

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658112

研究課題名(和文)トランス脂肪酸はプラスマローゲンに組み込まれて動脈硬化を惹起するのか？

研究課題名(英文)Determination of atherogenic properties in plasmalogens including trans-fatty acid.

研究代表者

原博(HARA, HIROSHI)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70198894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：プラスマローゲン(PIs)はグリセロリン脂質のサブクラスであり、ラジカル感受性が高いため動脈硬化防御因子と考えられている。一方、動脈硬化惹起性が知られているトランス脂肪酸の作用機構は不明な点が多い。トランス脂肪酸高含有食をラットに4週間以上摂取させ、LC-MS/MSによりPIs分子種分析を行った結果、PIsにトランス脂肪酸が多く取り込まれた。このラット血清よりLDL分画を調製し、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に添加した結果、細胞接着因子であるVCAM1および単球遊走因子MCP1の発現が増加した。トランス脂肪酸含有PIsは、血管内皮細胞において動脈硬化惹起性変化を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasmalogen is a subclass of glycerophospholipids with radical-sensitive chemical structure, and suggested as an endogenous anti-atherogenic factor. Fatty acids with trans form are well-known atherogenic dietary components, however, the mechanisms are not fully clarified. We found that a trans-form FA was abundantly incorporated into plasmalogen molecules by feeding of trans fatty acids for 4 weeks in rats. Application of a LDL fraction of trans fatty acid-fed rats to a cultured blood vessel endothelial cell, HUVEC, enhanced gene and protein expression of VCAM1, an adhesion factor for monocyte to blood vessel endothelium, and MCP1, a chemoattractant for monocyte in the cells. These results suggest that trans fatty acids incorporated into plasmalogen is an inducer of the atherogenic changes in the blood vessels.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：プラスマローゲン トランス脂肪酸 動脈硬化 血管内皮細胞 LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

プラスマローゲンはリポタンパク質にも含まれ、その分子内 *sn*-1 位のビニルエーテル結合は高いラジカル感受性を有することから、リポタンパク質中のコレステロールの酸化を抑制し、また血管内皮を適正に保つことにより、動脈硬化巣の発生を防御する因子として機能すると考えられる。さらに、免疫細胞や神経細胞膜では主要なリン脂質であり、脂質メディエーター合成や神経伝達物質放出に主要な役割を持つといわれ、動脈硬化巣形成における重要なステージである、血管内皮の炎症へのかかわりも想定される。

私どもは健康人約 500 名分の血清を分析し、総プラスマローゲンが動脈硬化指数と負相関し、さらに LC-MS/MS を用いた分子種分析から特定の脂肪酸を含むプラスマローゲン分子が、動脈硬化指数と相関係数 $R = -0.723$ という極めて強い負の相関を示すことを見いだした ($n=500$ の場合、 $R = -0.115$ で $P < 0.01$ の有意な相関となる)。プラスマローゲンには 100 以上の分子種が存在し、この臨床試験結果は、コレステロールの酸化防止といったプラスマローゲンの全量変動が関与する機構とともに、特定の分子種が動脈硬化発症に直接関係することを強く示唆する結果であった。

食品中のトランス脂肪酸は、動脈硬化発症の危険因子であることが明らかになっており、日本を含め世界中で大きな問題となっている。しかし、トランス脂肪酸がどのような機構で動脈硬化と関連するのかはほとんど不明である。私どもは、血清プラスマローゲンレベルに影響を与える食品因子を検索する中で、トランス脂肪酸をラットに摂取させると、血清プラスマローゲン濃度が低下するとともに、そのビニルエーテル結合に連なる *sn*-1 位に、トランス脂肪酸由来の炭素鎖が高度に濃縮されていることを見いだした。このことから、私どもはトランス脂肪酸が動脈硬化を引き起こす 1 つの機構として、この脂肪酸がプラスマローゲンに組み込まれることが、血管内皮における動脈硬化巣形成のいずれかのステージを促進すると推定した。

