

酸化コレステロールがラットの代謝に与える影響の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター・准教授 小林 彰子

■ 緒言

コレステロールは生体に必須な栄養素であるが、動脈硬化発症リスクの観点から上限量が定められている。しかし近年、コレステロールの摂取量だけでなく質の重要性が注目されている。加工食品に酸化コレステロールが存在し、生体に悪影響を及ぼすこと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。

疫学調査においてはコレステロール摂取量の増加に伴い、虚血性心疾患や癌罹患の増加が危惧されている。特に卵はコレステロール含量の高い食品の一つであり、疫学調査においても指標として使われることが多い。1日に摂取するコレステロールは300mg以下が望ましいとされているのに対し、卵黄1個に含まれるコレステロールは約250mgであり、高コレステロール血症発症リスクの観点から敬遠されている。しかし一方で、卵黄の摂取は動脈硬化のリスクとならない、とする報告も多く、現在この論争に決着はついていない。

食品に含まれるコレステロールの1割は酸化コレステロールになることが知られている。また、油の長期保存や電子レンジによる繰り返し、長時間の加熱は酸化コレステロールを増大させる。日本人のコレステロール摂取量は急増しており、それに伴い酸化コレステロール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酸化コレステロールが存在することや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⁾、酸化コレステロールが動脈硬化発症に深く関与すると推測されている。しかし依然としてその関係性は明確ではない。我々は、コレステロールを多く含む食品及びそれらを原料とした食品においては、コレステロールのみならず酸化コレステロールも動脈硬化巣形成に重要であり、食品中での酸化コレステロールの生成及び体内への吸収を抑制することが動脈硬化やその他の疾病予防に直結するのではないかと考えた。

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NPC1L1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ている(未発表データ)。酸化コレステロールはコレステロールと同様にNPC1L1を介して腸管から吸収されるため³⁾、我々の見出したフラボノイドは酸化コレステロール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、酸化コレステロール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し、その詳細な分子メカニズムを解明することを目的とした。

■ 方法

2.1. 試薬

コレステロールは和光純薬工業(Osaka, Japan)から購入した。

2.2. 酸化コレステロール作製

酸化コレステロールはコレステロールを200°Cで6-12時間熱して作製した³⁾。生成物の組成はコレステロールが96.91%、COPが2.50%、その他が0.59%だった。

2.3. 酸化コレステロールの組成分析

酸化コレステロールの組成は明治大学の長田恭一准教授の協力を得てGC/MSを用いて分析した。GC/MS装置はShimadzu GC-MS-QP5050Aで、ULBON HR-1カラム(0.25mm×50m, 0.25 μ m, 信和化工株式会社(Kyoto, Japan))を使用した。

2.4. 動物及び飼育

実験動物は日本クレア(Tokyo, Japan)より購入した7週齢Wistarラット18匹を用いた。

ラットは AIN-93G を基本とした普通食で 5 日間予備飼育を行い⁴⁾、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)、酸化コレステロールを 0.3% (w/w) 添加した酸化コレステロール食群(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 に摂餌量及び体重の測定を行った。各群の餌の組成は Table1 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。

2.5. 血液生化学検査

尾採血によって採取した血液は 1800×g、4°C、10 分遠心し上清(血漿)を得た。解剖時に頸動脈から採取した血液は 60 分常温静置後に 1500×g、4°C、10 分遠心し、その上清を取って再度遠心してから上清を得た。尾静脈血の総コレステロール濃度測定はコレステロール E-テストワコー(和光純薬工業)を用いて、トリグリセリドの測定は同社のトリグリセライド E-テストワコーを用いて行った。また、頸動脈血は、オリエンタル酵母(Shiga, Japan)に総コレステロール、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血中濃度の測定を依頼した。

