを評価することが重要であるかもしれない。

肝臓はアルコール代謝や脂質代謝を行う主要臓器であり、肝臓に発現する HDL 受容体 (scavenger receptor class B type I ; SR-BI) や ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) が血中 HDL-コレステロール濃度を規定する主要因子であることが明らかになってきた。これらのリポ蛋白質代謝関連蛋白質がコレステロールの量だけでなく、HDL の質的变化を規定する因子として深く関与している可能性があるが、SR-BI や ABCA1 の発現・機能に対するアルコールの作用はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、適度なアルコール摂取がもたらす肝 SR-BI と肝 ABCA1 への作用を評価するとともに、その分子メカニズムを血中 HDL-コレステロール濃度や HDL の質との関連も含めて検討することを主目的とする。この研究により、適度なアルコールがもたらす動脈硬化のリスク軽減メカニズムを同定し、HDL を標的とした動脈硬化の予防・治療法に向けた基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

8週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット(チャールスリバー)を体重が等しくなるよう3群(各群 n=5)に分け、各群に水道水(コントロール群)、1%エタノール水、および4%エタノール水をそれぞれ与えて自由摂食・自由飲水下で飼育した。18週齢目に12時間の絶食後、麻酔下で血液と肝臓等を採用した。体重、飼料、飲料量は1週ごとに記録した。本研究は岡山大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

採取したラットの肝臓を用いて、脂質蓄積、組織標本観察、遺伝子発現(リアルタイム PCR)および蛋白質発現(ウエスタンブロッティング)を評価した。血液は血清を分離後、生化学検査(AST, ALT, 血糖, など)、リポ蛋白質詳細分析(ゲルろ過高速液体クロマトグラフィ)、HDL サブクラス分析(イオン交換クロマトグラフィ)、HDL 機能分析(抗酸化酵素測定)などを実施した。

(2) 細胞培養実験

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞(JCRB 細胞バンク)をエタノール濃度の異なる培地(エタノール 0.2~0.8%)により1~4日間培養し、その培養上清のリポ蛋白質をゲル濾過 HPLC で分析した。また、HepG2 細胞のホモジネートを作製し、SR-BI および ABCA1 など、主に HDL 代謝やコレステロール代謝に関連する蛋白質について、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、蛋白質発現をウエスタンブロッティング法で調べた。

4. 研究成果

(1) 動物実験

飼料・飲料の摂取量と体重変化

飼料の摂取量はコントロール群に比べエタノール摂取群で少なかったが、飲料摂取量と体重変化には有意差が見られなかった。

エタノール摂取による血清リポ蛋白質への影響

エタノール摂取群はコントロール群に比べ、総コレステロール、HDL-コレステロールが低値傾向を示し、ヒトの研究で報告されているような HDL-コレステロールの増加は見られなかった。HDL のサブクラス解析でも、エタノール摂取による大きな変動は見られなかった。しかし、HDL の脂質組成では、4%エタノール摂取群で遊離コレステロール比率が高い HDL (FC-rich HDL) が出現し、HDL の質的变化が生じている可能性が示唆された ($p < 0.05$, 図1)。また、4%エタノール摂取群は血清トリグリセリド(TG)とVLDL-コレステロールが有意に低下していた。

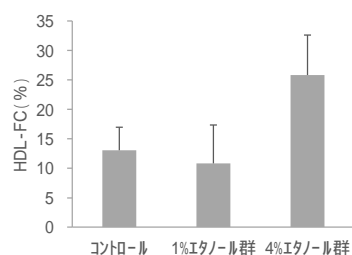


図1. HDL-Cに占めるHDL-FCの割合

エタノール摂取による HDL 機能への影響

HDL 上に存在する抗酸化酵素であるパラオキシナーゼの酵素活性は、コントロール群とエタノール摂取群で有意差を認めなかった。抗酸化・抗炎症能に関与する血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ活性値もエタノール摂取群とコントロール群間で有意差は見られなかった。

