

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350139

研究課題名(和文) 小腸を介したコレステロール逆転送を活性化するポリフェノールの網羅的探索

研究課題名(英文) Study on reverse cholesterol transport via small intestine by polyphenol

研究代表者

近藤 春美 (KONDO, Harumi)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80401602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々はコレステロール吸収阻害がコレステロール逆転送(RCT)を活性化することを報告した。当初研究を予定していたコレステロール吸収阻害作用を有するポリフェノールの網羅的探索については、本実験の開始と同時期にNekohashiらにより論文に掲載されたので、これらの実験は省略し、論文で効果のあったポリフェノールでRCT実験を行った。このうち、クルクミンとケルセチンに着目してRCT実験を検討したが、活性化は認められなかった。従って、コレステロール吸収抑制作用を有するポリフェノールであるクルクミンとケルセチンではRCTを活性化しなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have revealed that the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe promoted reverse cholesterol transport (RCT) in hamsters. Some polyphenols have reported to enhance cholesterol efflux from macrophages. Several papers reported that curcumin and quercetin inhibited cholesterol absorption in vitro, it remains unclear whether it affects RCT functions. Therefore, we examined whether administration of curcumin or quercetin to hamsters fed a high cholesterol diet regulates RCT from macrophages, but they did not increase RCT. In conclusion, curcumin and quercetin did not affect the inhibition of cholesterol absorption and enhance RCT from the macrophages under the condition of our study.

研究分野：食品栄養

キーワード：コレステロール ポリフェノール 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1) 心血管疾患は癌とともにわが国の主要な死因であり、動脈硬化を基盤として発症する。動脈硬化は、血管内皮下に進入した低比重リポタンパク質 (LDL) が酸化変性を受け、マクロファージに貪食されて泡沫化することから始まると考えられている。近年の薬物を使った大規模臨床試験によって LDL 低下療法が心血管疾患リスクの軽減に有効であることが示されたが、その予防効果は 3 割程度に留まる。したがって、残り 7 割のリスクを軽減する物質を見つけることは重要課題であり、その一つとして高比重リポタンパク質 (HDL) が次世代の動脈硬化予防のキーとなる分子として注目を集めている。一方、国内外の数多くの疫学調査において、心血管疾患と負の相関関係を示すことから HDL が抗動脈硬化性リポタンパク質と考えられている。これは、HDL が血管壁の余剰なコレステロールを引抜き、肝臓、さらには胆汁を介して糞便中へと排泄する抗動脈硬化機能を有するからである¹⁾。動脈硬化巣マクロファージと同様に、小腸におけるコレステロール吸収制御もコレステロール逆転送活性化戦略のひとつとして脚光を浴びている²⁾。

(2) 近年、新たな高コレステロール血症治療薬としてエゼチミブが開発された。エゼチミブは多くの候補化合物から網羅的な探索によりコレステロール吸収を阻害する化合物として発見されたが、後にこのエゼチミブは、小腸の管腔側膜上に局在するコレステロールトランスポーターである NPC1L1 (Niemann-pick C1 like 1) の細胞外ループに結合し構造を変化させることで、コレステロールの吸収を非競合的に阻害することによりコレステロール吸収阻害作用を発揮

することが明らかとなった。ストロングスタチンといわれる LDL 低下効果の高いスタチンは NPC1L1 発現を増加させることにより小腸からのコレステロール吸収を亢進させる。そのため本来持つ LDL 低下効果が減弱する「スタチン抵抗性」が現れる。我々は、最近エゼチミブの投与がコレステロール逆転送を活性化することを見出した³⁾。その活性化作用は HDL の変化とは独立して発揮され、コレステロール逆転送におけるコレステロール吸収阻害の重要性が示唆された。一方、いくつかのポリフェノールはコレステロール吸収阻害作用を有することが示されているが、その作用機序は不明であった。しかし、近年ウコンのポリフェノールであるクルクミンの HDL-C 増加作用などに加え⁴⁾、小腸上皮様細胞 Caco2 細胞の NPC1L1 発現を減少させてコレステロール吸収を阻害することが報告された⁵⁾⁶⁾。

