

新規不整脈性心筋症モデルマウスを用いた 抗酸化食材による心筋症予防効果の解析

今井 浩 孝
北里大学薬学部 准教授

緒 言

活性酸素は様々な疾患の進展や原因として関与していることが報告されているが、脂質の酸化が疾患の直接の原因となるのか、炎症の結果として生じているのかは明らかではなかった。我々は、生体膜リン脂質の酸化1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元できるリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx)^{1,2)} の心筋特異的欠損マウスを作成したところ、発生過程の17.5日で心筋細胞死が突然起き致死となること、ビタミンE添加食を母親に与えると正常に分娩し育つことを見出した。またビタミンE添加食で正常に育成した心筋特異的PHGPx欠損マウスを通常食に変えると約10日で不整脈性心不全による突然死を引き起こすことを見出した。このことは、ビタミンEやPHGPxによる脂質酸化の抑制系のバランスの破綻により生成する脂質ヒドロペルオキシドが心不全の原因となることを意味している。この心不全では、心臓の拡張は見られないことから、拡張型心筋症とは異なる。過労死や過度のスポーツなどによる突然死などの原因不明の心不全の原因となる可能性も考えられる。本研究では、抗酸化活性を持つことが報告されている8種類の食材成分について、PHGPx欠損による細胞死やビタミンE低下による心筋特異的PHGPx欠損マウスの突然死に対して予防効果が見られるのかを明らかにすることを目的に検討を行った。

実験方法

1. 食材成分

本研究では、抗酸化能を有すると報告のある食材成分のうち、図1に示す8種類の食材成分について解析を行った。魚類の筋肉の赤色成分や甲殻類の殻に含まれるカロテノイドの一種、アスタキサンチン、コーヒード豆に含まれるクロロゲン酸、マメ科の多年草「甘草」に含まれるイソフラボノイド系のグラブリジン、生薬コウボ

クの成分であるホノキオール、マグノロール、リンゴやタマネギなどに含まれるフラボノイドの一種、ケルセチン、シソ科の植物に含まれるポリフェノール化合物であるロスマリン酸、オリーブ油果実に含まれるリポキシゲナーゼ阻害物質である2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチルアルコールについて解析を行った。

2. リン脂質の自動酸化に対する酸化抑制効果の評価

40 μ M ジリノレオイルホスファチジルコリン (DLPC) エタノール溶液を、96穴プレート、イムロン1に50 μ l 加え、さらに2倍希釈系列濃度で作製した食材成分のエタノール溶液50 μ lを添加し、37度で16時間静置し、乾固さらに自動酸化を行った。自動酸化して生成したリン脂質ヒドロペルオキシドを、ヒドロペルオキシドと反応して蛍光を発する蛍光色素ジヒドロローダミン (DHR) 123 (1 μ g/ml) を50 μ l添加して90分後に蛍光量を蛍光プレートリーダーにて測定した。陽性コントロールとしてビタミンE (α -トコフェロール) を用いた。

3. タモキシフェン誘導型PHGPx欠損細胞株を用いた脂質酸化が起因となる細胞死の抑制効果

タモキシフェン誘導型PHGPx欠損MEF細胞は申請者が樹立したMEF細胞²⁾で、LoxP配列に挟まれたPHGPxゲノム遺伝子を持つ不死化細胞にCreERT2遺伝子を導入した細胞である。通常は細胞質にCreERT2蛋白質が発現しているため、遺伝子破壊は起こさず生存しているが、タモキシフェン (Tam) を添加すると、タモキシフェンがCreERT2蛋白質のエストロジェン受容体結合部位に結合することにより構造変化し、核移行シグナルの出現により核へ移行してCre活性によりLoxP配列で挟まれたPHGPxゲノム遺伝子を欠失させることができる細胞株である。この細胞ではタモキシフェンを添加すると24時間後にPHGPx蛋白質の消失に伴い、リン脂質ヒドロペルオキシドの蓄積が起こ

