

動脈硬化発症におけるコレステロールの「質」に関する トランスクリプトミクスによる検証と フラボノイドによる抑制効果

小林 彰子

東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

緒 言

コレステロールは、生体膜の構成成分や、ビタミンDやステロイドホルモンの原料になることから生体に必須な栄養素である。しかし近年、食の欧米化に伴い食事から摂取する脂質の量が増加し、高コレステロール血症患者が増加している。高コレステロール血症は動脈硬化発症のリスクが高まることから、日本人の食事摂取基準においても一日の上限量が定められている。近年、コレステロールは摂取量だけでなく、質も重要視されている。特に食品加工の過程において生成する酸化コレステロール(COP)は、生体に悪影響を及ぼす可能性が報告されているが、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

食品に含まれるコレステロールの1割はCOPになるといわれている。また、油の長期保存や電子レンジによる繰り返し、長時間の加熱は、COPを増大させる。上述のように日本人のコレステロール摂取量は増加しており、それに伴いCOPの摂取量も増大していることが予測される。ヒト動脈硬化巣に27-ヒドロキシコレステロールや7-ケトコレステロールといったCOPが存在することや¹⁾、7-ケトコレステロールがヒトマクロファージにおいて炎症性シグナルを増幅させることが報告されていることから²⁾、COPの動脈硬化発症への関与も示唆されている。しかしその関係性は明確ではない。

我々は、腸管に発現するコレステロールトランスポーターであるNPC1 L1を制御することにより、腸管からの過剰なコレステロール吸収を特異的に防ぐ数種のフラボノイドを見出した³⁾。COPはコレステロールと同様にNPC1 L1を介して腸管から吸収されることが報告されており⁴⁾、我々の見出したフラボノイドはCOPの吸収も同様に阻害し、高コレステロール血症ならびに動脈硬化を予防する可能性がある。

本研究では、腸管からのコレステロール吸収抑制フ

ラボノイドの効果を検証するまず第一段階として、COP摂取が生体へ与える影響を、ラットを用いたトランスクリプトーム解析により明らかにすることを目的とした。

方 法

1. COPを含むコレステロール試料の作製

定法に従い⁵⁾、コレステロール(和光純薬工業、Osaka, Japan)を200℃で6-12時間熱してCOPを含むコレステロール試料(COP試料)を作製した。

2. COP試料のGC-MSによる組成分析

明治大学の長田恭一准教授のご協力を得て測定を行った。ULBON HR-1カラム(0.25 mm×50 m, 0.25 μm, 信和化工株式会社(Kyoto, Japan))を用いてShimadzu GC-MS-QP5050Aにて測定した。

3. 動物および飼育

7週齢Wistarラット(日本クレア、Tokyo, Japan)18匹をAIN-93Gを基本とした普通食で5日間予備飼育を行い、その後6匹ずつ3群に分けて21日間本飼育を行った。群分けは普通食群(non-cholesterol, NC)、コレステロールを0.3% (w/w)添加したコレステロール食群(high cholesterol, HC)、COP試料を0.3% (w/w)添加したCOP食群(high oxysterol, HO)の3群とした。飼育期間は自由摂食・摂水とし、2日に一回、16:00に摂餌量および体重の測定を行った。各群の餌の組成はTable 1に示した。本飼育1、3、10、17、21日目の10:00に尾静脈採血によって血液を回収した。本飼育22日目の13:00に解剖を行い、頸動脈血液を採取し、肝臓を摘出した。

Table 1 試料組成

Composition of diets (g/kg)	NC	HC	HO
Cornstarch	397.5	397.5	397.5
Casein	200.0	200.0	200.0
Dextrinized cornstarch	132.0	132.0	132.0
Sucrose	102.5	102.5	102.5
Soybean oil	70.0	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0	50.0
Mineral mix (AIN93G-MX)	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN93G-VX)	10.0	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0	3.0
Cholesterol		3.0	
Cholesterol oxidation products			3.0

4. 血液生化学検査

尾静脈血の総コレステロールおよびトリグリセリドは、それぞれ、コレステロールE-テストワコー（和光純薬工業）およびトリグリセライドE-テストワコーを用いて行った。また、頸動脈血は、総コレステロール、遊離コレステロール、コレステロールエステル、LDL-コレステロール、HDL-コレステロールについて、オリエンタル酵母（Shiga, Japan）に測定を依頼した。

