

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580144

研究課題名（和文） 食事酸化コレステロール誘導性脂肪肝の発症機構の解明

研究課題名（英文） Study on Fatty liver induced by dietary oxysterols

研究代表者

佐藤 匡央（SATO MASAO）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90294909

研究成果の概要（和文）：

酸化コレステロール中に脂肪肝発症に明らかに関わっている分子種が存在するのか？ という疑問に答えた。核内転写因子 LiverX receptor (LXR) が支配する脂肪酸合成酵素の上流域を用いて LXR のリガンドとなる酸化コレステロールは、 7α -hydroxycholesterol および 4β -hydroxycholesterol であった。同定する際に、いくつかのアンタゴニスト効果をもつ酸化コレステロールも発見された。

研究成果の概要（英文）：

There is a question what kinds of oxysterol induce fatty liver. The answer is 7α -hydroxycholesterol and 4β -hydroxycholesterol by the results from a detect system in which a reporter assay used with the promoter region of fatty acid synthase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝はメタボリックシンドロームの一つの病態である。その病因はアルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝(NASH)とに分けられる。NASHには、高脂肪摂取、四塩化炭素投与、低タンパク質高炭水化物食摂取(PEM)などのモデルが考えられている。今回この実験では酸化コレステロール誘導性モデルを提示する。前述したどのモデルもヒトの食生活とは解離した形で提示されている。NASHモデルの探索が続けられているが、ヒトの脂肪肝発症と相似したモデルは考案さ

れていない。その理由は、脂肪肝発症が単なる高エネルギー摂取のみでは説明できないことおよびヒトと動物の食事脂肪に対する応答が違うことによっている。一方、酸化ステロールは LXR のリガンドとして生体調節物質として確立された(BA. Janowski, et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α , Nature, 1996, 383:728-731)。申請者は、体外から摂取する酸化ステロールの内分泌攪乱性(業績15)およびその吸収輸送の研究(H. Tomoyori, M. Sato, et al. Lymphatic transport of

dietary cholesterol oxidation products, cholesterol and triacylglycerols in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002, 66, 828-834) を行った。

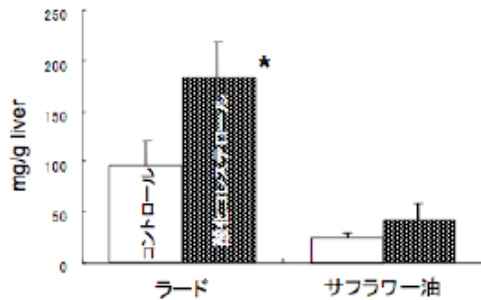


図1. 食事油脂の違いによる酸化コレステロールの肝臓トリアシルグリセロール蓄積に対する効果 * $p < 0.05$

食事酸化コレステロール摂取についていくつかの報告はあるが、脂肪肝は誘導されていない。しかし、マウスにおいて申請者はラードで飼育した場合、肝臓のトリアシルグリセロール量の増加が観察された。また、LXRが誘導する脂質合成による危険性は示唆にとどまっている。また、LXRの合成リガンドの投与は高脂血症、脂肪肝になること、さらにコレステロール吸収・輸送に関わることも申請者は報告している。これらのことから、食事酸化コレステロールが脂肪肝を誘導するには特定の食事条件が必須であることと考え、それは食事脂肪である可能性が示唆された。従って、ラードと同時にコレステロールを加熱により作出した酸化コレステロール混合物を摂食させると、サフラワー油を摂食させた時に比べて顕著に脂肪肝を発症する。(図1) この酸化コレステロール中にはLXRの誘導を促進するもの(22-hydroxycholesterol; 22-OH以下酸化コレステロールの表記はこのようにする、4 β -OH)および25-OHのように脂肪合成を促進する転写因子SREBP-1cの核内の移行を阻害して、脂肪合成を抑制するものが含まれている。(表1) また、脂肪酸の種類により食事酸化コレステロールの吸収が異なる可能性があるため、半永久リンパカニュレーション

