

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 6 日現在

機関番号：32682  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25450183  
研究課題名(和文) 食事由来酸化コレステロールの体内動態、クリアランス機構及び有害作用予防策の解明  
  
研究課題名(英文) Elucidation of in vivo kinetics and clearance mechanism on dietary oxidized cholesterol  
  
研究代表者  
長田 恭一 (Osada, Kyoichi)  
  
明治大学・農学部・専任教授  
  
研究者番号：30271795  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食事により摂取された酸化コレステロールは、コレステロールと同様にリポタンパクに組み込まれて末梢組織に供給されることが明らかとなった。様々な疾患に関連する7-ketocholesterolの代謝は加齢とともに代謝されにくくなることが予想された。こうした加齢による7-ketocholesterolの代謝の変化が、加齢に伴って発症リスクが高くなる疾患の発症に関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Dietary oxidized cholesterol was incorporated into lipoprotein as well as cholesterol and transported to peripheral tissues. 7-Ketocholesterol related to various diseases may be difficult to be metabolized with age. Therefore, the modulation in metabolism of 7-ketocholesterol may be related to the onset of a disease with an increased risk of developing with age.

研究分野：食品栄養化学

キーワード：酸化コレステロール 脂質代謝 加工食品 クリアランス 蓄積

1. 研究開始当初の背景

食品中のコレステロールが酸化されると様々な酸化コレステロールが生成する。酸化コレステロールは細胞毒性が強く、発がんや動脈硬化発症に関わっていることが明らかになっている。しかし、食事由来の酸化コレステロールの体内動態は明らかになっておらず、そのクリアランス機構もよくわかっていない。また、最近になって加工食品や生体内に検出される 6-ketocholestanol について、その酸化行程と生体諸機能に与える影響も不明である。

2. 研究の目的

生体内で検出される酸化コレステロールは、代謝上必要となる成分として生成するものや酸化ストレスにより生成するものもあるが、それらのレベルを考えるとその大半が食事由来で吸収されてきたものであると考えられるが、その体内での動態は不明な部分が多い。本研究では、食事由来で体内に吸収される主要な酸化コレステロールの体内動態とクリアランス機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化コレステロール(0xc)の生体内動態を調べるために重水素標識したコレステロールを加熱酸化して精製し、8週齢のWistar系雄性ラットに投与し、12時間後に解剖して種々の組織と血漿中の0xcをGC-MSを用いて解析した。また、血漿についてはリポ蛋白質を分画して0xcのレベルを解析した。

(2) 重水素標識体であるCholesterol-d<sub>7</sub>から作成した0xc-d<sub>7</sub>あるいは7KC-d<sub>7</sub>を胆管カニューレーションを施したラットに経口投与し、48時間後の生体内のcholesterol-d<sub>7</sub>、種々の0xc-d<sub>7</sub>分子種ならびに7-ketocholesterol(7KC)-d<sub>7</sub>の分布をGC-MS分析で検討した。また、分泌された胆汁中に種々の0xc-d<sub>7</sub>が排泄されているかどうかについても検討した。また、0xcを添加した飼料を与えたマウスあるいはラットの糞および尿中の0xc、とくに7KC硫酸化物をLC/MS分析で検討し、生体内での0xcの硫酸化の有無について検証した。

(3) 年齢および性の違いによる7KCの代謝の変化を調べるために、週齢の異なる雌雄のラットに0xcを経口投与して検討した。また、ラットの肝臓からミクロソームを調製し、11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1(11-HSD1)による7-KCの代謝変換の有無についても検討した

4. 研究成果

(1) 各リポ蛋白質に酸化コレステロールが存在しており、かつ、種々の臓器内にも酸化コレステロールが検出された。酸化コレステロ

ールの分子種によっては検出レベルの増大に違いが認められた。この結果から酸化コレステロールはコレステロール同様にリポ蛋白質に組み込まれて末梢組織に運搬されることが明らかとなった。