2.6. 肝臓コレステロール及びトリグリセリドの測定

肝臓を 100mg 量りとり、ホルチ液(クロロホルム:メタノール=2:1)2ml 中でホモジナイズし、4°C で一晩静置した。その後、0.8%塩化カリウム溶液 400µl を加えボルテックスし、氷上に 1 時間静置した。下層を新しいチューブに移しさらに数分静置し、500µl を新しいチューブに移した。それらを減圧下で 1 時間蒸発乾固させ、ホルチ液 500µl で溶解し肝臓脂質抽出液とした。この抽出液を用いて、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリド蓄積量を測定した。コレステロール及びトリグリセリドの測定は 2.5. と同様にコレステロール E-テストワコーとトリグリセライド E-テストワコーを用いて行った。

2.7. 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。RNA 濃度は分光光度計で 260 nm の UV 吸収を測定することで定量した。RNA の質は Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies(Santa Clara, CA))により確認した。

2.8. マイクロアレイ

遺伝子発現プロファイルは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array(Affymetrix(Tokyo, Japan))を用いて解明した。Total RNA は群ごとにプールした後、Affymetrix のプロトコルに従い GeneChip 3' IVT Express Kit(Affymetrix)を用いて各サンプルから aRNA を合成しハイブリダイゼーションを行った。プローブセルの強度データは Affymetrix GeneChip Command Console Software(Affymetrix)を用いてまとめた。回収したデータはソフトウェア GeneSpring(Agilent)に移して解析した。データの正規化には Affymetrix Microarray Suite Version 5.0(Affymetrix)を使用した。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ソフトウェア DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>)を用いて機能解析を行った。

2.9. 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)をエンコードする遺伝子をリアルタイム PCR により増幅する為のプライマーは、ソフトウェア Primer3Plus(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)を用いて設計した。DNA の増幅を防ぐ為プライマーは個々の遺伝子のイントロンを挟むように設計し、シグマアルドリッチ(Tokyo, Japan)に合成を依頼した。ハウスキープング遺伝子のβ2ミクログロブリン(B2M)はタカラバイオ株式会社のものを使用した。

2.10. リアルタイム PCR

500ng 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。サンプルは 37°C、15 分加熱後 85°C、5 秒で加熱した。

次に、生成した cDNA サンプルを SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社) 及び設計した Forward と Reverse のプライマーと混合し、TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ株式会社) に供した。PCR 反応は 95°C、30 秒を 1 サイクル行い、その後 95°C、5 秒と 60°C、30 秒を 40 サイクル行った。結果は個々の遺伝子の fold change を B2M の fold change で補正した値で示した。

2.11. 統計

結果は means±SE で表記した。統計処理にはソフトウェア エクセル統計 2010 for Windows (社会情報サービス (Tokyo, Japan)) を用い、ANOVA (analysis of variance) 及び Tukey-Kramer 法により比較した。数値の差は、p 値が 0.05 未満の時に有意と定義した。

■ 結果

3.1. 体重、摂餌量、肝臓重量

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)、酸化コレステロールを 0.3% (w/w) 添加した酸化コレステロール食群 (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見られなかった (Fig.1A, B, C)。

3.2. 血中の脂質関連パラメータに対するコレステロールと酸化コレステロールの効果

尾静脈血の総コレステロール濃度は NC 群では変化がなかったのに対し、HC 群と HO 群では経日的に上昇し、HC 群は本飼育 17 日目と 21 日目において NC 群との間に有意な差が見られた。また、HC 群に対し HO 群において低下傾向が見られた (Fig.2)。一方、同血液のトリグリセリド濃度では 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及びコレステロールエステルは、HC 群が NC 群に対し有意に上昇した一方で、HO 群は NC 群との間に有意な差は見られず HC 群に対し有意に低下した。遊離コレステロールと LDL-コレステロールは、HC 群が NC 群に対し有意に上昇した一方で、HO 群は NC 群との間に有意な差は見られず HC 群に対し低下傾向が見られた。HDL-コレステロールは、NC 群に対し HC 群で低下傾向が見られ HO 群は有意に低下したが、HC 群と HO 群との間に顕著な差は見られなかった。

