動脈硬化症の予防に有効な鹿児島県産の食材の探索

内匠 正太
国立大学法人 鹿児島大学水産学部 食品生命科学分野
〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20
TEL：099-286-4201

要旨
超高齢社会を迎えたわが国では、動脈硬化症などの生活習慣病が今後ますます増加することが予想され、それに伴う医療費のさらなる増大が懸念される。こうした中、医療費削減の観点から“食品の三次機能”すなわち疾病予防・健康増進機能が注目されており、日常的な食事による疾病予防は今後いっそう有効な手段になると考えられる。そこで本研究では、鹿児島県産食材の中から動脈硬化症の予防に有効な食品成分を見出すことを目的とした。具体的には、動脈硬化症の予防に寄与する血中高密度リポタンパク質 (HDL) に着目し、HDL 産生に重要なコレステロール輸送体 ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) の発現を誘導する食品のスクリーニング法を確立し、それを用いた有効食材の探索を行ったので報告する。

１．緒言

動脈硬化を基盤とする心疾患および脳血管疾患は、悪性新生物に次ぐ主要な死亡原因である。近年は医療費削減の観点から、食品の三次機能である疾病予防・健康増進機能が着目されており、日常的な食事による疾病予防が今後有効な手段になると考えられている。

動脈硬化症のリスク要因の一つに血中高密度リポタンパク質 (HDL) 量の低下が挙げられる。HDL は、全身の細胞から余剰なコレステロールを回収し、コレステロールの代謝・排泄を担う肝臓へと輸送する働きを担っている。HDL の産生は、主に肝臓に発現しているコレステロール輸送体 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) に依存するため、ABCA1 の発現誘導は動脈硬化症の予防に有効であると考えられている [1]。

本研究では、鹿児島県産の食材を中心に動脈硬化症の予防に有効な食品成分を見出すことを目的とした。具体的には、HDL 産生を担う ABCA1 の発現を誘導する食品成分のスクリーニング法を確立し、これを用いて鹿児島県産の食材を評価した。実験には、ABCA1 の発現が、核内受容体 liver X receptor (LXR) の転写活性により誘導 [2]されることから、ABCA1 のプロモーター領域に存在する LXR 応答配列の下流にレポーター遺伝子として copGFP 遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイを用い、ABCA1 の転写を活性化する食品成分の探索を行った。

本研究により得られた知見を鹿児島県産の食材の機能性評価と付加価値向上に役立て、鹿児島県産食材の消費の向上と地域住民の健康寿命延伸に寄与することを目指す。

２．実験

2.1 使用細胞

ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞に ABCA1 遺伝子のプロモーター領域に含まれる LXR 応答配列の下流に copGFP 遺伝子と Luciferase 遺伝子が組み込まれたレポーターベクターを安定的に発現する HepG2-TR106A 細胞を実験に用いた (Fig. 1)。

HepG2 細胞は、D-MEM 培地に 10% FBS、100 units/mL Penicillin、および 100 µg/mL Streptomycin を含有する培地を用い、HepG2-TR106A 細胞は、E-MEM 培地に 10% FBS、1%ピルビン酸ナトリウム、1 %非必須アミノ酸、100 units/mL Penicillin、および 100 µg/mL Streptomycin を含有する培地を用い、37℃、5%CO_2、100%飽和湿潤条件下で培養し、実験に用いた。

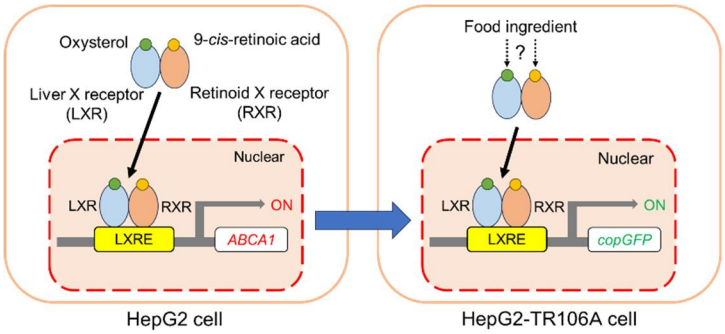


Fig. 1 Image of the cells used in this study

2.2 食品抽出液の調製

食品抽出液は、食材サンプル（ゴマ、レンコン、ショウガ、高リコピントマト、トマト、赤タマネギ、タマネギ、大葉、ナス、赤キャベツ、ブロッコリー、ブロッコリースプラウト、スダチ、カボス、キンカン、クリハー、ダイダイ、ケラジ）を細断し、80%エタノールで 2 時間攪拌抽出後、ろ過しエバポレーターで濃縮したものを使用した。また、食品関連化合物 40 種類は DMSO に溶解し実験に用いた。