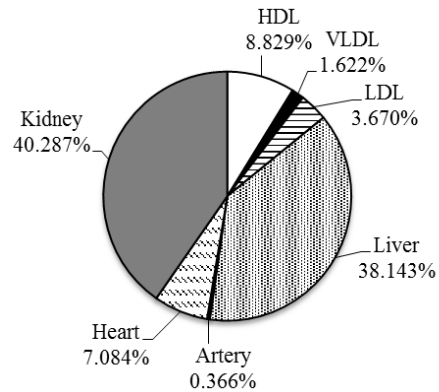


Fig.1 Oxc-d<sub>7</sub>を投与したラットの生体内Oxc-d<sub>7</sub>の分布

(2) 胆汁中の0xc-d<sub>7</sub>分子種については、cholesterol-d<sub>7</sub>と比べてそのレベルは低かったが、7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>、7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>および7KC-d<sub>7</sub>が検出された。7KC-d<sub>7</sub>を投与した場合には、その大半が腎臓で検出された。また、生体内から7KC-d<sub>7</sub>以外に、cholesterol-d<sub>7</sub>や7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>が検出された。検出された7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>は11-HSD1によって、7KC-d<sub>7</sub>から変換されて生成されたものと考えられた。さらに、動脈にはcholesterol-d<sub>7</sub>、7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>の他に6-ketocholestanol-d<sub>7</sub>が検出された。胆汁中には7KC-d<sub>7</sub>および7-hydroxycholesterol-d<sub>7</sub>が検出された。0xcを含む飼料を摂取したラットから排出された糞および尿中に7KC硫酸化物が存在するかどうかを調べたところ、糞中からは7KC硫酸化物が検出された。よって、外因性の7KCは生体内ではFig.2に示すようにSulfotransferase family cytosolic 2B member 1 (SULT2B1b)により硫酸化されて生体外に排出される可能性が示唆された。一方、尿中には7KC硫酸化物の存在は確認できなかった。

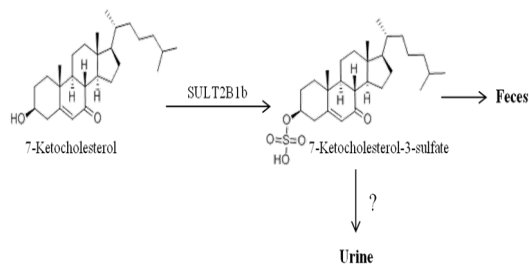


Fig.2 7KCの硫酸化反応による生体外排泄経路

(3)11 -HSD1 は、不活性型の glucocorticoid の 11 位のケト基をヒドロキシ基に変換して活性型 glucocorticoid へ変換する酵素として知られている。最近になって、7KC も 11 -HSD1 により 7 -hydroxycholesterol に変換されることが明らかになってきている。Oxc をラットに経口投与したところ、肝臓の 7 -hydroxycholesterol レベルは週齢と性の違いによる影響は認められなかったが、7KC レベルは、雄群に比べて雌群で高くなったため、7 -hydroxycholesterol/7KC 比は、雌群に比べ雄群で高くなり、性の違いによる影響が有意であった。これは、11 -HSD1 の mRNA 発現レベルが estrogen によって抑制されることが影響したのではないと思われる。以上のことから、ラットの場合、雌に比べて雄は、11 -HSD1 による 7KC の 7 -hydroxycholesterol への代謝変換が活発に行われていると考えられた。