5. 肝臓コレステロールおよびトリグリセリドの測定

肝臓を100 mg量りとり、ホルチ法にて肝臓脂質抽出液を得た。抽出液中のコレステロールおよびトリグリセリド量は2.5.と同じ手法で測定した。

6. RNA抽出

肝臓のtotal RNAをNucleoSpin RNA（タカラバイオ株式会社（Tokyo, Japan））を用いて同社のプロトコルに従い抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies（Santa Clara, CA））によりRNAの質を確認した。

7. マイクロアレイ

得られたtotal RNAをもとに、GeneChip 3' IVT Express Kit（Affymetrix）を用いてターゲットの調整を行った。GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array（Affymetrix（Tokyo, Japan））にハイブリダイズし、Hybridization、Wash and Stain Kitにて染色・脱色後、スキャンしてDNAマイクロアレイデータを取得した。データの正規化にはAffymetrix Microarray Suite Version 5.0（Affymetrix）を用いた。発現変動遺伝子は群間の比較においてlogFC（log fold change; fold changeをlog2変換した値）の絶対値が0.5より大きいも

のと定義した。発現変動した遺伝子はウェブツール DAVID（<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>）による機能解析に供した。

8. オリゴヌクレオチドプライマー配列

脂肪酸合成酵素（FASN）、SREBP1、メバロン酸キナーゼ（MVK）をエンコードするプライマーは、ソフトウェアPrimer3Plus（<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>）を用いて設計し、シグマアルドリッチ（Tokyo, Japan）に合成を依頼した。

9. リアルタイムPCR

500 ngのtotal RNAを5×PrimeScript RT Master Mix（タカラバイオ株式会社）と混合し、GeneAmp PCR System 9700（PE Applied Biosystems（Foster city, CA））により逆転写反応を行った。なお、total RNAはプールせず個体ごとのものを使用した。生成したcDNAサンプルを、TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ株式会社）に供した。結果は個々の遺伝子のfold changeをB2Mのfold changeで補正した。

結 果

GC-MS測定の結果、作製したCOP試料の組成はコレステロールが96.91%、COPが2.50%、その他が0.59%であった。

普通食群（non-cholesterol, NC）、コレステロールを0.3%（w/w）添加したコレステロール食群（high cholesterol, HC）、COP試料を0.3%（w/w）添加したCOP食群（high oxysterol, HO）の3群間の体重増加量、累積摂餌量、肝臓重量に有意な差は認められなかった。

尾静脈血の総コレステロール濃度はNCでは変化がなかったのに対し、HCとHOでは経日的に上昇し、HCでは本飼育17日目と21日目においてNCとの間に有意な上昇を示した（Fig. 1）。また、HOでは有意な差は認められなかった。一方、トリグリセリド濃度は3群間に顕著な差は見られなかった。解剖時頸動脈血の総コレステロール、コレステロールエステル、遊離コレステロール、およびLDL-コレステロールは、HCがNCに対し有意に上昇した一方で、HOとNCとの間に有意な差は見られなかった。

肝臓中のコレステロール量はNCに対しHCとHOの

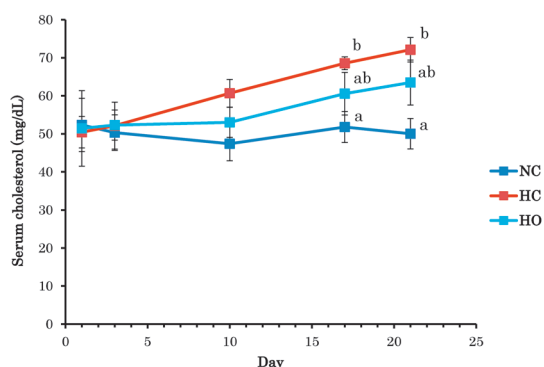


Fig. 1 血中総コレステロール濃度の経日変化

本飼育1、3、10、17、21日目に尾静脈採血によって血液を回収し、総コレステロール濃度を測定した ($n=6$, means \pm S.E., different letter: $p<0.05$ (Tukey's test)).