2.3 スクリーニング条件

96-well plate に HepG2-TR106A 細胞（0.2×10^4 cell/mL）を播種し、24 時間インキュベート後、食品抽出液またはポジティブコントロールとして LXR の合成リガンドである T0901317 を添加した。24 時間インキュベート後、倒立型蛍光顕微鏡で copGFP の蛍光発現を解析した。食品抽出液は、エタノールの終濃度が 0.16%以下になるように希釈し添加した。食品関連化合物は DMSO の終濃度が 0.01%以下になるように希釈し添加した。

2.4 ABCA1 のタンパク質発現解析

HepG2-TR106A 細胞で認められた蛍光シグナルの増強が、内在性の ABCA1 の発現を誘導するか否かを確認するため、HepG2 細胞を用いたタンパク質の発現解析を行った。最も蛍光シグナルの増強がみられたムラサキキャベツを今回は解析に用いた。HepG2 細胞に各濃度のムラサキキャベツ抽出液を 24 時間曝露し、ABCA1 タンパク質の発現を Western Blotting により解析した。また、内部標準として Na^+/K^+-ATPase を用いた。

３．結果・考察

HepG2-TR106A 細胞を用いた食品抽出液のスクリーニングの結果、大葉 (*Perilla frutescens* var. crispa: *P. frutescens*)、ナス (*Solanum melongena*: *S. melongena*)、ムラサキキャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*: *B. oleracea*) の抽出液で特に蛍光シグナルの増強が認められた。一方、タマネギ (*Allium cepa*: *A. cepa*)、食品関連化合物として用いたイソクエルシトリンやクロロゲン酸等では顕著な蛍光シグナルの増強は認められなかった (Fig. 2)。