2. 研究の目的

(1) コレステロール逆転送活性化作用は HDL の変化とは独立して発揮され、コレステロール逆転送におけるコレステロール吸収阻害の重要性が示唆された。一方、いくつかのポリフェノールはコレステロール吸収阻害作用を有することが示されているが、その作用機序は不明であった。そこで、本研究では小腸におけるコレステロール吸収を阻害しコレステロール逆転送活性化作用を有するポリフェノールの存在が期待できる。

(2) そこで本研究では、ポリフェノールによる小腸を介したコレステロール逆転送活性化について検討することを目的とした。尚、申請時予定していたコレステロール吸収阻害作用を有するポリフェノール

の網羅的検索については、本実験の開始と同時期にNekohashiらの論文⁷⁾に掲載されたので実験は省略し、論文中で効果のあったポリフェノールであるケルセチンと既報で報告のあったクルクミンを用いたコレステロール逆転送実験に変更した。

3. 研究の方法

(1) 試薬

クルクミンおよびケルセチンはシグマ社、³H-コレステロールはパーキン・エルマーより購入した。

(2) 実験動物および薬物処置

Golden Syrian ハムスターは日本エスエルシー (株) より6 週齢の雄性ハムスター16 匹を購入した。高コレステロール食 (HC) 群には0.5%コレステロール含有MF (オリエンタル酵母(株)) を、高コレステロール+クルクミン食 (HC+Curcumin) 群には0.2%クルクミンおよび0.5%コレステロール含有MF を12週間自由摂取させた。なお、動物実験に関しては、防衛医科大学校における動物実験の実施に関する規程を遵守した。

(3) 総RNA抽出およびリアルタイムRT-PCR

採取した空腸から総RNAを抽出し、リアルタイムPCRによりmRNAの発現レベルを検討した。空腸25 mgを1 mLのTRIzol試薬 (TaKaRa) でホモジナイズし総RNAの抽出を行い、これを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い cDNAを得た。Real-time PCR による増幅反応には、ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) を用いた³⁾。

(4) 腹腔マクロファージの採取

ハムスター 8 匹に、2.5 MBq/匹の ³H-コレステロールおよび 54.3 μL/匹のイントラリポス 20% (大塚製薬工場(株)) を含む生理食塩水を 0.5 mL 腹腔注射した。24 時間後、ハムスターの腹部を消毒し、皮膚を

切開し腹膜を露出させ、下腹部より 4°C に冷却した 0.5%BSA/2 nM

EDTA/PBS (B/E-PBS) を注射筒で 10mL 腹腔内に注入し、腹部を指で振盪させた後に注入に用いた注射筒で回収した。

B/E-PBS の注入・回収は 1 匹あたり 2 回ずつ行った。採取した腹腔マクロファージは遠心管に入れ、1,000 rpm、5 分間遠心し、0.5 mL の DMEM 培地に再懸濁した³⁾。

(5) コレステロール逆転送実験

飼育 12 週間後、上記のように ³H をラベルしたハムスターの腹腔マクロファージをハムスターに 0.5 mL ずつ腹腔注射した。腹腔注射後 24、48 および 72 時間後に胸部大静脈から採血し血漿を得た。4 時間の空腹期間をおき、腹腔注射後 72 時間に安楽死させ、4°C に冷却した PBS を心臓から還流したのち、肝臓、空腸と胆嚢を採取した。肝臓は PBS でホモジナイズした後に、クロロホルム：メタノール (=2:1, Vol/Vol) を加え、1,000 rpm/分、10 分間の後、クロロホルム層を回収した。窒素ガスで蒸散させた後、ヘキサン：イソプロピルアルコール (=3:2, Vol/Vol) で再溶解し、³H の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。胆嚢は直接穿刺し、胆汁 2 μL の ³H の放射活性を測定した⁸⁾。糞便は腹腔マクロファージを注射後 72 時間まで集め、便 100 mg 当たり 1 mL の水を加え 16 時間、4°C で浸漬した後、同量のエタノールを加えてホモジナイズし、便中に含まれる ³H 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した³⁾⁸⁾。