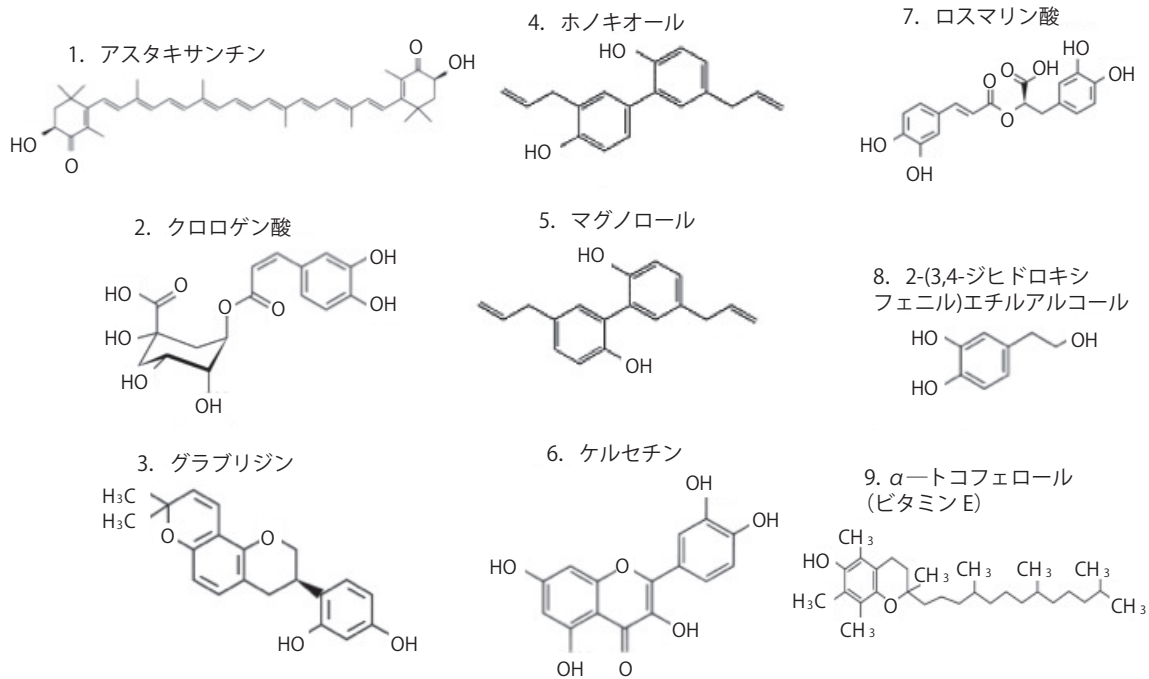


図1 スクリーニングを行った抗酸化活性の報告のある食材成分の構造式

り、48 時間後から 72 時間後の間で新規細胞死により致死となる。食材成分の細胞死の抑制効果は、 2×10^4 cells/6 穴 dish で細胞をまき、次の日に Tam 添加 ($1 \mu\text{M}$) と同時にそれぞれの食材成分の濃度の希釈を取り添加し 72 時間後に付着している細胞を生存している細胞としオールインワン顕微鏡にて細胞を撮影して細胞数をカウントした。Tam を添加した場合 (細胞死抑制効果) と Tam を添加しない場合 (食材成分の毒性評価) を比較して、食材成分の細胞死抑制効果を検討した。いずれも食材成分を添加しない場合の Tam 未添加の 72 時間後の細胞数を 100% として、生存率を算出した。

4. ビタミンE低下による不整脈を伴う心筋症モデルマウスを用いた突然死の予防効果

心筋特異的 PHGPx 欠損マウスは、研究代表者が作製したオリジナルなマウスであり、PHGPx loxP マウス²⁻⁴⁾ と心筋特異的 Cre 発現マウス (MCK-Cre) を交配して作製したマウスであるが、本マウスは発生過程の 17.5 日に心筋細胞死を引き起こして致死となる。しかし、母親をビタミン E 添加食 (0.1%w/w VE 添加 CE-2) で飼育すると正常に生まれ生育する。ビタミン E 添加食で飼育した 3-4 週齢の心筋特異的 PHGPx 欠損マウスを、ビタミン E 添加食から通常食 (CE-2) に変えると約 10 日後に、心筋にリン脂質ヒドロペルオキ