表1. 肝臓中の各種酸化コレステロールの濃度

	ラード		サフラワー油	
	CONT	OC	CONT	OC
	ug/g liver			
Auto oxidation products				
7 β -hydroxycholesterol	0.834	15.115	0.906	4.825
α -epoxycholesterol	0.744	2.644	0.751	1.508
β -epoxycholesterol	0.955	1.677	0.976	1.122
β -cholestanetriol	0.633	0.955	0.687	0.939
7-ketocholesterol	0.758	0.943	0.710	0.632
α -cholestanetriol	n.d.	0.081	n.d.	n.d.
Auto and Enzymatic oxidation products				
7 α -hydroxycholesterol	1.385	1.588	0.671	0.475
25-hydroxycholesterol	0.198	0.439	0.133	0.154
Enzymatic oxidation products				
4 β -hydroxycholesterol	1.041	2.878	1.160	2.239
27-hydroxycholesterol	0.273	0.270	0.210	0.200
22-hydroxycholesterol	0.004	0.007	n.d.	0.005
24-hydroxycholesterol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

OC:酸化コレステロール食群

法により、ラットに同様の餌を給餌してのリンパ中の酸化コレステロール組成、トリアシルグリセロール量を測定した。その結果、酸化コレステロールの吸収量およびその組成は食事脂肪による違いはなく、トリアシルグリセロール輸送量にも違いはなかった。従って、これらの観察は、食事酸化コレステロールが肝臓内で脂肪酸と相乗効果を発揮して脂肪肝を発症させたと考えた。

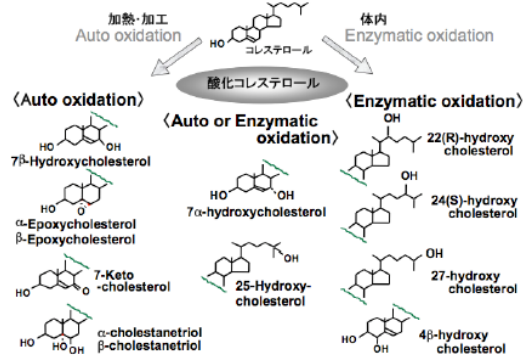


図2 現在までに同定および報告のある酸化コレステロール

図1. 食事油脂の違いによる酸化コレステロールの肝臓トリアシルグリセロール蓄積に対する効果 * $p < 0.05$

食事脂肪をラードとサフラワー油で飼育し、コレステロールを加熱して作出した酸化コレステロール混合物を食事に添加すると、ラードと酸化コレステロールを摂取した場合のみ、重度な脂肪肝を発症した。肝臓内の酸化コレステロールの分子種を調べるとサフラワー油と酸化コレステロール摂取群とは、その組成が明らかに違っていた。従って、本研究では以下の二つの問題を主に答えることにした、①酸化コレステロール中に脂肪肝発症に明らかに関わっている分子種が存在するのか？ ②酸化コレステロール誘導性脂肪肝発症にかかわる特定の脂肪酸および脂肪酸バランスは存在するのか？である。この研究により、現在罹患者の多い、脂肪肝の発症要因が食事の微量成分であること、またはその誘導には脂肪酸の摂取状況が関わっていることを明らかにする。

3. 研究の方法

①脂肪肝を誘導する(LXRのリガンドとなる)酸化コレステロールの同定

脂肪酸合成酵素の上流域をレポーターベクターの上流域に結合し、肝臓がん細胞(HepG2)に導入した。ラット肝臓内で同定された酸化コレステロールを生理的濃度に近い状態で添加し、ルシフェラーゼアッセイを行い評価した。(図3) また、ヒト血清および加熱生成で生じる酸化コレステロールで未同定のを同定、探索し、その効果も上記と同様な方法で行った。

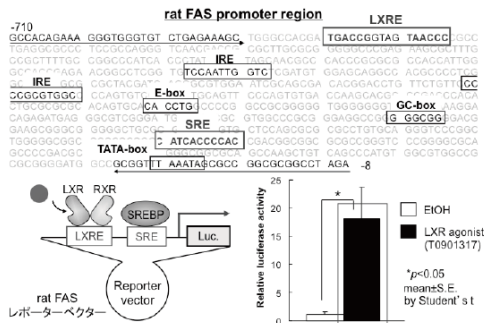


図3 脂肪酸合成酵素発現調節レポーターベクターの構築

②脂肪酸の関与

脂肪酸をより生理的に近い形で、試験を行うために、脂質エマルジョンの製造の検討を行った。

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用い、FAS 転写活性を増加した OC 分子種の同定をレポーターアッセイにより行った