3.3. 肝臓の脂質関連パラメータに対するコレステロールと酸化コレステロールの効果

肝臓中のコレステロール蓄積量は NC 群に対し HC 群と HO 群の両方で有意に上昇し、HO 群は HC 群に対し低下傾向が見られた。また、トリグリセリドについては HC 群が NC 群に対し有意に上昇した一方で、HO 群は NC 群との間に有意な差は見られず HC 群に対し低下傾向が見られた。

3.4. コレステロールの摂取と酸化コレステロールの摂取による遺伝子発現変動

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 ($\log_{2}FC > 0.5$) 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 だった。また、HC vs NC でのみ発現低下 ($\log_{2}FC < -0.5$) 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 だった。

3.5. HC 群及び HO 群において発現が低下した遺伝子の機能解析

HC vs NC 及び HO vs NC において発現低下 ($\log_{2}FC < -1$) 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 (Table 2 A, B)。コレステロール合成及び TG 合成に関わる GO term が多く抽出された。

3.6. コレステロール合成及び脂肪酸合成に関わる遺伝子の発現変動

HO vs HC においてコレステロール合成及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。そこでそれらの遺伝子の発現変動を PCR により確認した。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。

■ 考 察

血液の総コレステロールとコレステロールエステルでは、酸化コレステロール食群 (high oxysterol, HO) は普通食群 (non-cholesterol, NC) との差は見られず、コレステロール食群 (high cholesterol, HC) に対し有意に低下した。HO 群に与えた酸化コレステロールの 96.91% がコレステロールにもかかわらず HC 群と HO 群との間に有意差が見られたのは、酸化コレステロールには血中のコレステロール濃度を下げる働きがあるからだと考えられた。HC 群に対し HO 群において肝臓での MVK の発現の低下傾向が見られることから、酸化コレステロール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的な変化では 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。

肝臓において、コレステロール蓄積量は HC 群と HO 群が共に NC 群に対し有意に上昇し、HO 群は HC 群に対し低下傾向を示した。これは血中の場合と同様に、酸化コレステロールには肝臓中のコレステロール蓄積量を下げる働きがあるからだと考えられた。トリグリセリドに関しては、NC 群に対し HC 群で有意な上昇を示し、HO 群では上昇傾向を示した。また HO 群は HC 群に対し低下傾向を示した。これは酸化コレステロール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い⁵⁾。

HC 群及び HO 群において発現が低下した遺伝子の機能解析により、コレステロール合成及び TG 合成に関わる GO term が多く抽出された。これは HC 群と HO 群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 群に対し HO 群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。酸化コレステロールが FASN や SREBP1 の発現を低下させることは報告されている³⁾。

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、本研究では酸化コレステロール摂取により、血中コレステロールの低下が見られた。また、肝臓でのコレステロール合成に関わる遺伝子の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 群でも低下していた。HC 群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 群は HC 群と比較し MVK の発現が低下傾向を示したことから、酸化コレステロール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。酸化コレステロール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。また、HC 群と比較し HO 群において増加した免疫関連の GO term も多かったことから、今後は HO 群のもつ炎症作用についても検討したい。

■ 要 約

酸化コレステロールを微量含むコレステロールの摂取と純品のコレステロールの摂取では、血中や肝臓の成分及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) に対し酸化コレステロール食群 (high oxysterol, HO) において血中コレステロールの低下及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、酸化コレステロール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。

本研究の成果は以下の学会にて発表予定である (要旨提出済み)

日本農芸化学会 2014 年度大会 (明治大学) 3月28日、2B05p04 コレステロール酸化物 (COP) がラットの代謝に与える影響、多田篤生、小川真奈、加藤久典、小林彰子

■ 文 献

1. 前場良太 (2002) 動脈硬化と酸化コレステロール, オレオサイエンス 第 2 巻第 5 号:248-274
2. Buttari, B., Segoni, L., Profumo, E., D'Arcangelo, D., Rossi, S., Facchiano, F., Businaro, R., Iuliano, L., Rigano, R. (2013) 7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2

- macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 86:130-137
3. Terunuma, S., Kumata, N., Osada, K. (2013) Ezetimibe Impairs Uptake of Dietary Cholesterol Oxidation Products and Reduces Alterations in Hepatic Cholesterol Metabolism and Antioxidant Function in Rats. *Lipids*, 48:587-595
 4. Reeves, P. G. (1997) Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A diet. *Journal of Nutrition*, 127:838S-841S.
 5. Sasaki, T., Fufikane, Y., Ogino, Y., Osada, K., Sugano, M. (2010) Hepatic Function and Lipid Metabolism Are Modulated by Short-term Feeding of Cholesterol Oxidation Products in Rats. *Journal of Oleo Science*, 59(9):503-507

Table1 各群に与えた餌の組成

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

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

A. HC vs NC

B. HO vs NC

A

Term	Count
lipid metabolic process	10
└lipid biosynthetic process	9
regulation of lipid metabolic process	3
└regulation of lipid biosynthetic process	3
steroid metabolic process	7
└steroid biosynthetic process	6
regulation of steroid metabolic process	3
└regulation of steroid biosynthetic process	3
└regulation of cholesterol biosynthetic process	2
sterol metabolic process	7
└sterol biosynthetic process	6
cholesterol metabolic process	6
└cholesterol biosynthetic process	5
alcohol metabolic process	7
cellular lipid metabolic process	7
└neutral lipid metabolic process	3
└acylglycerol metabolic process	3
└triglyceride metabolic process	3
organic ether metabolic process	3
└glycerol ether metabolic process	3
liver development	3
cellular response to stress	5
response to fatty acid	2
response to insulin stimulus	3

B

Term	Count
lipid metabolic process	10
└lipid biosynthetic process	8
regulation of lipid metabolic process	4
└regulation of lipid biosynthetic process	4
steroid metabolic process	5
└steroid biosynthetic process	4
regulation of steroid metabolic process	4
└regulation of steroid biosynthetic process	4
└└regulation of cholesterol biosynthetic process	2
sterol metabolic process	5
└sterol biosynthetic process	4
cholesterol metabolic process	4
└cholesterol biosynthetic process	3
alcohol metabolic process	7
cellular lipid metabolic process	7
└neutral lipid metabolic process	3
└└acylglycerol metabolic process	3
└└triglyceride metabolic process	3
cellular process	40
└cellular metabolic process	29
metabolic process	31
└primary metabolic process	28
biosynthetic process	15
organic ether metabolic process	3
└glycerol ether metabolic process	3
RNA metabolic process	8
└ncRNA metabolic process	4
fatty acid biosynthetic process	3
acetyl-CoA biosynthetic process	2