2. 研究の目的

トランス脂肪酸の動脈硬化惹起に関する分子レベルでの作用機構は未だ不明である。本研究は、トランス脂肪酸と動脈硬化発症をつなぐ機構として、トランス脂肪酸がリン脂質であるプラスマローゲンに組み込まれるという新しい現象が、動脈硬化リスクになり得るのか、あるいはどのように係わるのかを明らかにすることを目的とした。すなわち、体内においてプラスマローゲンにトランス脂肪酸由来の構造が組み込まれ、プラスマローゲンの抗動脈硬化因子 (分子) としての機能が失われること、あるいは組み込まれたプラスマローゲン分子が動脈硬化惹起性を有する、という仮説の証明である。動脈硬化巣形成において、血管内皮に単球が接着し内皮下へ浸潤することにより、マクロファージへ分化することが重要なステージとなる。本研究の目的は、長期間トランス脂肪酸を摂取させたラットより、血清を採取し LDL を調製して培養血管内皮細胞に添加し、単球の接着にかかわる分子の発現変動を観察する。また、トランス脂肪酸が体のどこで、どのようにしてプラスマローゲンに組み込まれるかを、リンパカニューレションラットを用いて明らかにすることである。さらに、動脈硬化症と関係する心臓や動脈壁リン脂質への、トランス脂肪酸の組み込みに関しても、LC-MS/MS を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) トランス脂肪酸が組み込まれたプラスマローゲンの動脈硬化惹起作用

トランス脂肪酸供給源として、菜種硬化油 (約 40% のエライジン酸含有) を用いた試験飼料を摂取させたラットから血液や組織を採取する。トランス脂肪酸が組み込まれたプラスマローゲンを含む血清、LDL を、対照群のものと比較しながら、培養血管内皮細胞に添加して、単球接着にかかわる VCAM1、ICAM1、内皮の炎症にかかわるエンドセリン 1、血管壁への単球誘因にかかわるケモカインである MCP1 の発現 (遺伝子、タンパク質) を、定量 PCR 法、Western blot 法、ELISA 法で定量する。

ラット

Wistar-ST 系の雄ラット (三協ラボサービス株式会社) を個別にケージに入れ、室温 22~24°C、湿度 40~60%、12 時間の明暗周期を下 (明期: 8~20 時、暗期: 20~8 時)、AIN93G を基本とした試験飼料と水を自由摂取させた。一週間の予備飼育の後、対照 (基本飼料) 群 (大豆油 7%) と、その糖源の 23% をナタネ硬化油 (38% トランス脂肪酸含有) で置換した 30% 高脂肪食群の 2 群に分け、1 ヶ月以上飼育した。

LDL調製

比重の異なる液を用いたステップワイズ、超遠心法（日立 CS100GXL、ロータ S100AT6）により、ラット血清から LDL 分画得た。

血管内皮培養細胞

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (LONZA 社) を用いた。各試験間でのロット差を少なくするため、複数ドナー由来の細胞を用いた。培養条件は、HUVEC を 6 well プレートに 1.0×10^5 cells/well で播種し、コンフルエントに到達したことを確認後、試験培地を添加し、5%CO₂、37°C で培養した LDL 分画、および希釈血清を添加して 6 時間ないし 24 時間培養し、血管内皮細胞における単球接着因子や炎症惹起因子の測定を行った。

mRNA 定量

培養した HUVEC から培地を除き、TRI reagent (Sigma) を用いて RNA を抽出した。TaqMan® ケミストリを用いて、各たんぱく質 mRNA 発現量を定量した。

培地へ放出された因子定量：

Endothelin1 ELISA KIT (Enzo Life Sciences, ADI-900-020A)
MCP-1 ELISA Kit (Ray BioTech, ELH-MCP1-001)

(2) プラスマローゲンへのトランス脂肪酸が組み込み機構

プラスマローゲンのおもな合成部位は、肝臓であると考えられているが、私どもはプラスマローゲン合成、脂肪酸の組み換えが小腸上皮細胞で行われることを明らかにした。プラスマローゲンを含むリン脂質分子種へのトランス脂肪酸の組み込みが小腸で起こるかを、胸管（リンパ管）にカニューレを留置したラットを用いて検討した。