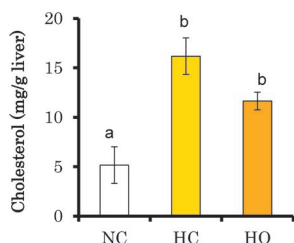


Fig. 2 肝臓中コレステロール濃度

両群で有意に上昇した (Fig. 2)。トリグリセリドはHCがNCに対し有意に上昇した一方で、HOはNCとの間に有意な差は見られなかった。

DNAマイクロアレイではHC vs. NCとHO vs. NCとの比較において、HC vs. NCでのみ発現上昇 ($\log FC > 0.5$) した遺伝子数は306、HO vs. NCでのみ発現上昇した遺伝子数は560、その両方で発現上昇した遺伝子数は400であった。また、HC vs. NCでのみ発現低下 ($\log FC < -0.5$) した遺伝子数は400、HO vs. NCでのみ発現低下した遺伝子数は616、その両方で発現低下した遺伝子数は298であった。HC vs. NCおよびHO vs. NCにおいて発現低下 ($\log FC < -1$) した遺伝子についてDAVIDを用いて機能解析し、 p 値が0.05未満のGO (gene ontology) termを抽出した。コレステロール合成およびTG合成に関わるGO termが多く抽出された。HO vs. HCにおいてコレステロール合成および脂肪酸合成に関わる遺伝子の発現変動を調べたところ、脂肪酸合成酵素 (FASN)、SREBP1、メバロン酸キナーゼ (MVK) の発現が低下していた。これらの遺伝子の発現をPCRにより確認した (Fig. 3)。いずれの遺伝子もHC群に対しHO群において発現の低下傾向が見られた。

HO vs. HCにおいて発現上昇 ($\log FC > 0.5$) した遺伝

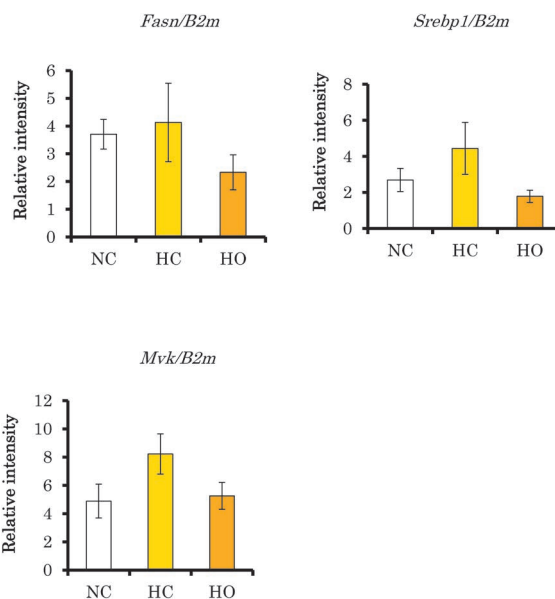


Fig. 3 Fasn、Srebp1、および Mvk の各個体ごとのリアルタイムPCR

子をDAVIDに供し、 $p<0.05$ を満たすGO termをグループごとに整理した (Table 2)。グループは上から免疫応答、アポトーシス、その他に分類され、HOはHCと比較し炎症および免疫応答が上昇している可能性が示唆された。

考 察

HOに与えたCOPを含むコレステロール試料の96.91%がコレステロールにも関わらずHOの血中コレステロールレベルがHCより有意に低下していたことから、COPによる血中のコレステロール濃度低下作用が考えられた。HOはHCと比較し肝臓でのMVKの発現の低下傾向が見られることから、COPがコレステロールとは異なるメカニズムでコレステロール合成を阻害することにより血中のコレステロール濃度が低下する可能性が示唆された。

一方血液のトリグリセリド濃度の経日変化では3群間に顕著な差は見られなかった。ばらつきも大きかったことからこれについては今後検討する予定である。

肝臓の総コレステロール量はHCとHOが共にNCに対し有意に上昇し、HOはHCに対し低下傾向を示した。トリグリセリドに関しては、NCに対しHCで有意な上昇を示し、HOでは有意差は認められなかった。この結果はCOPが肝臓中トリグリセリド蓄積量を低下させるという報告と矛盾しなかった⁶⁾。