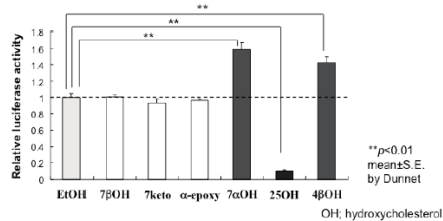


図4 脂肪酸合成酵素発現調節レポーターベクター実験結果

4. 研究成果

①脂肪肝を誘導する (LXR のリガンドとなる) 酸化コレステロールの同定

脂肪酸合成を増加させる酸化コレステロールは、7 α -OH および 4 β -OH であった。同定されている酸化コレステロールで低下させるものは 25-OH であった。未同定の酸化コレステロールの中から 2 種の酸化コレステロールが同定され、それらは LXR アンタゴニストであった。(図 4)

②脂肪酸の関与

脂質エマルジョンの粒子サイズを測定し、培養細胞で使用できるエマルジョンを作製

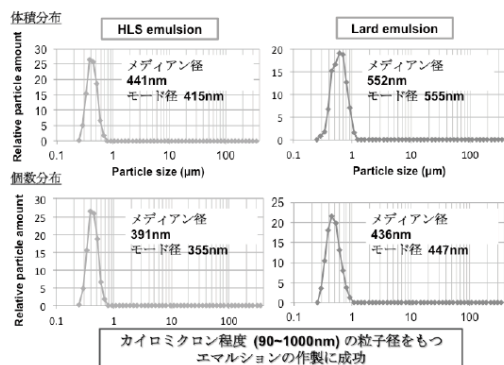


図5 人工エマルジョンの作製結果

できた。(図 5)

添加実験を行った結果、エマルジョンの取り込みがよくなかった。しかし、リポタンパク質レセプターのリガンドである、アポ E を混合するとその取り込みは、格段に向上した。なお、アポ E は大腸菌に発現させたリコンビナントを用いた。

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 1 件)

佐藤匡央、城内文吾、酸化コレステロールの生理的意義、オレオサイエンス、12(3),115-123、2012 年 03 月 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1. 佐藤匡央、酸化コレステロールと病態、アンチエイジングフェスタ 2011：抗加齢医学の実践、2011 年 12 月 02 日 (大阪)
2. 柳修平・大川知奈美・古賀舞子・今泉勝己・城内文吾・佐藤匡央、脂肪肝の発症を惹起する酸化コレステロール分子種の同定、平成 23 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会、2011 年 09 月 04 日 (佐賀)
3. 大澤徳子、中村有理、筒井辰憲、城内文吾、佐藤匡央、酸化コレステロール誘導性脂肪肝の発症機構に関する研究、第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011 年 7 月 9 日 (北九州)
4. 柳修平、古賀舞子、今泉勝己、城内文吾、佐藤匡央、脂肪肝の発症を惹起する酸化コレステロール分子種の同定、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日 (京都)
5. 佐藤匡央、酸化コレステロールの生理的意義、Cholesterol Metabolism Conference (CMC)、2011 年 02 月 20 日 (福岡)
6. 佐藤匡央、食事酸化コレステロールの脂肪肝発症の可能性、私立大学戦略的研究基盤形成事業主催 シンポジウム「酸化ストレスと健康」、2010 年 09 月 04 日 (東京)
7. 佐藤匡央、コレステロールと遺伝子発現、油化学関連シンポジウム in SAGA、2010 年 08 月 07 日 (佐賀)
8. 筒井辰憲、伊藤悠介、中村友理、荒川千代、今泉勝己、佐藤匡央、食事酸化コレステロールによる脂肪肝発症機構の解明、第 64 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 05 月 23 日 (徳島)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 匡央 (SATO MASAO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90294909