各脂質分析、および LC-MS/MS によるリン脂質分子種分析：

リンパ液および各ラット組織は、解凍後脂質を抽出した。リンパ液は凍結乾燥後、クロロホルム・メタノール (1:2) を、ラット組織にはブライ・ダイアール法を用いた。トリグリセリドは、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬）で分析した。また、全リン脂質は湿性灰化後、リン酸を Bartlett 法により定量した。

プラスマローゲンは LC-MS/MS (Thermo scientific) を用いて、Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードにより、クラス別、分子種別定量を行った。測定分子種は *sn-1* 位が 16:0、18:0、18:1 の 3 種、*sn-2* 位は 16:0 から 22:6 の 10 種の計 60 分子種を測定した。

(3) トランス脂肪酸摂取ラットにおける、心臓、血管壁リン脂質分子種の LC-MS/MS による解析

研究 1) で用いたラットと同様、Wistar-ST 系雄性ラットを 1 週間予備飼育した後、AIN93G 基本飼料の糖源の 23% をナタネ硬化油 (38% トランス脂肪酸含有) で置換した 30% 高脂肪食を用いて、約 4 か月間試験飼育した。試験飼育終了後、ペントバルビタール麻酔下で、放血屠殺し組織を摘出した。組織は、分析まで -80°C にて保存し、先に述べた方法にて、脂質抽出後 LC-MS/MS を用いて、プラスマローゲンの分子種分析を行った。

4. 研究成果

(1) トランス脂肪酸が組みこまれたプラスマローゲンの動脈硬化惹起作用

試験培地添加後の 6 時間と 24 時間で細胞を回収し、mRNA レベルを測定した。6 時間の結果は、希釈血漿、および LDL 分画添加ともに、大きな変動がみられなかったため、24 時間培養の結果のみを示す (図 1)。血漿添加の 4 群では無添加群と比較して発現の増加は見られず、むしろ低下傾向にあった。一方、LDL 分画添加の 4 群では測定したすべての mRNA レベルが増加し、Endothelin 1 を除いて、トランス脂肪酸食群の LDL 添加においてより大きく、また LDL 添加濃度に応じて増加した。個別の mRNA 別にみると、VCAM1 の増加が最も顕著であった。Endothelin 1 では、トランス脂肪酸食群 LDL20% 添加では、10% LDL 添加に比べ低下傾向にあったため、添加量が過剰であったことが考えられる。また、血漿の形で添加するのがより生理的であるが、いずれの mRNA レベルにおいても変動はみられなかった。これら血漿には、LDL 分画添加群と同じ濃度の LDL が含まれるため、LDL 以外の血漿成分に mRNA レベルの上昇を抑制する因子が含まれていることを示唆している。

細胞上清中に分泌された MCP1、Endothelin 1 はそれぞれの mRNA レベルと類似した変動を示した (図 2)。すなわち、LDL 分画添加により、MCP1 分泌は有意に、また添加量に応じた増加を示し、トランス脂肪酸摂取群でその増加はより大きい傾向であった。Endothelin 1 分泌は LDL 分画添加で増加したものの、添加量や飼料摂取群間の差はみられず、mRNA レベルの変動と同じであった。以上の結果は、トランス脂肪酸摂取ラットの LDL 分画には、血管内皮細胞に対して単球を誘引し、またその接着を促進する性質を誘導することが明らかになった。単球の誘因、接着は血管内皮下への単球の浸潤を促し、マクロファージへの分化を促進する。すなわち、トランス脂肪酸の摂取は、血管内皮に炎症を惹起して動脈硬化を引き起こしやすい性質を誘導すること