HCおよびHOにおいて発現が低下した遺伝子の機能

Table 2 HC vs. NCにおいて発現低下した遺伝子のDAVIDによる機能解析

Term	Count
Immune system process	26
└ Antigen processing and presentation	6
Immune response	18
└ Adaptive immune response	7
└ Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	7
Immune effector process	8
Leukocyte mediated immunity	8
└ Lymphocyte mediated immunity	8
Positive regulation of immune response	8
B cell mediated immunity	7
└ Immunoglobulin mediated immune response	7
Acute inflammatory response to antigenic stimulus	2
└ Hypersensitivity	2
Type II hypersensitivity	2
└ Type IIa hypersensitivity	2
Cell killing	3
└ Leukocyte mediated cytotoxicity	3
└ Antibody-dependent cellular cytotoxicity	2
Response to stress	42
Innate immune response	6
Regulation of cytokine production	9
Positive regulation of cell death	14
└ Positive regulation of programmed cell death	14
└ Positive regulation of apoptosis	14
Cellular process	202
└ Negative regulation of cellular process	44
Regulation of biological process	129
Metabolic process	150
└ Primary metabolic process	131
Nitrogen compound metabolic process	59
└ Cellular nitrogen compound metabolic process	57
└ Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	53
Macromolecule metabolic process	104
└ Regulation of macromolecule metabolic process	63
Cellular macromolecule metabolic process	90
RNA metabolic process	22
Notochord formation	2

解析により、コレステロール合成およびTG合成に関わるGO termが多く抽出された。これはHCとHOの両方でコレステロール合成とトリグリセリド合成が抑制されたことを示唆している。

脂肪酸合成酵素 (FASN)、SREBP1、メバロン酸キナーゼ (MVK) の発現をPCRにより確認したところ、HCに対しHOにおいて発現の低下傾向が見られた。MVKの発現低下はコレステロール合成の阻害に、FASNとSREBP1の発現低下は脂肪酸合成の阻害につながる可能性がある。COPがFASNやSREBP1の発現を低下さ

せることはすでに報告されている⁴⁾。

一般的に血中コレステロールレベルの増加と動脈硬化発症リスクには相関があると考えられているが、本研究ではCOPを含むコレステロール試料の摂食により、血中コレステロールの低下が示唆された。また、肝臓でのコレステロール合成に関わる遺伝子においても低下傾向が見られた。肝臓でのコレステロール合成関連遺伝子はHCでも低下していた。HCにおける低下は体内コレステロールレベルの上昇に伴った合成の抑制であると考えられる。しかしHOはHCと比較しMVKの発現がさらに低下傾向を示したことから、COPには肝臓でのコレステロール合成抑制作用があり、そのことが血中コレステロール濃度の低下をもたらしたのではないかと考えている。COPのこれらの効果は一見動脈硬化に対し正の効果にもみえるが、生体における脂質の代謝異常ともとれる。今後はこれらの代謝変化がどのように疾病に関わるのかについて解析を進めたい。

HOとHCを比較し発現上昇 (log FC>0.5) した遺伝子をDAVIDに供し、 $p<0.05$ を満たすGO termをグループごとに整理すると、免疫応答、アポトーシス、その他に分類された。したがってHOはHCと比較し、肝臓での炎症免疫応答が上昇している可能性が考えられた。Masciaらは腸管のモデル細胞であるヒト結腸癌由来Caco-2にCOPを添加すると、IL-1 α やIL-6などの炎症性サイトカインのmRNA発現が上昇することを報告している⁶⁾。今後は肝臓のDNAマイクロアレイでみられた免疫に関する遺伝子変動を精査すると共に、小腸上皮におけるこれらの炎症マーカーについても検討する予定である。

要 約

COPを2.5%含むコレステロールの摂食と純品のコレステロールの摂食では、血中や肝臓の成分および遺伝子発現において違いが見られた。コレステロール食群 (high cholesterol, HC) に対しCOP食群 (high oxysterol, HO) において血中コレステロールの低下および肝臓中コレステロールと肝臓中トリグリセリドの低下傾向が見られたこと、そして脂肪酸合成酵素 (FASN)、SREBP1、メバロン酸キナーゼ (MVK) の発現の低下傾向が見られたことから、COPは脂肪酸合成とコレステロール合成を阻害することが推測された。またHOはHCと比較し肝臓における炎症および免疫応答が上昇している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 前場良太：オレオサイエンス， **2**(5)， 248–274， 2002.
- 2) B. Buttari, et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 130–137, 2013.
- 3) M. Nekohashi, et al.: *PLoS ONE*, **23**, e97901, 2014.
- 4) S. Terunuma, et al.: *Lipids*, **48**, 587–595, 2013.
- 5) T. Sasaki, et al.: *J. Oleo Sci.*, **59**(9), 503–507, 2010.
- 6) C. Mascia, et al.: *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 2049–2057, 2010.