シドが蓄積し、不整脈性心不全を引き起こし突然死を引き起こす。本実験では、上記 2 つのスクリーニング系とともに陽性であったホノキオールを添加した CE-2 食 (0.003%w/w 添加 CE-2) を、通常食に変えて与え、致死となる時期が延びるのかについて検討を行った。心筋特異的 PHGPx ヘテロマウスをコントロールマウスとして、ホノキオール添加食に毒性が見られないかを同時に検討した。このコントロールマウスでは通常食 (CE-2) に変えても致死は起きない。統計学的評価では Wilcoxon 検定を行い、50% 生存期間 (Median Survival Time, MST) を算出した。

結 果

1. 食材成分によるリン脂質の自動酸化によるリン脂質ヒドロペルオキシド生成の抑制効果の評価

本研究で用いた図 1 に示した 8 種類の食材成分は、いずれも抗酸化活性があることが知られているが、リン脂質の自動酸化によるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成に対する同じ評価系で比較されてはいない。PHGPx 欠損による細胞死では、リン脂質ヒドロペルオキシドの生成が、致死の起因となることから、まず、リノール酸を 2 つもつジリノレオイルホスファチジルコリンの自動酸化によるリン脂質ヒドロペルオキシド生成に対して、各食材成分がビタミン E と比べてどの程度抑制効果が見ら

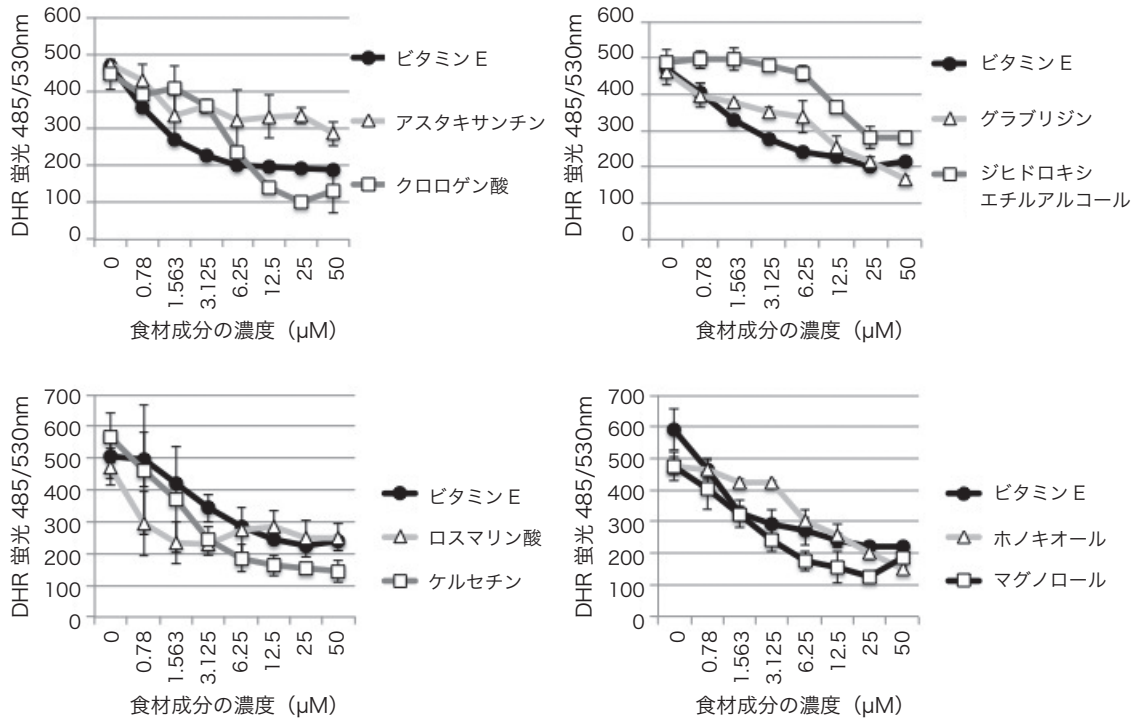


図 2 食材成分によるリン脂質自動酸化の抑制効果

乾固したジリノレオイルホスファチジルコリンのプレート上での自動酸化で生成したリン脂質ヒドロペルオキシドをジヒドロローダミン 123 (DHR) と反応させた。どの食材もリン脂質の自動酸化を抑制する活性を持つことが示された。