次に、週齢および性の異なるラットの肝ミクロソームを用いて、7KC から 7 -hydroxycholesterol への変換反応を行った。その結果、雌と比べて雄で、7KC の変換が活発に行われていることが確認された。この結果は、上記の in vivo での結果とほぼ一致した。一方、変換された 7 -hydroxycholesterol レベルは、in vivo の結果と異なり、性の違いによる影響だけでなく、年齢の違いによる影響に有意差が認められた。そのため、11 -HSD1 による変換の指標となる 7 -hydroxycholesterol/7KC 比についても年齢の違いによる影響が有意であり、その比は老齢群に比べて若齢群で高くなった。これらの結果から、ラットでは 11 -HSD1 による 7KC の代謝反応は、若齢期には活発に行われることが明らかとなった。以上のことから、11 -HSD1 による 7KC の代謝反応は、年齢および性の違いにより変化することが明らかとなった。このような 7KC の代謝変換の変化が、加齢に伴って動脈硬化を発症しやすくなること、また、女性が高齢になると動脈硬化を発症しやすくなることに関連しているかもしれない。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Terunuma S, Kumata N, Osada K. Ezetimibe impairs uptake of dietary cholesterol oxidation products and reduces alterations in hepatic cholesterol metabolism and antioxidant function in rats *Lipids*, 査読有、Vol.48, 2013, pp.587-595.

Yui K, Kiyofuji A, Osada K. Effects of xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Journal of Oleo Science*, 査読有、Vol.63, 2014, pp.159-168.

Kawakami Y, Kiyosawa T, Nakamura S, Osada K. Effects of isoflavone supplementation on disturbances in lipid

metabolism and antioxidant system due to exogenous cholesterol oxidation products in rats. *J. Functional Foods*, 査読有、Vol.7, 2014, pp.212-218.

長田恭一. 食事由来の酸化コレステロールに関する最近の研究. *Food STYLE* Vol.18, 2014, pp.56-60.

Deushi M, Osaka M, Nakano K, Osada K, Egashira K, Yoshida M. Ezetimibe reduced hepatic steatosis induced by dietary oxysterols in nonhuman primates. *FEBS open bio*, 査読有、Vol.6, 2016, pp.1008-1015.

関原花会、古木葵、長田恭一. 外因性酸化コレステロール、とくに 7-ketocholesterol の体内動態とクリアランス機構. *脂質生化学研究*, 査読有、Vol.58, 2016, pp.27-31 2016.

〔学会発表〕(計 8 件)

長田恭一. 酸化コレステロールの摂取量と最近の研究について. 日本栄養食糧学会関東支部会第 16 回脂質栄養シンポジウム

小川莉絵子、照沼彰一郎、関原花会、長田恭一、松島芳文. 日本栄養食糧学 2013 年度大会

関原花会、小川莉絵子、細野佑紀子、木村優、長田恭一. 乾燥卵黄パウダー中の酸化コレステロールの摂取による脂質代謝への影響. 日本食品科学工学会 2013 年度大会

関原花会、木村優、長田恭一. 食事由来酸化コレステロールの生体内酸化システムへの影響. 日本農芸化学会 2015 年度大会

長田恭一、細野佑紀子. 週齢の異なる雌雄ラットにおける食事由来酸化コレステロールの代謝. 日本農芸化学会 2015 年度大会

関原花会、古木葵、長田恭一. 年齢及び性の違いによる酸化コレステロールの代謝の変化. 日本農芸化学会 2016 年度大会

加藤慧土、大谷祥穂、古木葵、長田恭一. 外因性酸化コレステロールの生体内分布と有害作用の検証. 日本食品科学工学会 2016 年度大会

加藤慧土、中堀紘花、長田恭一. 外因性酸化コレステロールの生体内分布と有害作用の検証. 日本農芸化学会 2017 年度大会

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

長田 恭一 (OSADA Kyoichi)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：30271795

(4)研究協力者

照沼彰一郎 (TERUNUMA Schoichiro)

関原花会 (SEKIHARA Hanae)

小川莉絵子 (OGAWA Eriko)

細野佑紀子 (HOSONO Yukiko)

加藤慧士 (Kato Satoshi)

大谷祥穂 (OTANI Sachihō)

由井一季 (YUI Kazuki)

川上祐生 (KAWAKAMI Yuki)