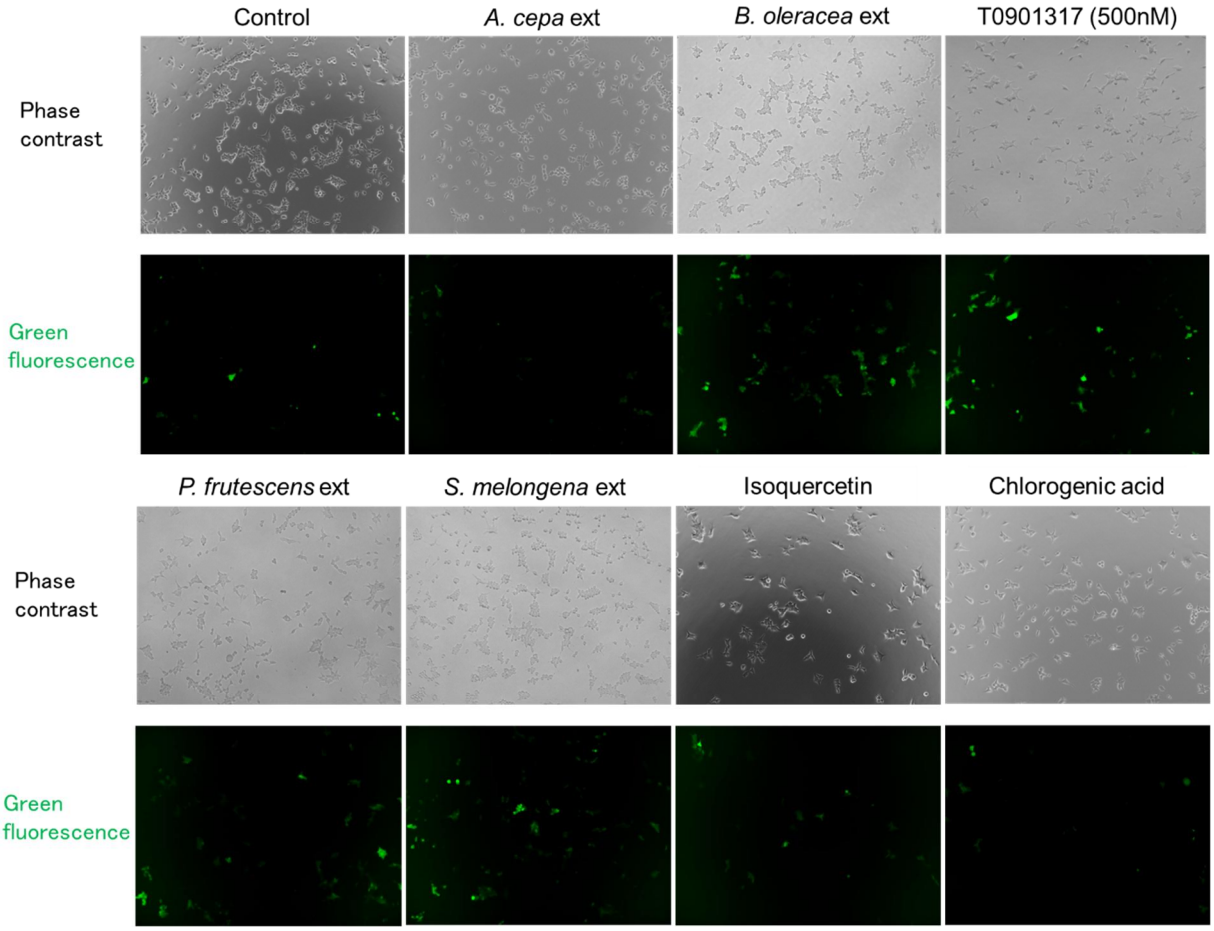


Fig. 2 Screening results obtained with HepG2-TR106A cells

HepG2-TR106A 細胞を用いた解析の結果、特に蛍光シグナルの増強が認められたムラサキキャベツを用いて、実際に内在性の ABCA1 タンパク質の発現が増加するか否かを確認するために、HepG2 細胞を用いた解析を行った。Western blotting によるタンパク質発現解析の結果、ムラサキキャベツ抽出液は濃度依存的に ABCA1 タンパク質の発現を誘導した (Fig. 3)。

本研究で行ったスクリーニングの結果、ムラサキキャベツをはじめ、ナスや赤シソなどアントシアニン類を多く含む食材が蛍光シグナルの増強を示した。ムラサキキャベツに含まれるルブロブラシンは、シアニジンをアグリコンとして、ナスに含まれるナスニンはデルフィニジンをアグリコンとして持つことから、これらのアントシアニジン類が

機能している可能性が推察される。実際に、アントシアニジン類が、マウス腹膜マクロファージ細胞およびマクロファージ由来泡沫細胞において ABCA1 の発現量を増加させ、コレステロール排出を誘導することが報告されている[3)]。

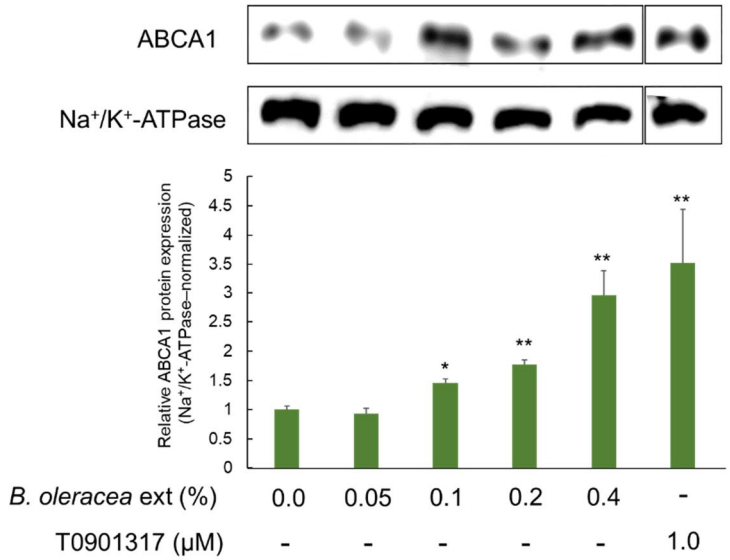


Fig. 3 Induction of ABCA1 expression in HepG2 cells by *B. oleracea* extract
*p < 0.05, **p < 0.01 vs. 0% *B. oleracea* extract (control)