エタノール摂取による肝臓の脂質蓄積への影響

エタノール摂取群は肝障害のマーカーである血清 ALT, AST 値の上昇はなく、コントロール群と同様の肝組織像を呈していたことから、エタノール摂取による肝障害は生じていないことが確認された。肝における脂質蓄積量の定量評価 (TC, FC, リン脂質, TG) では、エタノール摂取群とコントロール群間に違いは見られなかった。

エタノール摂取による肝臓のコレステロール代謝関連蛋白質への影響

HDL 受容体として機能する肝 SR-BI は、HDL 内のコレステロールエステルを選択的に肝細胞内へ取り込む役割を担っている。SR-BI の遺伝子発現は、1%エタノール摂取群とコントロール群で有意差はみられなかったが、4%エタノール摂取群は有意に増加していた ($p < 0.05$, 図 2)。しかし、SR-BI の蛋白質発現量は遺伝子発現とは一致せずエタノール摂取群では増加していなかった。HDL の生合成に深く関与する ABCA1 は、遺伝子発現および蛋白質発現レベルのいずれにおいてもエタノール摂取による有意な変動は見られなかった (図 3)。肝臓における他のコレステロール代謝蛋白の遺伝子発現を調べると、LXR (liver X receptor- α), SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein-1), LXR-1 (liver receptor homolog-1), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor- α), HNF-1 (hepatic nuclear factor-1 α), ABCG8 (ATP-binding cassette transporter G8), ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1) の mRNA 発現増加がエタノール摂取群で見られた。また、胆汁酸のリガンドとして働く核内受容体 FXR (farnesoid X receptor) のターゲット遺伝子である SHP (small heterodimer partner) がエタノール摂取ラットで発現増加傾向にあったことから、エタノール摂取により FXR が活性化されて TG 濃度が低下した可能性が示唆された。

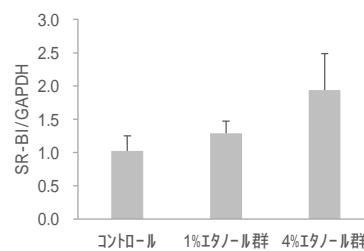


図2. mRNAの発現量

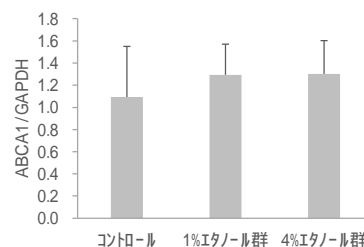


図3. mRNAの発現量

(2) 細胞培養実験

エタノール添加による HDL 産生

エタノールの単回添加 (0~2%) ではエタノール濃度依存性に細胞生存率が低下し、特に細胞数が少ない状態でその傾向が顕著であった。細胞数が多い場合はエタノール 1%までは有意な生存率低下を認めなかった。培養上清に出現する HDL のコレステロール量や HDL の主要構成蛋白であるアポ A-1 は変動しなかったが、HDL 粒子の大型化が見られた。また、エタノールの複数回添加 (0~1%, 12~24 時間毎に 2~4 回添加) による長期間の培養条件においては培養上清に出現する HDL が単回添加に比べ増加したが、この増加は 0%エタノールでも認められたため、エタノール添加による影響は短期培養 (単回添加) と同様に有意ではなかった。

エタノール添加による遺伝子・蛋白質発現への影響

エタノール添加培地 (0~0.8%) で培養した HepG2 細胞を用いて、脂質代謝関連蛋白の遺伝子や蛋白質発現を分析した。HDL の受容体として働く SR-BI の遺伝子発現はエタノールの影響はなく、ABCA1 はエタノール添加で有意に低下した。TG 代謝に関与する SHP の遺伝子発現はエタノール添加で有意に低下した。また、エタノール摂取ラットで遺伝子発現が増加した LXR は細胞培養実験では有意に低下し、LXR-1 や PPAR は変動しなかった。エタノール代謝に関与する CYP3A4 を発現させた HepG2 細胞においても、エタノールによる遺伝子発現の増加は見られなかった。一方、ウエスタンブロッティングによる蛋白質発現解析では、エタノール添加で変動する蛋白は見つからなかった。