を示唆している。このことが、トランス脂肪酸の動脈硬化惹起作用の一因となっていると思われる。

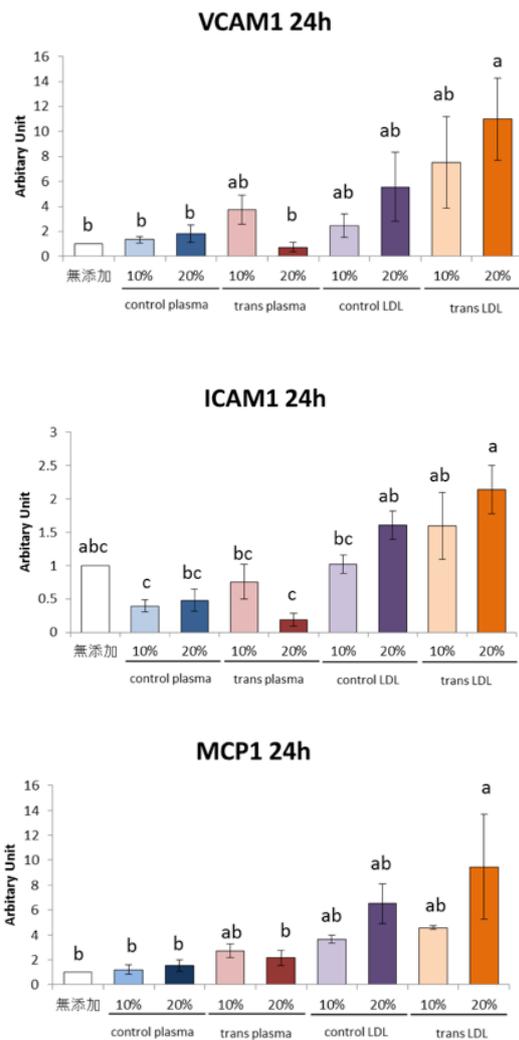


図 1 血管内皮培養細胞、HUVEC における、ラット血漿ないし LDL 分画添加後 24 時間の単球接着因子(VCAM1, ICAM1)および単球誘因ケモカイン (MCP1) の mRNA レベル変動
数値は、平均±SEM, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer's test)

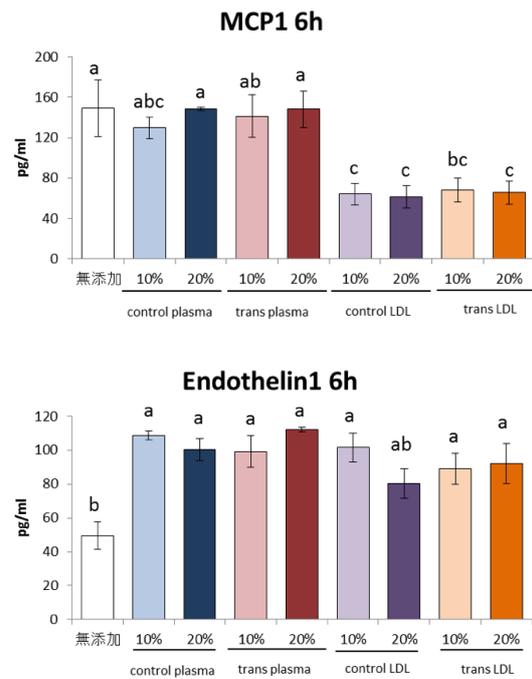


図 2 血管内皮培養細胞、HUVEC における、ラット血漿ないし LDL 分画添加後 6 時間の単球誘因ケモカイン (MCP1) および Endothelin1 の培地への分泌量
数値は、平均±SEM, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer's test)

(2) プラズマローゲンへのトランス脂肪酸が組み込み機構

小腸におけるトランス脂肪酸の組み込みはみられなかった。

(3) トランス脂肪酸摂取ラットにおける、心臓、血管壁リン脂質分子種の LC-MS/MS による解析

これまでに、長期トランス脂肪酸（菜種硬化油）摂取により、血清プラズマローゲンにトランス脂肪酸が組みこまれることを見いだした。本研究では、動脈硬化症や心筋梗塞に直接関連する組織である、上大動脈血管壁および心臓における、プラズマローゲンへのトランス脂肪酸取込を検討した。