また、大葉に含まれるロズマリン酸についても、マクロファージ細胞において ABCA1 の発現を誘導したことが報告[4)]されており、本研究で見出された食材にもこれらの成分による効果が期待される。一方、ナスやキャベツなどにも含まれるクロロゲン酸が ABCA1 の発現を誘導することが HepG2 細胞を用いた研究で報告[5)]されているが、今回用いたアッセイ系では顕著な蛍光発現は誘導されなかった。このことから、クロロゲン酸は LXR 以外の経路を介して ABCA1 の転写を活性化している可能性が推察される。

４．結論

本研究では、ABCA1 の発現を誘導する食材を探索するために HepG2-TR106A 細胞を用いたアッセイ方法の検討を行い、鹿児島県産の食材を中心に探索を行った。その結果、複数の食材について蛍光発現を示すことが明らかとなった。今後、これらの食材についてもムラサキキャベツと同様の解析を行い、実際に ABCA1 の発現を誘導し得る食材となり得るか否かについての解析を行い鹿児島県産の食材が持つ機能性を見出していきたい。

５．謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝いたします。

６．引用文献

1) Wang, J., Xiao, Q., Wang, L., Wang, Y., Wang, D., & Ding, H. (2022). Role of ABCA1 in Cardiovascular Disease. Journal of Personalized Medicine, 12(6), 1010.

2) Costet, P., Luo, Y., Wang, N., & Tall, A. R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. The Journal of Biological Chemistry, 275(36), 28240–28245.

3) Xia, M., Hou, M., Zhu, H., Ma, J., Tang, Z., Wang, Q., Li, Y., Chi, D., Yu, X., Zhao, T., Han, P., Xia, X., & Ling, W. (2005). Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ-liver X receptor α-ABCA1 pathway. The Journal of Biological Chemistry, 280(44), 36792–36801.

4) Nyandwi, J. B., Ko, Y. S., Jin, H., Yun, S. P., Park, S. W., & Kim, H. J. (2021). Rosmarinic Acid Increases Macrophage Cholesterol Efflux through Regulation of ABCA1 and ABCG1 in Different Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, 22(16), 8791.

5) Hao, S., Xiao, Y., Lin, Y., Mo, Z., Chen, Y., Peng, X., Xiang, C., Li, Y., & Li, W. (2016). Chlorogenic acid-enriched extract from Eucommia ulmoides leaves inhibits hepatic lipid accumulation through regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells. Pharmaceutical Biology, 54(2), 251–259.

Exploring Foods from Kagoshima Prefecture for Atherosclerosis Prevention

Shota Takumi

Division of Food and Chemical Biology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
Address: 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima 890-0056, Japan

Atherosclerosis-based cardiovascular and cerebrovascular diseases remain the second leading cause of death in Japan. Because high-density lipoprotein (HDL) counteracts atherogenesis by exporting excess cellular cholesterol, dietary up-regulation of hepatic ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), the initiator of HDL formation, offers a promising preventive strategy. We therefore optimized a reporter assay to identify ABCA1-inducing foods. The human hepatoma cell line HepG2-TR106A, which stably expresses copGFP and luciferase downstream of a Liver X receptor (LXR) response element within the ABCA1 promoter, was exposed for 24 h to ethanol extracts of Kagoshima-grown foods as well as 40 food-derived compounds. As a result, several extracts significantly increased fluorescence; among them, purple cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) extract produced the strongest response. Subsequent Western blot analysis of parental HepG2 cells confirmed that this extract increased endogenous ABCA1 protein level. These results suggest that multiple Kagoshima food materials have the potential to induce ABCA1 expression. Ongoing work will characterize the responsible components and verify whether these foods can effectively enhance ABCA1 in physiological settings, thereby adding functional value to regional agricultural products.