以上の実験結果から、エタノールを摂取したラットでは、ヒトとは異なり HDL-コレステロールが減少することが明らかになった。肝臓における HDL 代謝関連蛋白の遺伝子発現はエタノール摂取により有意に変動しており、特に SR-BI の発現増加が HDL-コレステロールの減少に関与している可能性が示唆された。また、エタノール摂取により、HDL は遊離コレステロールに富む粒子へと質的变化が見られた。この結果は、SR-BI は HDL のコレステロールエステルを選択的に取り込む働きがあることと関連している可能性が考えられる。HDL は末梢に蓄積したコレステ

ロールを肝臓へ転送する役割を有していることを考慮すると、エタノール摂取により HDL のコレステロール逆転送系が促進されて動脈硬化を抑制する方向へ働いているのかもしれない。また、ラットの実験ではエタノール摂取により血清 TG の有意な低下が見られた。TG 代謝は HDL 代謝と密接に関連しており、血清 TG の低下は動脈硬化に対し予防的である可能性が考えられる。核内受容体 PPAR の遺伝子発現増加や核内受容体 FXR の活性化などが血清 TG の低下に関与していると推測したが、細胞培養実験ではラットの実験結果を再現することはできなかった。今後、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Shinohata Ryoko, Shibakura Misako, Arao Yujiro, Watanabe Shogo, Hirohata Satoshi, Usui Shinichi	4. 巻 197
2. 論文標題 A high-fat/high-cholesterol diet, but not high-cholesterol alone, increases free cholesterol and apoE-rich HDL serum levels in rats and upregulates hepatic ABCA1 expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2022.01.011	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 Shinohata Ryoko, Shiga Yuhei, Miura Shin-ichiro, Hirohata Satoshi, Shibakura Misako, Ueno-Iio Tomoe, Watanabe Shogo, Arao Yujiro, Usui Shinichi	4. 巻 510
2. 論文標題 Low plasma apolipoprotein E-rich high-density lipoprotein levels in patients with metabolic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 531 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.08.020	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 Kumazaki Shota, Nakamura Mayu, Sasaki Shun, Tagashira Rina, Maruyama Nozomi, Sato Ikumi, Yamamoto Shusei, Ran Shang, Usui Shinichi, Shinohata Ryoko, Ohtsuki Takashi, Hirohata Satoshi, Kitamori Kazuya, Mori Mari, Yamori Yukio, Watanabe Shogo	4. 巻 9
2. 論文標題 Bile Acid Metabolism is an Intermediary Factor between Non-Alcoholic Steatohepatitis and Ischemic Heart Disease in SHRSP5/Dmcr Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition & Food Sciences	6. 最初と最後の頁 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35248/2155-9600.19.9.763	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 2件）

1. 発表者名 Shinohata R, Shibakura M, Ueno-Iio T, Arao Y, Watanabe S, Hirohata S, Okazaki M, Usui S
2. 発表標題 Analysis of Serum HDL Subclass in Mouse Obesity Models by Cation-Exchange Chromatography
3. 学会等名 71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinohata R, Watanabe S, Hirohata S, Nakajima K, Okazaki M, Usui S
2. 発表標題 Analysis of serum HDL subclass from rats with non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-cholesterol diet
3. 学会等名 70th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo (国際学会)
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
研究分担者	廣畑 聡 (HIROHATA Satoshi) (90332791)	岡山大学・保健学域・教授 (15301)	
研究分担者	柴倉 美砂子 (SHIBAKURA Misako) (30314694)	岡山大学・保健学域・准教授 (15301)	
研究分担者	篠畑 綾子 (SHINOHATA Ryoko) (70335587)	岡山大学・保健学域・助教 (15301)	

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
---------	---------