れるのかについて、食材成分の濃度をふり検討を行った。リン脂質ヒドロペルオキシドの検出は、ヒドロペルオキシドに反応して蛍光を発するジヒドロローダミン 123 (DHR) を用いて行った。その結果、図 2 に示すように、ホノキオール、マグノロール、ロスマリン酸、ケルセチン、グラブリジン、クロロゲン酸は、ほぼビタミン E と同程度、自動酸化によるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑えた。ジヒドロキシエチルアルコール及び、アスタキサンチンは、ビタミン E よりリン脂質ヒドロペルオキシド生成の抑制効果は低かった。

2. 食材成分によるタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞における細胞死の抑制効果

新規不整脈性心筋症モデルマウス (ビタミン E 低下による心筋特異的 PHGPx 欠損マウスの突然死モデル) は、心筋におけるリン脂質ヒドロペルオキシド生成が起因となって心筋細胞が細胞死をおこし致死となる。この致死はビタミン E 添加食で抑制される。マウスレベルのスクリーニングの前に、細胞レベルでまずスクリーニングを行った。タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞は、タモキシフェン添加によって PHGPx が

欠損し、24 時間後にリン脂質ヒドロペルオキシド生成を起因として、48 時間から 72 時間の間で致死となる。そこで、タモキシフェンの添加の有無と阻害剤の濃度をふることにより、阻害剤による細胞毒性効果と PHGPx 欠損による細胞死の抑制効果について評価した。図 3 に示すように、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞死を抑制できたのは、ホノキオールとグラブリジンのみであった。またグラブリジンは細胞死を起こす濃度に近い高い濃度でしか抑制できなかったのに対して、ホノキオールは低濃度でも有為にこの細胞死を抑制できることが明らかとなった。

3. ビタミン E 低下による不整脈を伴う心筋症モデルマウスを用いた突然死の予防効果

PHGPx 欠損細胞死における抑制効果が見られたグラブリジンとホノキオールのうち、細胞毒性と細胞死抑制濃度が離れているホノキオールについて、ビタミン E 低下による心筋特異的 PHGPx 欠損マウスにおける心不全による突然死を抑制できるのかについて評価した。その結果、図 4 に示すように、ホノキオール添加食 (0.003%w/w 添加食) では、50% 生存期間 (MST) で 4