動脈壁プラズマローゲン含量は、絶対量が少ないコリンクラスにおいて、Trans 群でその含量が大きく減少していたが、エタノールアミンクラスでは減少は見られなかった。この点に関して、先と同様 sn-1 位別にみると、エタノールアミンクラスでは Trans 群で 16:0 が大きく減少、これとほぼ同量の 18:1 が増加していた。一方で、コリンクラスでは 16:0 と 18:0 が、Trans 群で著明に減少しているが、18:1 ではこの減少が見られなかった。この sn-1 位の 18:1 の挙動は、トランス型の 18:1 が多くここに組みこまれているためと考えられる。

心臓におけるプラズマローゲン総量は、

Trans 群においてエタノールアミンクラスは増加、コリンクラスでは減少した。sn-1 位別では、両クラスとも 16:0 が減少し、18:1 が大きく増加していた。ここでも、18:1 にトランス型が多く組みこまれていることを示唆している。トランス型 18:1 を除いたグラフを示したが、両クラスとも 16:0 が大きく減少していることが分かった。

本研究で明らかになったこと

- ①トランス脂肪酸を摂取した LDL には、血管内皮細胞に対して炎症惹起作用があることが示された
- ②トランス脂肪酸は、プラスマローゲンに腸ではなく肝臓で組みこまれることが示唆された
- ③トランス脂肪酸長期摂取で、動脈壁や心臓プラスマローゲンにも多くのトランス脂肪酸が組みこまれる

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

① Shun Chiba, Hiroshi Hara
Rats LDL including trans-type
plasmalogens induces inflammatory
factors in Human Umbilical Vein
Endothelial Cells.
Experimental Biology 2014 (EB2014)
2014. 4. 26-5. 1 San Diego Convention Center
(CA, USA).

② 千葉 俊, 西向 めぐみ, 原 博
食事中のトランス脂肪酸は小腸においてジ
アシル型リン脂質の sn-1 位へ大量に組み込
まれる
第 19 回 Hindgut Club Japan シンポジウム
平成 25 年 12 月 7 日 (専修大学、東京)

③ 千葉 俊, 西向 めぐみ, 原 博
食事中のトランス脂肪酸は細胞膜やリポタ
ンパク質中のリン脂質へ大量に組込まれる
第 11 回日本栄養改善学会北海道支部学術総
会、平成 25 年 12 月 1 日 (北海道大学、札幌)

④ 原 博
プラスマローゲン最近の話題
第 25 回夏期油脂・コレステロール研究会
平成 25 年 7 月 19-21 日 (愛媛大学、松山)

⑤ 千葉 俊, 原 博
トランス脂肪酸が組み込まれたプラスマロ
ーゲンを含むラット LDL は、血管内皮細胞
における炎症惹起因子を誘導する
第 67 回日本栄養・食糧学会大会、平成 25 年
5 月 24-26 日 (名古屋大学、名古屋)

⑥ 千葉 俊, 西向 めぐみ, 原 博
長期トランス脂肪酸食摂取ラットにおける
抗動脈硬化リン脂質プラスマローゲンの変
動
日本農芸化学会 2013 年度大会
平成 25 年 3 月 24-27 日 (東北大学、仙台)

⑦ 千葉 俊, 西向 めぐみ, 原 博
トランス脂肪酸長期摂取ラットにおける抗
動脈硬化因子プラスマローゲンの変動
第 42 回日本栄養・食糧学会北海道支部会
平成 24 年 10 月 27 日 (十勝プラザ、帯広)

⑧ 山元貴之, 西向めぐみ, 山崎裕也,
小池誠治, 前場良太, 原 博
トランス脂肪酸は、オキアミ由来アルキルリ
ン脂質の吸収とプラスマローゲンへの変換
を阻害する
第 66 回日本栄養・食糧学会大会
平成 24 年 5 月 18-20 日 (東北大学、仙台)

[図書] (計 0 件)

[産業財産]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 博 (HARA, Hiroshi)
北海道大学大学院・農学研究院・教授

研究者番号：70198894

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：