(6) 統計学的処理

結果は平均±標準偏差で表した。統計学的検定には検定ソフト JMP4.0 (SAS インスティテュートジャパン社) を用い、

独立2群間の検定としてStudent's t検定を用いた。有意水準を0.05とし、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) ケルセチンの *in vivo* におけるコレステロール逆転送に及ぼす影響

腹腔注射後24、48、72時間の血漿の³HレベルはHC+Quercetin群とHC群で明らかな差を認めなかった。また、肝臓、胆汁、糞便中の³HレベルもHC群に比べてHC+Quercetin群で有意な差は認められなかった。このことから、ケルセチンはコレステロール逆転送系の活性化に影響を及ぼさないことが示された。

(2) クルクミンの *in vivo* におけるコレステロール逆転送に及ぼす影響

結果を図1に示す。腹腔注射後24、48、72時間の血漿(A)の³HレベルはHC+Curcumin群とHC群で明らかな差を認めなかった。また、肝臓(B)、胆汁(C)、糞便中(D)の³HレベルもHC群に比べてHC+Curcumin群で有意な差は認められなかった。このことから、クルクミンはコレステロール逆転送系の活性化に影響を及ぼさないことが示された。

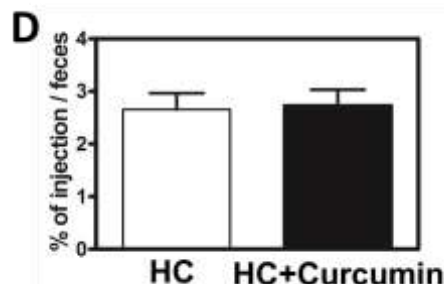
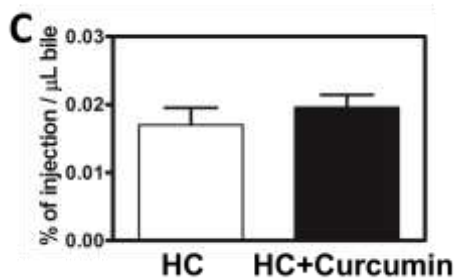
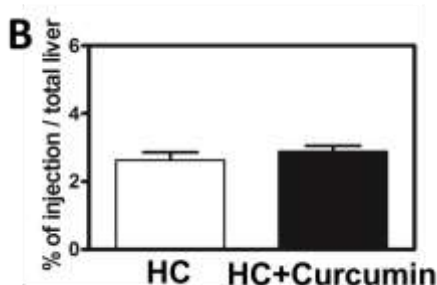
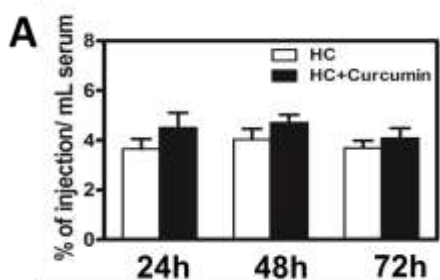


図1. クルクミンがコレステロール逆転送に及ぼす影響

(3) クルクミンによるコレステロール吸収および排出遺伝子発現の変化

図2にクルクミンを投与したハムスター空腸での遺伝子発現の変化を示す。クルクミン摂取により空腸のNPC1L1発現が減少するということが報告されていることから、次に空腸のコレステロール吸収および排出の遺伝子発現がどのように変化しているか検討した。HC+Curcumin群とHC群のハムスター空腸よりRNAを抽出し、real-timePCRを行った。コレステロール吸収にかかわるNPC1L1、コレステロール排出にかかわるABCG5およびABCG8のmRNA発現量を示したが、HC+Curcumin群とHC群で明らかな差を認めなかった。