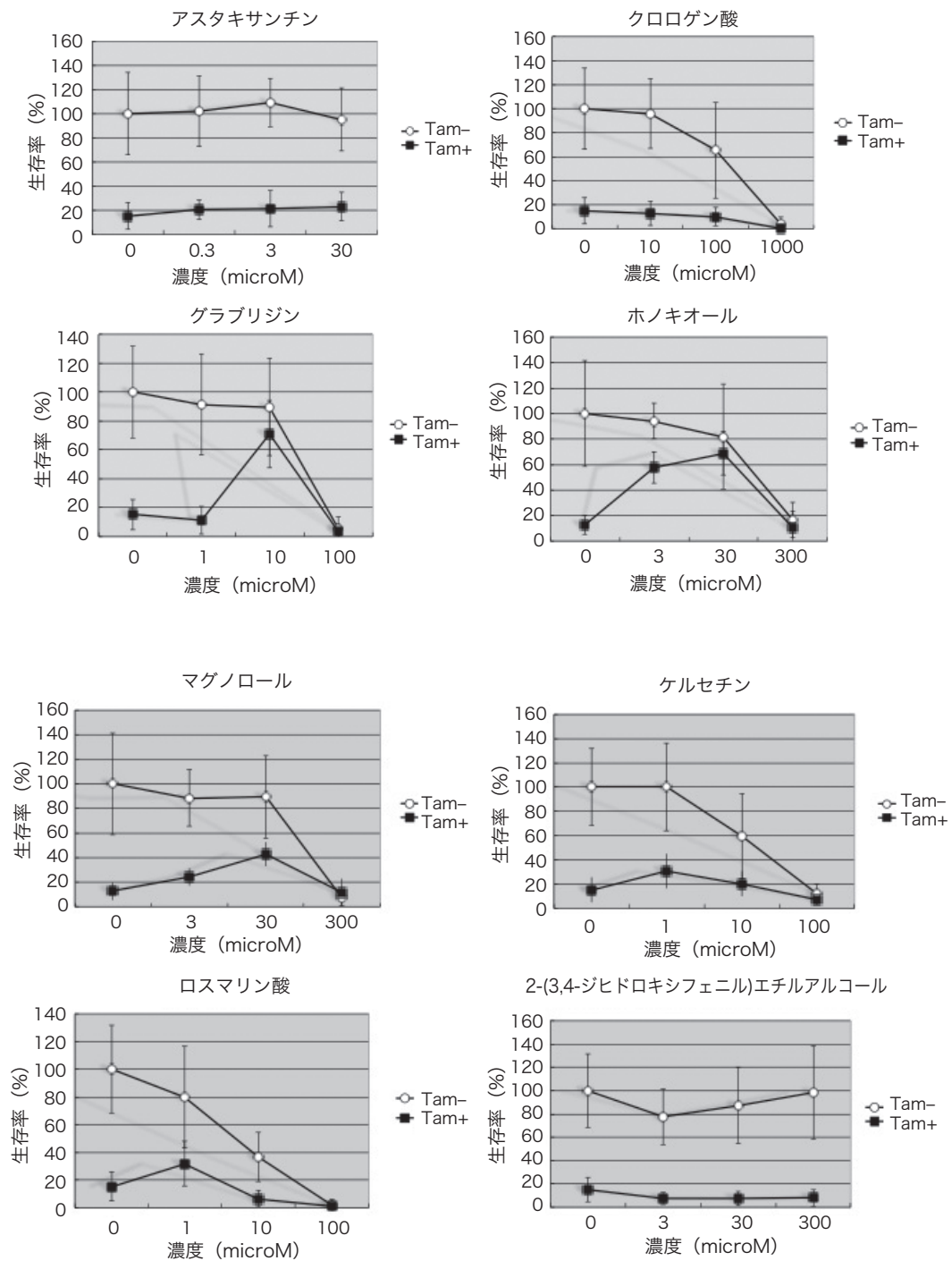


図3 食材成分による PHGPx 欠損細胞死の抑制効果の解析

タモキシフェン (Tam) 添加の際に食材成分を同時に添加し、72 時間後のタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞の細胞死の抑制効果を検討した。グラブリジン及びホノキオールのみが細胞死を強く抑制した。