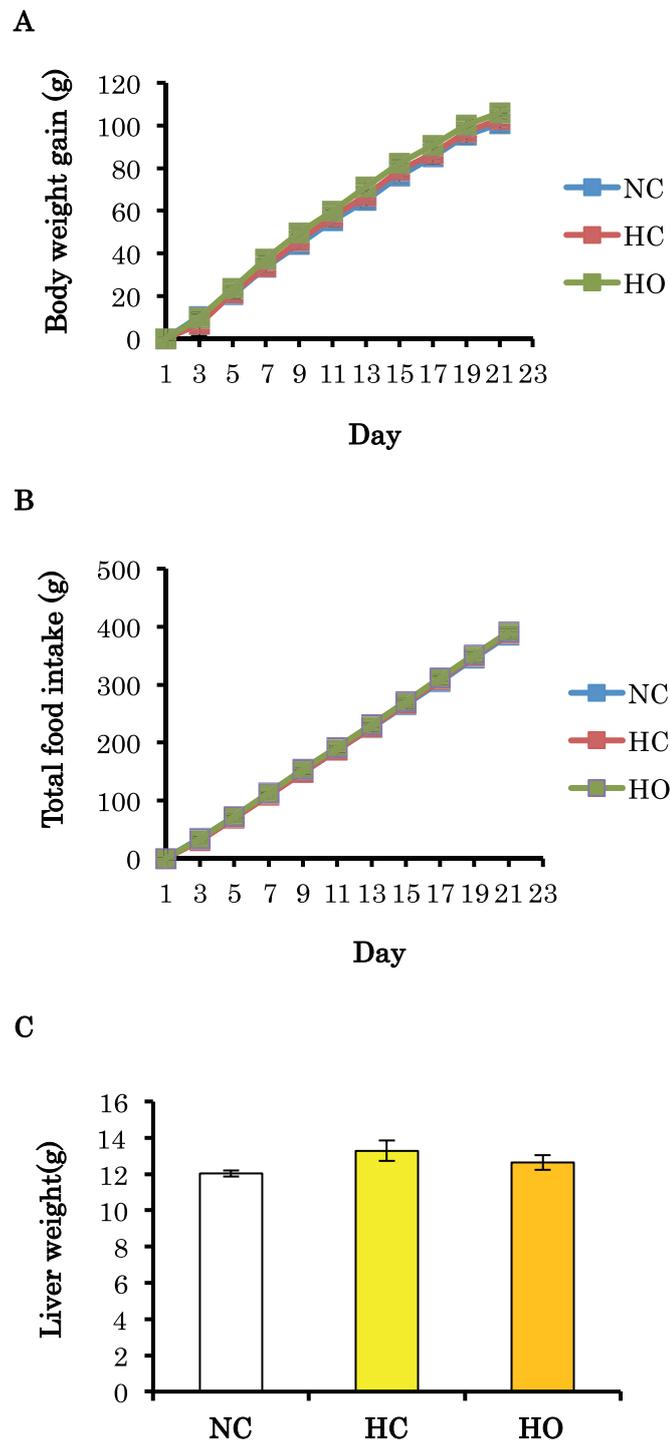


Fig.1 ラットの体重増加量の累積摂餌量の変化及び肝臓重量

A. 本飼育 21 日間の体重増加量 (n=6、means±S.E.)

B. 本飼育 21 日間の累積摂餌量 (n=6、means±S.E.)

C. 肝臓重量 (n=6、means±S.E.)

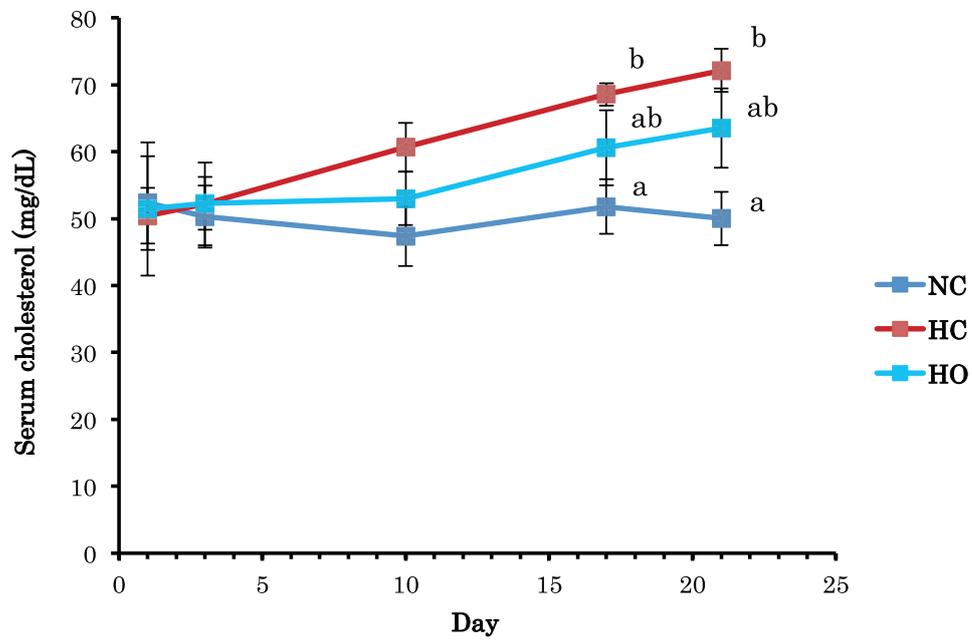


Fig.2 血中総コレステロール濃度の経日変化

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±S.E.、different letter: p<0.05(Tukey's test))