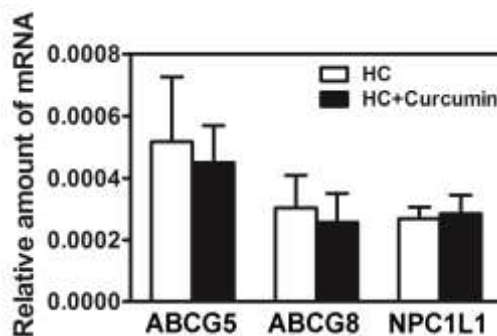


図2. クルクミンを投与したハムスター空

腸での遺伝子発現

ターメリックのポリフェノールであるクルクミンは以前よりコレステロール吸収抑制作用を有することが報告されおり、2008年頃よりNPC1L1の遺伝子・タンパク質発現を減少させること、さらにはNPC1L1を転写レベルで制御してコレステロール吸収を抑制することが報告された⁵⁾⁶⁾。一方、我々は小腸のコレステロール吸収に関与する重要な分子NPC1L1の阻害薬であるエゼチミブがコレステロール逆転送作用を活性化することを明らかにした。そこで、クルクミンの小腸コレステロール吸収阻害によりコレステロール逆転送活性化すると仮定して検討したが、クルクミンの投与によりコレステロール逆転送およびNPC1L1発現に変化は認められなかった。我々のデータと一致して、最近Nekohashiらがcaco-2細胞にコレステロールの吸収を抑制するポリフェノールのスクリーニングを行った結果、クルクミンを作用させてもコレステロール吸収抑制作用がないことを報告した⁷⁾。今回の我々のデータはNekohashiらのデータと一致するものであり、これまでのデータとの乖離の理由は不明だが、今後クルクミン関与の有無やその他の発現制御機構の解明が望まれる。また、コレステロール逆転送には本研究課題であるコレステロール吸収阻害を介した経路とHDL機能であるコレステロール引き抜き能の改善を介した経路があるが、クルクミンがHDL機能を介するコレステロール逆転送作用を有さないことが示された。最近になりクルクミンやケルセチン以外のコレステロール吸収抑制作用があるポリフェノールが多数報告されたことにより⁷⁾、今後もコレステロール吸収抑制の観点からこれらのポリフェノールによるコレステロール逆転送作用実験を進めていきたいと考えている。

<引用文献>

- 1) Duffy D, Rader DJ (2009) Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 6: 455-463.
- 2) Xie P, Jia L, Ma Y, Ou J, Miao H, Wang N, Guo F, Yazdanyar A, Jiang XC, Yu L (2013) Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 920-925.
- 3) Uto-Kondo H, Ayaori M, Sotherden GM, Nakaya K, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Takiguchi S, Yakushiji E, Ogura M, Nishida T, Endo Y, Ikewaki K (2014) Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway. *Biochim Biophys Acta* 1841: 1247-1255.
- 4) Jang EM, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim HJ, Jeon SM, Shin SK, Seong CN, Lee MK (2008) Beneficial effects of curcumin on hyperlipidemia and insulin resistance in high-fat-fed hamsters. *Metabolism* 57: 1576-1583.
- 5) Kumar P, Malhotra P, Ma K, Singla A, Hedroug O, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA (2011) SREBP2 mediates the modulation of intestinal NPC1L1 expression by curcumin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G148-155.
- 6) Feng D, Ohlsson L, Duan RD (2010) Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis* 9: 40.
- 7) Nekohashi M, Ogawa M, Ogiwara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K, Kobayashi S (2014) Luteolin and

quercetin affect the cholesterol
absorption mediated by epithelial
cholesterol transporter niemann-pick
c1-like 1 in caco-2 cells and rats. *PLoS
One* 9: e97901.

8) Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, Nakaya
K, Ito M, Suzuki A, Takiguchi S, Yakushiji
E, Terao Y, Ozasa H, Hisada T, Sasaki M,
Ohsuzu F, Ikewaki K (2010) Coffee
consumption enhances high-density
lipoprotein-mediated cholesterol efflux
in macrophages. *Circ Res* 106: 779-787.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) 近藤春美 : 2015. クルクミンによるコレ
ステロール吸収抑制・排出作用に関する
研究 浦上財団研究報告書 22:80-88.
査読なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 春美 (KONDO, Harumi)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号: 80401602

(2) 研究分担者

池脇 克則 (IKEWAKI, Katsunori)
防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課
程及び専門課程、動物実験施設、共同利用
研究・内科学・教授
研究者番号: 40287199

綾織 誠人 (AYAORI, Makoto)
防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課
程及び専門課程、動物実験施設、共同利用
研究・病院・助教
(平成24年度より平成26年度まで)
研究者番号: 70532464