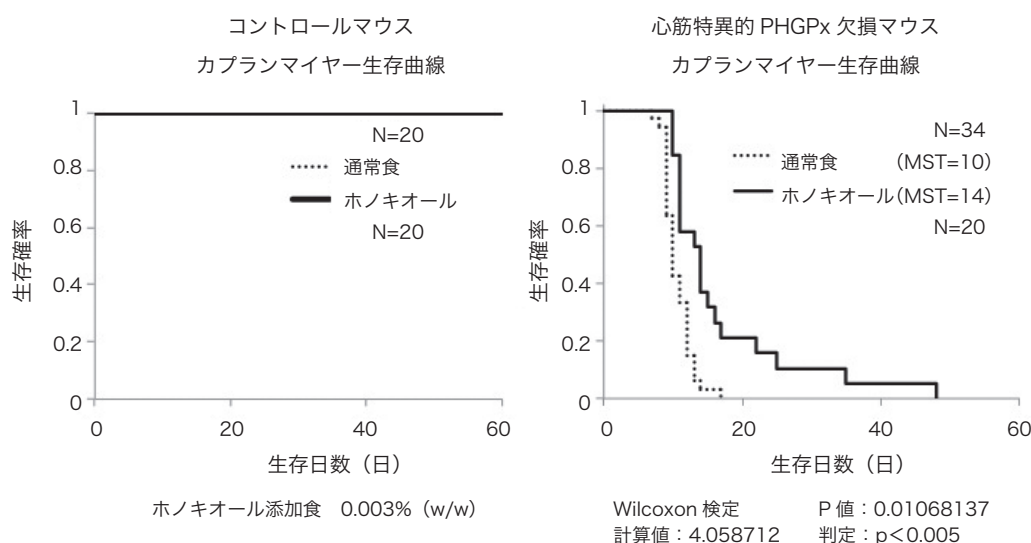


図4 ホノキオール添加食による心筋症突然死モデルにおける予防効果

心筋特異的 PHGPx 欠損マウスはビタミン E 添加食から通常食に換えると約 10 日で突然死を起こす。通常食の代わりに 0.003% (w/w) ホノキオール添加食を与えると生存期間が有為に延びた。

日の延長効果が確認され、統計的に有意差が得られた。さらに最大寿命は約 2.5 倍伸びた。また、コントロールマウスを用いた解析から、このホノキオール添加食投与による毒性は確認されなかった。

考 察

抗酸化能を有するといわれている図 1 に示した食材成分について、In vitro 自動酸化抑制能、PHGPx 欠損 MEF 細胞での細胞死の抑制効果、ビタミン E 添加食から通常食に変えた時に起きる心筋特異的 PHGPx 欠損マウスの突然死に対する In vivo での予防効果について解析を行った。いずれの実験系もこれまでの解析から、リン脂質ヒドロペルオキシド生成が、細胞死、個体死を引き起こす原因となっており、ビタミン E の添加によって抑制される。図 2 より、In vitro でのリン脂質の自動酸化に対する抑制効果は 8 種類のいずれの食材成分も抑制効果を示したが、PHGPx 欠損 MEF 細胞死の抑制効果は、予想外にホノキオールとグラブリジンしか見られなかった。クロロゲン酸、マグノロール、ケルセチン、ロスマリン酸では高濃度では、タモキシフェン未添加でも細胞毒性が見られているので、細胞死抑制効果が見られないのは細胞への取り込み量が低いということではない。細胞内での食材成分の分布量や脂質酸化部位での局在性が異なることがその原因と考えられた。またマグノロールはホノキオールと構造が非常に似ているが、細胞死の抑制効果は大きく異なったことは興味深い。ビタミ

N の低下による心筋特異的 PHGPx 欠損マウスによる突然死に対するホノキオール添加食の予防効果は統計的に有意差が確認された。しかし、ビタミン E のように完全に抑制できるという結果ではなく、致死時期の延長効果が見られる結果に止まったが、これは、今回用いたホノキオールの添加量が 0.003% (3mg ホノキオール / CE-2 100g) とビタミン E 添加食 0.1% (100mg ビタミン E / CE-2 100g) に比べてかなり低い濃度であったことにもよると考えられる。ホノキオールの添加量を上げればさらに十分な予防効果も期待できると考えられた。今後の検討課題である。

要 約

自動酸化によるリン脂質の酸化を抑制できる 8 種類の異なる構造式を持つ食材成分について、PHGPx 欠損 MEF 細胞死の抑制効果を調べたところ、グラブリジンとホノキオール以外は抑制効果が見られなかった。ホノキオールは、ビタミン E 低下による不整脈性心不全を伴う突然死に対して低濃度添加食においても統計的に有為な予防効果が見られることが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援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。

参考文献

- 1) 今井浩孝：オレオサイエンス，11, 11, pp431-439, 2011
- 2) H. Imai,: *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46, pp1-13, 2010
- 3) T. Ueta, T. Inoue, T. Furukawa, et al,: *J. Biol.Chem.*, 287, pp7675-7682, 2012
- 4) H. Imai, N. Hakkaku, R. Iwamoto, et al,: *J.Biol. Chem.*, 284, pp32522-32532, 2009